

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Muazzez DERYA**

**SSR MARKÖRLERİ KULLANILARAK MERCİMEK  
TÜR VE ÇEŞİTLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞE  
DAYALI TAKSONOMİK İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2012**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SSR MARKÖRLERİ KULLANILARAK MERCİMEK TÜR VE  
ÇEŞİTLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞE DAYALI TAKSONOMİK  
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Muazzez DERYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 03.01.2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Hakan ÖZKAN  
DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU  
ÜYE

.....  
Doç. Dr. Faruk TOKLU  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
**Kod No:**

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL**  
**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.**  
**Proje No: ZF2011YL1**

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

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### SSR MARKÖRLERİ KULLANILARAK MERCİMEK TÜR VE ÇEŞİTLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞE DAYALI TAKSONOMİK İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Muazzez DERYA

#### ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. Hakan ÖZKAN  
Yıl: 2012, Sayfa: 67

Jüri :Prof. Dr. Hakan ÖZKAN  
:Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU  
:Doç. Dr. Faruk TOKLU

Bu çalışmada dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan ve mercimeğin kültür türüne (*Lens culinaris* subsp. *culinaris*) ait 40 genotip ile yabani türlerine ait 130 genotip kullanılarak tür içi ve türler arası genetik çeşitlilik araştırılmış ve filogenetik analizler yapılmıştır. Bu analizlerde, mercimek için yeni geliştirilmiş olan 20 SSR markörü kullanılmış ve her bir markör için polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve genetik çeşitlilik indeksi (GÇİ) değerleri ile heterozigotluk oranı (HtO) ve allel sayıları (AS) hesaplanmıştır. Bütün lokuslardan elde edilen toplam allel sayısı 223 olarak saptanmış olup, bu allellerden 217 tanesinin polimorfik olduğu saptanmıştır. PBİ değeri 0.14 ile 0.94 arasında değişirken ortalama PBİ değeri 0.72 olarak bulunmuştur. Polimorfik markörlerden elde edilen allel sayısının 2 ile 32 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 15.5 olduğu saptanmıştır. Markörlerin gösterdiği allelik varyasyonun türlere göre değişiklik gösterdiği ve 20 SSR marköründen 13'ünün türlere özgü bazı alleller ürettiği tespit edilmiştir. Mercimeğe özgü SSR markörlerinin aktarılabilirlik oranının *L. culinaris* subsp. *orientalis* alt türünde en yüksek (%85.1) ve *L. nigricans* türünde en düşük (%31.4) olduğu bulunmuştur. Genetik yakınlık değerlerine göre oluşturulan NeighborNet grafiğinde, çalışmada kullanılan mercimek genotiplerinin 6 gruba ayrıldığı, *L. culinaris* subsp. *culinaris* ve *L. culinaris* subsp. *orientalis* alt türlerine ait genotiplerin aynı grupta yer alırken, diğer türlerin ise ayrı ayrı gruplarda yer aldığı gözlenmiştir. Elde edilen genetik yakınlık değerlerine göre, kültür türüne en yakın türün *L. orientalis*, en uzak türün ise *L. nigricans* olduğu tespit edilmiştir. *L. orientalis*'den sonra kültür türüne en yakın yabani türlerin sırasıyla, *L. ervoides*, *L. odemensis*, *L. tomentosus* ve *L. lamottei* olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mercimek, SSR, Taksonomik İlişki

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# TAXONOMIC RELATIONSHIPS BASED ON GENETIC DIVERSITY USING SSR MARKERS AMONG LENTIL SPECIES (*Lens* sp.) AND CULTIVARS

Muazzez DERYA

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor :Prof. Dr. Hakan ÖZKAN  
Year: 2012, Pages: 67  
Jury :Prof. Dr. Hakan ÖZKAN  
:Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU  
:Assoc. Prof. Dr. Faruk TOKLU

In this study, the genetic diversity within species and between species was investigated and phylogenetic analyses were performed using 40 cultivated (*Lens culinaris* subsp. *culinaris*) and 130 wild lentil genotypes which were collected from different geographic regions of the world. In these analyses, lentil-specific 20 SSR markers were used and polymorphism information content (PIC) value, genetic diversity index value, heterozygosity rate and allele numbers were calculated for each SSR marker. Totally 223 alleles were detected among all loci and 217 of them were polymorphic. The average number of allele per locus was 15.5 and polymorphism information content (PIC) of primers ranged from 0.14 to 0.94 with an average of 0.72. It is determined that allelic variation of markers differed according to species and out of the 20 primers, 13 primers produced some species-specific alleles. The highest transferability rate of lentil-specific SSR markers was detected in *Lens culinaris* subsp. *orientalis* (%85.1) and the lowest transferability rate was found in *L. nigricans* (%31.4). All lentil genotypes were separated into six groups in NeighborNet Planar Graph. It is observed that lentil genotypes which belong to *L. culinaris* subsp. *culinaris* and *L. culinaris* subsp. *orientalis* were clustered together and other species were clustered separately. According to genetic similarity values, *L. orientalis* was found as the most related species and *L. nigricans* was found as the least related species to the cultivated lentil.

**Key Words:** Lentils, SSR, Taxonomic Relationship

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a,

Mercimek tohumlarının bize ulaşmasını sağlayan ICARDA uluslararası araştırma kurumuna ve Sayın Doç. Dr. Faruk TOKLU'ya,

Tohumlarımın ekim aşamasında yardımcı olan laboratuvar görevlisi Sayın Mehmet Ali DOĞAN'a,

Özellikle ABI cihazına yükleme aşamasındaki teknik desteklerinden dolayı, Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çalışmalarını yürüten yüksek lisans öğrencisi Hayat TOPÇU'ya,

İki yıl boyunca çalışmalarımı yürüttüğüm Tarla Bitkileri Moleküler Genetik Laboratuvarında, her türlü konuda bana destek veren arkadaşlarım Ziraat Yük. Müh. Esra ÇAKIR, Faheem Shehzad BALOOCH (Ph.D Fellow) ve Biyolog Hatice TOĞAÇ'a,

Samimiyetine inandığım, beni her zaman bir abla gibi dinleyen hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Gönül CÖMERTPAY'a,

Laboratuvar çalışmalarında ve laboratuvar dışında beni her konuda destekleyen, moral ve motivasyon sağlayan, karşılaştığım problemler için akılcı çözümler üreterek bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Enver Ersoy ANDEDEN'e,

Hayatımdaki varlığından gurur duyduğum ve beni her konuda cesaretlendiren anneme, kararlarıma saygı duyan babama, en sıkıntılı anlarımda bile beni gülümsetebilen kardeşime teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Mercimeğin Orijini.....	5
2.1.1. Mercimeğin Kültür Türü ile Yabani Ataları Arasındaki İlişkiler.....	5
2.1.2. Arkeolojik Kalıntılar.....	6
2.1.3. Mercimeğin Orijininin Bulunmasına ve Mercimek Türlerinin Arasındaki İlişkinin Belirlenmesine Yönelik Genetik Çalışmalar.....	7
2.1.4. Türlere Özgü SSR Markörlerinin Farklı Türlerde Kullanılabilirliğinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar.....	12
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Metod.....	19
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	19
3.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	20
3.2.3. Mercimeğe Özgü SSR PRimerlerinin Yabani Türlerde Taranması.....	21
3.2.4. Yabani Türlerde Bant Üreten SSR Primerlerinin Kapiller Elektroforez Sistemi İçin Optimize Edilmesi.....	23
3.2.5. Mercimek Türlerinde Genetik Çeşitliliğin Analiz Edilmesi.....	25
3.2.5.1. SSR Primerlerinin PBI, GÇİ, Ht ve AS Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.5.2. Her Bir Tür İçin Polimorfik Markör Sayısının ve Polimorfizm Yüzdesinin Belirlenmesi.....	25

3.2.5.3. Türler Arasındaki Genetik Benzerlik ve Genetik Uzaklığın Belirlenmesi.....	26
3.2.5.4. Mercimek Türlerine Ait Soyağacının Oluşturulması.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Mercimeğe Özgü SSR Primerlerinin Yabani Mercimek Türlerinde Kullanılabilirliğinin Test Edilmesi.....	27
4.2. SSR Primerlerinin ABI 3130xl Genetik Analizör Cihazında Taranması.....	33
4.3. SSR Primerlerinin 170 Mercimek Genotipinde Analiz Edilmesi .....	35
4.4. Mercimek Türleri Arasındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi .....	43
4.5. Mercimekte Moleküler Markörler Kullanılarak Yapılan Genetik Çeşitlilik Çalışmaları ve Filogenetik Çalışmalar.....	45
4.6. SSR Markörlerinin Farklı Türler veya Cinsler Arasında Kullanılabilirliği.....	47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	61
EKLER.....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 3.1. SSR primerlerinin taramasında kullanılan PCR koşulları .....	22
Çizelge 3.2. Taramada kullanılan PCR programları.....	23
Çizelge 4.1. 121 SSR primerine ait tarama sonuçları .....	29
Çizelge 4.2. Mercimeğe özgü SSR primerlerinin yabancı mercimek türlerinde aktarılabirlik oranları.....	32
Çizelge 4.3. Genetik çeşitlilik analizinde kullanılan SSR primerleri .....	35
Çizelge 4.4. 20 SSR markörünün 170 mercimek genotipinde analizi sonucunda 14 polimorfik SSR marköründen elde edilen değerler .....	39
Çizelge 4.5. Türlerle özgü alleller üreten SSR markörleri ve bu markörlerin ürettikleri alleller.....	42
Çizelge 4.6. Mercimek türleri arasındaki Nei genetik benzerlik oranları.....	45



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 3.1. Bazı mercimek genotiplerin DNA miktarının agaroz jel üzerinde tahmin edilmesi.....	20
Şekil 3.2. Bazı mercimek genotiplerin DNA konsantrasyonlarının 10 ng/ µl'a ayarlanması.....	21
Şekil 3.3. Bazı SSR primerlerinin yabani türlerde taranmasına ait jel görüntüsü...21	
Şekil 3.4. Bazı SSR primerlerinin yabani türlerde taranmasına ait jel görüntüsü...22	
Şekil 3.5. ABI genetik analizör cihazında pik şeklinde görülen ve aralarında bir baz çifti fark bulunan DNA fragmentleri.....	24
Şekil 4.1. CULC 221, CULD 303, CULB 416 ve SSR 99 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	27
Şekil 4.2. CULB 402, CULB 306, CULA 323 ve CULB 420 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	27
Şekil 4.3. CULC 404, CULB 112, CULC 311 ve CULB 301 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.4. CULD 6, CULB 407, CULC 414 ve CULC 409 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.5. CULC 302, CULB 423, CULC 410 ve CULB 418 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.6. CULB310 primerinin TD-3 programında verdiği elektroforegram görüntüsü.....	34
Şekil 4.7. CULB117 primerinin BS programında verdiği elektroforegram görüntüsü.....	34
Şekil 4.8. CULB 223 primerinin mercimeğin tüm türlerine ait birer genotipte verdiği elektroforegram görüntüsü.....	36
Şekil 4.9. CULD303 primerinin mercimeğin tüm türlerine ait birer genotipte verdiği elektroforegram görüntüsü.....	37
Şekil 4.10. Mercimek türleri arasındaki Nei genetik benzerlik katsayısına göre oluşturulan NeighborNet Soyağacı .....	44



## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

ABI	: Applied biosystems
BAC	: Bacterial Artificial Chromosome
BBU	: Beklenen bant uzunluğu
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
dk	: Dakika
ddH <sub>2</sub> O	: Doubledestile su
dATP	: Deoksi adenzin trifosfat
dCTP	: Deoksi sitidin trifosfat
dGTP	: Deoksi guanozin trifosfat
dTTP	: Deoksi timidin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetikasit
FAOSTAT	: Food and Agriculture Organization Statistic
Fe	: Demir
g	: Gram
GÇİ	: Genetik Çeşitlilik İndeksi
HCl	: Hidroklorik asit
HtO	: Heterozigotluk oranı
ISSR	: Inter simple sequence repeat
K	: Potasyum

$\lambda$	: Lamda
LIZ	: Size standart
M	: Molar
Mbp	: 1 Milyon baz çifti
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
$\mu$ l	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
$\mu$ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	: Sodyum metabisülfid
ng	: Nanogram
P	: Fosfor
PBI	: Polimorfizm bilgi içeriği
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PVP	: Polivinilpirolidon
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
rpm	: Revolutions per minute
s	: Saniye
SSR	: Simple sequence repeat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris/Borik asit/EDTA tampon çözeltisi
Tris-HCl	: Tris hidroklorür
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average
6-FAM	: 6-Carboxyfluorescein
Zn	: Çinko

## 1. GİRİŞ

Bir yıllık ve kendine döllen bir kültür bitkisi olan mercimek (*Lens culinaris* Medik.), kültüre alınan ilk bitkilerden birisidir (Zohary ve Hopf, 1988). Mercimeğin bütün türleri diploid yapıda (2n) ve 14 kromozoma sahip olup, genom büyüklüğü 4063 Mbp'dır (Arumuganathan ve Earle, 1991).

Mercimek, 'baklagiller' olarak bilinen Leguminosae (*Fabaceae*) familyasına dâhildir. Diğer baklagiller gibi protein içeriği bakımından hem insan hem de hayvan beslenmesinde önemli rol oynar. Ayrıca mineraller (K, P, Fe, Zn) ve vitamin bakımından da oldukça zengindir. Bu içeriklerinin yanında diğer yemeklik dane baklagil tohumlarının aksine yapısında tripsin inhibitörleri, hemaglutininler ve tanin gibi toksik maddelerden az miktarda bulundurması, bu bitki grubunda mercimeğin beslenme açısından değerini arttırmaktadır (Muehlbauer ve Tullu, 1997). Mercimek bir baklagil olduğundan kökleri vasıtasıyla ortak yaşam sürdürdüğü "*Rhizobium leguminosarum*" bakteri türü aracılığı ile havanın serbest azotunu toprağa bağlamakta ve toprağı azotça zenginleştirmektedir (Tosun ve Eser, 1978).

Batı Asya'da yetiştirilen en eski bitkilerden biri olan mercimek, hala Hindistan, Orta Doğu, Güney Avrupa ve Doğu- Kuzey Afrika'da ekonomik önemini korumaktadır (Ferguson ve Erskine, 2001). Son yıllarda Kanada, Amerika ve Avustralya gibi ülkelerde de yoğun olarak yetiştirilmektedir. Son yıllarda mercimeğin hem ekim alanı hem de verimi artmıştır (Erskine, 2009). Dünyada mercimek ekim alanı 3.700.798 ha. olup üretimi 3.917.923 tondur (FAO, 2009). 2009 yılı istatistiki verilerine göre, mercimek üretiminde ilk 5 sırayı; Kanada, Hindistan, Türkiye, Amerika ve Nepal almıştır (FAO, 2009). Türkiye'de ise kırmızı mercimek ekim alanı 2.116.000 ha., yeşil mercimek ekim alanı 228.922 ha.; kırmızı mercimek üretimi 422.000 ton ve yeşil mercimek üretimi 25.400 tondur (TUİK, 2010).

'*Lens*' cinsi 6 türde 7 takson içermektedir (Ferguson 1998; Ferguson ve ark. 2000). *Lens culinaris* subsp. *orientalis*, *Lens culinaris*'in atası sayılmaktadır. Bu iki takson rahatlıkla melezlenebilmekte ve sonuçta verimli döller elde edilebilmektedir (Muehlbauer ve ark. 2006). Ladizinsky ve Abbo (1996), *Lens* cinsi içinde melezleme

çalışmaları yaparak, çalışmada kullandıkları türlerin tohum tutma ve kromozom yapısına bakarak iki yeni takson tanımlamışlardır: *Lens culinaris* ve *Lens nigricans*. Daha sonra Ladizinsky (1997) *Lens* cinsinde iki yeni tür daha tanımlamıştır: *Lens tomentosus* ve *Lens culinaris* subsp. *orientalis*. İlk olarak Czefranove (1971) tarafından tanımlanan *Lens lamottei*, Ladizinsky ve ark. (1984) tarafından *Lens nigricans* içerisinde tanımlanmış, Van Oss ve ark. (1997) tarafından ise ayrı bir takson olarak rapor edilmiştir. *Lens* cinsi 6 tür içermekte olup, bunlar: *Lens culinaris* Medikus (subsp. *culinaris*, subsp. *orientalis* (Boiss)), *Lens odemensis* Ladizinsky, *Lens tomentosus* Ladizinsky, *Lens lamottei* Czefranove, *Lens ervoides* (Brign.) Grande, *Lens nigricans* (M. Bieb) Godron'dur.

Yabani mercimek türlerinin dünyadaki dağılım aralığı 27° güney enleminden 45° kuzey enlemine, 70° doğu boylamından 15° batı boylamına kadar değişmektedir. Bu aralık Akdeniz kuşağını kapsamakta ve doğuda Tacikistan'a kadar uzanmaktadır (Davies ve ark., 2007). *Lens ervoides*, temel olarak Akdeniz bölgesinde bulunmakta olup İsrail, Suriye, Türkiye, Yugoslavya'nın Adriyatik kıyısı, İtalya'nın güneyi ve daha az olarak İspanya ve Cezayir'de dağılım göstermektedir. Ayrıca Etiyopya ve Uganda'da da bu türe rastlandığı rapor edilmiştir (Ferguson ve Erskine, 2001). *Lens nigricans*, Güney Avrupa'da ortaya çıkan bir Akdeniz türüdür. Dağılım alanı; Doğuda Kırım Yarımadası ve Gürcistan'a, batıda ise Kanarya Adaları'ndan La Palma'ya kadar uzanmaktadır. Bu tür ayrıca dağınık olarak Cezayir, Fas, İtalya ve Alpler'de bulunmaktadır (Ferguson ve Erskine, 2001). *Lens odemensis*, ilk olarak İsrail'de iki bölgede, daha sonra Türkiye'deki iki bölgeden sağlanan herbaryum materyalinde tanımlanmıştır. *Lens odemensis* son olarak Suriye'den de toplanmıştır (Davies ve ark., 2007).

*Lens culinaris* subsp. *orientalis*, kültüre alınmış mercimeğin yabani atasıdır. Bu iki alt tür birbiriyle melezlenebilmekte ve ayırt edici morfolojik özellikler taşımaktadırlar. *Lens culinaris* subsp. *orientalis*'in kuraklığa (Hamdi ve Ersinke, 1996), soğuğa (Hamdi ve ark., 1996; Robertson ve ark. 1996) ve Ascochyta hastalığına (Bayaa ve ark., 1994; Robertson ve ark. 1996) dayanıklı olduğu bildirilmiştir. *L. culinaris* subsp. *orientalis*, Türkiye'den Tacikistan'a ve İran'dan Kırım'a kadar uzanan bölgede yetişmektedir. *L. culinaris* subsp. *orientalis* alttürü

ayrıca Türkmenistan, Özbekistan ve Tacikistan'da yaygındır. Yapılan arazi çalışmalarında *L. culinaris* subsp. *orientalis*'in İsrail ve Türkiye'de *L. ervoides* ile ortak alanlarda yaşadığı, fakat *L. odemensis* ve *L. nigricans* ile aynı ortak yaşamı paylaşmadığı rapor edilmiştir (Ladizinsky, 1989).

Morfolojik olarak *L. lamottei*, *L. odemensis*'e çok yakındır ve izoenzime dayalı olarak yapılan çalışmalarda *L. lamotte*'nin, *L. odemensis* ve *L. culinaris* ile birlikte gruplandığı rapor edilmiştir (Hoffman ve ark. 1986, Ferguson ve Robertson 1996). Kültüre alınmış mercimeğe yakın olan *L. nigricans*, *L. odemensis* ve *L. culinaris* subsp. *orientalis* taksonları içinde yüksek oranda genetik çeşitlilik rapor edilmiştir. *L. ervoides* ve *L. lamottei*'nin kültüre alınmış mercimekle benzer genetik tabana sahip iki tür olduğu düşünülmektedir (Ferguson 1998).

Morfolojik karakterler, tür tanımlamada en çok kullanılan özelliklerdir. Bu karakterlerden bazıları; bitkinin büyüme şekli, yaprak şekli, stipula, çanak, tohum rengi, tohum çapı ve kabuk büyüklüğüdür (Ahmad ve ark. 1997). Fakat morfolojik karakterlere dayalı klasik tür tanımlama yöntemi, yeteri kadar güvenilir değildir. Mercimek türleri, morfolojik olarak birbirine çok benzemektedir ve sadece birkaç özellik ayırt edici olarak kullanılmaktadır (Galasso 2003). Bu nedenle, tür içi ve türler arası ilişkileri değerlendirmek için son yıllarda moleküler analizlere odaklanılmıştır.

Farklı moleküler markörler kullanılarak yapılan çalışmalarla, *L. culinaris* subsp. *orientalis* alttürünün, mercimeğin atası olduğu gösterilmiştir (Ladizinsky 1979; Ladizinsky ve ark. 1984; Pinkas ve ark. 1985; Havey ve Muehlbauer 1989; Mayer ve Soltis 1994; Abo-elwafa ve ark. 1995; Sharma ve ark. 1996; Ford ve ark. 1997; Hamwieh ve ark. 2009; Reddy ve ark. 2010; Alo ve ark. 2011). İki alt tür arasındaki bu ilişki, daha önce yapılan morfolojik gözlemlerle de desteklenmiştir (Ladizinsky 1999). Ancak, mercimek türleri arasındaki ilişkinin ve mercimeğin kültüre alınma sürecinin değerlendirilmesi için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

Mercimekte genetik çeşitlilik çalışması sınırlı sayıda yapılmıştır. Örneğin, Babayeva ve ark. (2009) Orta Asya ve Kafkasya mercimek germplasmasını kullanarak, Sonnante ve Pignone (2007) İtalya yerel mercimek çeşitlerini kullanarak, Toklu ve ark (2009) Türk yerel mercimek çeşitlerini kullanarak, Lázaro ve ark. (2001) İspanya

yerel mercimek çeşitlerini kullanarak, Fikiru ve ark. (2007) Etiyopya yerel mercimek çeşitlerini kullanarak genetik çeşitlilik analizleri yapmışlardır. Tüm bu çalışmalarda farklı DNA markör teknikleri kullanılmış ve mercimekteki genetik çeşitlilik bölgesel olsa da ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Ancak yabancı mercimek türlerindeki genetik varyasyonu SSR markörleri kullanarak gösteren detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmanın amacı, 108O628 nolu ve 'Mercimekte SSR Markörlerinin Geliştirilmesi ve Genetik Haritalama' isimli proje kapsamında geliştirilen SSR markörlerini kullanarak, a) dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan yabancı mercimek türleri arasında türler arası genetik varyasyonu belirlemek ve b) mercimeğe özgü SSR markörlerinin yabancı mercimek türlerinde kullanılabilirliğini araştırmak olmuştur.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Mercimeğin Orijini

#### 2.1.1. Mercimeğin Kültür Türü ile Yabani Ataları Arasındaki İlişkiler

Leguminosae familyasında bulunan mercimek, tür sayısı az olmasına rağmen tür içi ve türler arası genetik çeşitliliği yüksek olan bir cinistir (Ladizinsky ve Abbo, 1996). Bütün mercimek türleri aynı kromozom sayısına sahiptir ( $2n=14$ ). İlk olarak *Ervum* cinsine dâhil edilen mercimek, daha sonra tamamen ayrı bir cins olarak (*Lens*) kabul edilmiştir. Kültüre alınmış mercimek için kullanılan bilimsel isim; 1787 yılında Medikus tarafından yayınlanan *Lens culinaris*'dir. Mercimeğin taksonomisi çok defa değiştirilmiştir. İlk olarak, *L. culinaris*, *L. ervoides*, *L. montbretti* (günümüzde *Vicia montbretti*) *L. nigricans* ve *L. orientalis* olmak üzere beş tür içerdiği belirtilmiştir. 1974'de Williams ve ark., *L. culinaris* ve *L. orientalis*'i *L. culinaris*'in alt türleri olarak değerlendirmişlerdir (sırasıyla, ssp. *culinaris* ve ssp. *orientalis*). Ladizinsky ve ark. (1984) *L. nigricans* türünü stipula morfolojisine göre ikiye ayırmış (yatay ve dikey stipulalı) ve bu iki ayrı grubu kültür türü ile melezlemişlerdir. Dikey stipulalı olan grup kültür türü ile kolayca melezlenebildiği için adı *L. culinaris* ssp. *odemensis* olarak değiştirilmiştir. Ladizinsky ve ark., (1984) mercimeğin, üç alt türe sahip *L. culinaris* türü (ssp. *odemensis*, ssp. *orientalis* ve ssp. *culinaris*) ve iki alt türe sahip *L. nigricans* türünden (ssp. *nigricans* ve ssp. *ervoides*) oluştuğunu rapor etmişlerdir. Daha yakın zamanda ise, Van Oss ve ark. (1997) *Lens* cinsi için yedi takson önermiştir: *L. culinaris* Medik. ssp. *culinaris*, *L. culinaris* ssp. *orientalis* (Boiss.) Ponert, *L. odemensis* Ladiz., *L. ervoides* (Brign.) Grande, *L. nigricans* (Bieb.) Godr. ve yeni tanımlanmış iki tür: *L. culinaris* ssp. *orientalis*'ten ayrılan *L. tomentosus* Ladiz. ile *L. nigricans*'tan ayrılan *L. lamottei* Czefr. (Ladizinsky 1997). Son çalışmalara göre, Ferguson ve ark. (2000), *L. odemensis*'in *L. culinaris*'in bir alt türü olduğunu bildirmişlerdir fakat bu sonuçlar sitogenetik (Galasso, 2003) ve moleküler (Sonnante ve ark. 2003) kanıtlarla çürütülmüştür.

Her bir türde bazı farklılıklar gözlense de yabancı mercimek türlerinin genel dağılım alanı Akdeniz'dir. *L. culinaris* ssp. *orientalis* Yunanistan'dan Özbekistan'a ve Kırım Yarımadası'ndan Ürdün'e kadar dağılmıştır (Ladizinsky 1979; Cubero 1981). *L. nigricans*, Kanarya Adaları ile Kuzey Afrika'yı kapsayan bölgede ve Akdeniz kıyıları boyunca İsrail'den İspanya'ya kadar dağılmıştır. *L. ervoides*, Etiyopya ve Uganda'ya kadar uzanmasına rağmen daha kısıtlı bir dağılım göstermektedir (Smartt 1990). *L. odemensis*, Orta Doğu'da dağılmıştır (Ladizinsky 1986). *L. tomentosus* Ladz. Suriye ve Türkiye başta olmak üzere Orta doğu'da, *L. lamottei* ise Fas, Fransa ve İspanya'da dağılmıştır.

### 2.1.2. Arkeolojik Kalıntılar

Mercimeğe dair en eski kalıntılar, Yunanistan'da (Franchthi mağarası, M.Ö. 11000) ve Suriye'de (Tell Mureybit, M.Ö. 8500-7500) bulunmuştur (Zohary 1972; Hansen ve Renfrew 1978; Zohary ve Hopf 1993). Fakat yabancı tipler ile küçük tohumlu kültür tipleri morfolojik olarak ayırt edilemediği için, kültüre alındıkları yeri tam olarak ayırt etmek de mümkün değildir. İsrail'de (Yftah-el, M.Ö. 6800), mercimeğin kültüre alındığını ya da en azından yoğun olarak yetiştirildiğini gösteren kanıtlar rapor edilmiştir (Zohary 1992). Kültüre alındığının göstergesi olan daha büyük tohumlar ise İran'da (Tepe Sabz, M.Ö. 5500-5000) bulunmuştur (Helbaek 1969). Mercimeğin Orta Doğu'da kültüre alındığı düşüncesi yabancı mercimeğin dağılım alanı ve arkeolojik kalıntılar ile örtüşmektedir.

Mercimek, Neolitik zamanda Kıbrıs'a yayılmıştır ve bununla ilgili kalıntılar Khirokitia kazılarında (M.Ö. 5500) bulunmuştur (Erskine ve ark. 1994). Ayrıca Prastio kazılarında (ca. 3500-M.Ö. 2800) toplanan örneklerin %60'ının mercimek olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu kazıda toplanan materyaller küçük tohumlu olduğu için yabancı mi yoksa kültüre alınmış mı olduğunu söylemek mümkün değildir. Tohum büyüklüğünün, bitkinin yabancı ya da kültür tipi olduğunu belirlemede bir kriter olarak kullanılması her zaman bir belirsizlik yaratmıştır. Bu nedenle başka yabancı türleri de bulduran bölgelerde, hem yabancı hem de kültüre alınmış örneklerin kullanılması önerilmiştir (Rupp ve ark. 2000).

Doğu'da bulunan mercimek tohumları, M.Ö. 5000-4000 yıllarında Gürcistan'a yayılmış ve M.Ö. 2500-2000 yıllarında Hindistan ve Pakistan'da görülmüştür. Yunanistan'da da mercimek oldukça bilinen bir bitki olmuş ve arpayla beraber ekmek yapımında kullanılmıştır. Roman tarımcısı Columella, 'De Re Rustica, Liber secundus'da (1. yy) mercimeğin ekimi, hasatı ve tohumu zararlılardan korumak için gerekli önlemleri bildirmiştir.

### 2.1.3. Mercimeğin Orijininin Bulunmasına ve Mercimek Türleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesine Yönelik Genetik Çalışmalar

Barulina (1930), morfolojik benzerliklere dayanarak, *L. culinaris* ssp. *orientalis*'in kültür mercimeğinin yabani atası olabileceğini ve küçük tohumlu mercimeğin Hindu Kush ile Himalaya arasındaki bölgede evrimleştiğini ileri sürmüştür. Renfrew (1969, 1973), mercimeğin *L. nigricans* türünden evrimleştiğini ve Güney Avrupa'da kültüre alındığını savunmuştur. Zohary (1972)'de mercimeğin yabani atasının *L. culinaris* ssp. *orientalis* olduğunu ve fosil tohum kalıntılarının Orta Doğu'da bulunduğunu göz önünde bulundurarak, verimli hilal olarak adlandırılan bölgede kültüre alındığını belirtmiştir. Son moleküler ve biyokimyasal çalışmalar da mercimeğin, *L. culinaris* ssp. *orientalis* yabani türünden kültüre alındığını göstermiştir (Ladizinsky 1979; Ladizinsky ve ark. 1984; Pinkas ve ark. 1985; Havey ve Muehlbauer 1989; Mayer ve Soltis 1994; Abo-elwafa ve ark. 1995; Sharma ve ark. 1996; Ford ve ark. 1997; Hamwieh ve ark. 2009; Reddy ve ark. 2010; Alo ve ark. 2011).

Pinkas ve ark. (1985), 67 mercimek popülasyonunda, 9 enzim markörünü kullanarak *Lens culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides* ve *L. nigricans* türleri arasındaki genetik uzaklığı hesaplamışlardır. Analiz sonucunda genetik olarak birbirine en yakın iki türün *L. orientalis* ve *L. culinaris* olduğunu ve *L. nigricans* türünün ise diğer türlerden tamamen ayrıldığını bildirmişlerdir.

Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak, DNA'nın farklı büyüklüklerde parçalara ayrılarak incelenmesine dayanan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizleri ile *L. culinaris* ssp. *culinaris* alt türüne en

yakın alt türün *L. culinaris* ssp. *orientalis* olduğu ve benzerlik bakımından bunu *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans*'ın takip ettiği bildirilmiştir (Havey ve Muehlbauer 1989).

Muench ve ark. (1991), kültür ve yabani mercimek türleri arasındaki taksonomik ilişkiyi ve genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla kloroplast DNA'sını kullanarak RFLP analizi yapmışlar ve *L. culinaris* subsp. *culinaris*, *L. culinaris* subsp. *orientalis* ve *L. culinaris* subsp. *odemensis* üyelerinde restriksiyon enzimleri ile kesilen fragmentlerin uzunluğunda yüksek oranda benzerlik bulunduğunu ve *L. nigricans* ve *L. ervoides* türlerinin mercimeğe (*L. culinaris* subsp. *culinaris*) oranla daha fazla genetik çeşitlilik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, RFLP analizinden elde ettikleri sonuçlara göre, *L. culinaris* subsp. *orientalis*'in *L. culinaris* subsp. *culinaris*'in atası olduğunu rapor etmişlerdir.

Rosa ve Jouve (1992), kültür ve yabani (*L. culinaris* subsp. *culinaris*, *L. culinaris* subsp. *orientalis*, *L. odemensis*, *L. nigricans* ve *L. ervoides*) mercimek türlerinde, depo proteinlerini ve izoenzim markörlerini kullanarak genetik çeşitlilik analizi yapmışlardır. Analiz sonucunda, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin oldukça fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, elde edilen sonuçları istatistikî olarak değerlendirdiklerinde, ortak biyokimyasal karakterlere sahip olan *L. culinaris* subsp. *orientalis* ve *L. odemensis* türlerinin birbirine en yakın iki tür olduğunu rapor etmişlerdir.

Mayer ve Soltis (1994) mercimekte kloroplast DNA analizi yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre, *L. culinaris* ssp. *orientalis* türüne ait genotiplerin %75'inin *L. culinaris* subsp. *culinaris* ile aynı kesim modelini paylaştığını ve *L. culinaris* ssp. *orientalis*'in *L. culinaris* subsp. *culinaris*'in atası olduğunu rapor etmişlerdir.

Abo-elwafa ve ark. (1995), 45 polimorfik fragmente dayalı Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analizinde, *L. culinaris* subsp. *culinaris*'e en yakın türün *L. culinaris* ssp. *orientalis* ve en uzak türün *L. ervoides* olduğunu, *L. odemensis* ve *L. nigricans* türlerinin ise aynı grupta yer aldığını bildirilmiştir.

Ahmad ve ark. (1996), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) moleküler markör tekniğini kullanarak, farklı coğrafik bölgelere dağılmış mercimek

türlerinde (*L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis* ve *L. nigricans*) genetik çeşitliliği araştırmışlar ve bu veriler ile kültüre alınmış mercimeğin orijini hakkında bilgi elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda, mercimek kültür türünde tür içi genetik varyasyonun yabani türlerdeki tür içi varyasyona göre daha dar olduğunu ve *L. orientalis* türünün *L. culinaris* türüne en yakın tür olduğunu bildirmişlerdir.

Sharma ve ark. (1996), kültür (*Lens culinaris* subsp. *culinaris*) ve yabani (*L. culinaris* subsp. *orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans*, *L. lamottei* ve *L. tomentosus*) mercimek türlerini içeren 54 mercimek genotipinde, 24 adet RAPD primerini kullanarak genetik varyasyonu incelemişlerdir. Analizler sonucunda elde edilen verilere göre, *L. culinaris* subsp. *orientalis*'in kültür mercimeğine en benzer tür olduğunu, kültür türüne en uzak iki türün ise sırasıyla *L. nigricans* ve *L. ervoides* olduğunu belirtmişlerdir.

Ferguson ve Robertson (1996), 11 lokusta yaptıkları izoenzim analizleri ve bunlardan elde edilen filogenetik analizler sonucunda, *L. odemensis* ve *L. ervoides*'in ortak bir atadan evrimleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu iki türün (*L. odemensis* ve *L. ervoides*) Türkiye, Suriye ve Filistin'deki dağılım bölgelerinin de aynı olduğunu rapor etmişlerdir.

Kloroplast DNA'sı ile ilgili diğer çalışmalarda, van Oss ve ark. (1997), *L. culinaris* ssp. *orientalis* türünde genetik varyasyonun daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, analiz sonuçlarına göre oluşturulan Nei ve Li (1979) genetik uzaklık indeksine dayalı soyağacında, *L. culinaris* subsp. *orientalis* türüne ait örneklerin, *L. culinaris* subsp. *culinaris*, *L. tomentosus* ve *L. odemensis* türlerini içeren bir grupta yer aldığını ve *L. ervoides* ve *L. lamottei* türlerine ait örneklerin de ayrı bir grupta yer aldığını rapor etmişlerdir. *L. culinaris* subsp. *culinaris*'e en uzak türün ise *L. nigricans* olduğunu rapor etmişlerdir.

Ford ve ark. (1997), 5S rRNA primerlerini kullanarak yaptıkları PCR analizleri sonucunda, mercimek türlerinin üç ayrı gruba ayrıldığını saptamışlardır. Bu gruplardan birincisinin *L. culinaris* ssp. *culinaris* ve *L. culinaris* ssp. *orientalis* türlerini, ikincisinin *L. nigricans* ve *L. odemensis* türlerini, üçüncüsünün ise *L. ervoides* türünü içerdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre *L. culinaris* ssp.

*orientalis*'in *L. culinaris ssp. culinaris*'e diğer mercimek türlerinden daha yakın olduğunu rapor etmişlerdir.

Ferguson ve ark. (1998), RAPD markörünü kullanarak *Lens culinaris ssp. orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides* ve *L. nigricans* türlerinde hem tür içi hem de türler arası genetik varyasyonu araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, *Lens culinaris ssp. orientalis* türü için genetik çeşitliliğin fazla olduğu bölgelerin Türkiye'nin güneydoğusu, Suriye'nin kuzeybatısı ile güneyi ve Ürdün olduğunu; *L. nigricans* türü için Türkiye'nin batısının genetik çeşitlilik merkezi olduğunu; *L. odemensis* türü için güney Suriye'deki Sweida şehrinin; *L. ervoides* türü için ise Suriye ile Türkiye arasında uzanan kıyı şeridinin genetik çeşitlilik merkezi olduğunu rapor etmişlerdir. *L. odemensis* ve *L. nigricans* türlerinde genetik çeşitliliğin fazla, *L. ervoides* türünde az, *L. culinaris ssp. orientalis*'de ise orta seviyede bir çeşitlilik gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Ferguson ve ark. (2000), mercimek türü ile ilgili taksonomik problemlerin 1) sınıflandırma ile ilgili, 2) *Lens lamottei* ile *L. odemensis* veya *L. tomentosus* arasındaki ilişki ile ilgili ve 3) *L. odemensis* ve *L. nigricans* türlerini ayırt etmede ana karakter olarak kullanılan stipula uyumuna güvenilmemesi ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, melezlenebilirlik durumu ve morfolojik benzerlik ile ilgili bilgilerin ışığı altında, izoenzim ve RAPD analizleri sonucunda, *L. odemensis* ve *L. tomentosus*'un mercimeğin alt türleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Mercimek türünde taksonomik ilişkileri detaylı araştırmak için ribozomal DNA dizi analizi yapılmıştır (Mayer ve Bagga 2002; Sonnante ve ark. 2003). Yapılan çalışmalar sonucunda *L. culinaris ssp. orientalis*'in *L. culinaris* subsp. *culinaris*'e en yakın tür olduğu bildirilmişken, *L. nigricans*'ın da en uzak tür olduğu rapor edilmiştir. Sonnante ve ark. (2003), *L. lamottei* ve *L. tomentosus* türlerinin *Lens* cinsi içinde ayrı birer tür olarak değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Duran ve Vega (2004), 36 RAPD ve 14 ISSR markörünü kullanarak *L. culinaris ssp. culinaris*, *L. culinaris ssp. orientalis*, *L. nigricans*, *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. tomentosus* ve *L. lamottei* türlerini kapsayan bir koleksiyonda genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Araştırmacılar, tüm koleksiyonda RAPD markörlerinin %91.3'ünün ve ISSR markörlerinin %98.8'inin çok sayıda polimorfik bant ürettiğini

bildirmişlerdir. Analizler sonucunda Jaccard benzerlik indeksine dayalı Fitch-Margoliash dendogramında, mercimeğin tohum tiplerine (makrosperm ve mikrosperm) ve coğrafik orijinlerine göre gruplandığını ve *L. tomentosus* türünün *L. culinaris ssp. culinaris* türüne en yakın tür olduğunu rapor etmişlerdir.

Hamwieh ve ark. (2009), geliştirdikleri 14 SSR markörünü, mercimeğin kültüre alınmış türünde ve yabancı mercimek türlerinde kullandıklarını ve yabancı bitkilerin toplam 151 allele, kültür bitkilerinin ise toplam 114 allele sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, kültür bitkilerinde genetik çeşitliliğin 0.03 ile 0.87 arasında olduğunu, yabancı bitkilerde ise 0.16 ile 0.93 arasına değiştiğini rapor etmişlerdir. Soy ağacı analizi sonucunda da biri kültür bitkileri diğeri yabancı bitkilerle olmak üzere iki ana grup (A ve B) elde edildiğini bildirmişlerdir. Yabancı bitkilerin yaklaşık %92'sinin A grubunda kümelendiğini ve kültür çeşitlerinden açık bir şekilde ayrıldığını ve benzer şekilde kültür çeşitlerinin de %93'ünün B grubunda kümelendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu soy ağacında bulunan *L. culinaris* subsp. *orientalis*'e ait 30 farklı bitkiden 4'ünün (%13,3) kültür çeşitleriyle birlikte gruplandığını ancak diğeri hiçbir yabancı mercimek türünün kültür çeşitleriyle birlikte gruplanmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda, *L. culinaris* subsp. *culinaris*'e en yakın türün *L. culinaris* subsp. *orientalis* olduğunu, en uzak türlerin ise sırasıyla *L. odemensis* ve *L. tomentosus* türleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Reddy ve ark. (2010), *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* ve *Trifolium pratense* türlerinden geliştirilmiş olan 22 SSR markörü ile daha önce mercimekte haritalanmış olan 3 SSR markörünü beş mercimek türüne (*L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. nigricans* ve *L. ervoides*) ait 40 genotipte kullanmışlar ve mercimeğin kültür ve yabancı türlerinde filogenetik ilişkiyi araştırmışlardır. Yabancı türler arasında birbirine en uzak türlerin *L. nigricans* ve *L. ervoides*, birbirine en yakın türlerin ise *L. orientalis* ve *L. culinaris* olduğunu rapor etmişlerdir.

Suvorova ve Kornienko (2011), mercimeğin kültür türü ve yabancı türlerine ait 18 mercimek genotipinde, SDS-PAGE analizi ile tohum depo proteinlerini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar ile UPGMA'ya dayalı dendogram oluşturmuşlardır. Araştırmacılar bu dendogramda üç grup oluştuğunu; birinci grupta *L.*

*orientalis* ve *L. odemensis* türlerinin bulunduğunu, ikinci grupta *L. culinaris*, *L. tomentosus* ve *L. lamottei* ve üçüncü grupta da *L. nigricans* ve *L. ervoides* türlerinin bulunduğunu rapor etmişlerdir. Analiz sonucunda, *L. orientalis* türünün *L. odemensis* türüne, *L. culinaris* türünün *L. tomentosus* türüne ve *L. nigricans* türünün *L. ervoides* türüne en yakın türler olduğunu bildirmişlerdir.

Alo ve ark. (2011), mercimeğin yabancı türlerine ait 175 ve kültür türüne ait 133 genotipte 20 CPs primerini (conserved primers) kullanarak genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkiyi değerlendirmişlerdir. STRUCTURE analizi sonucunda kullanılan genotiplerin 8 alt gruba ayrıldığını ve bu ayrımın çok az oranda karışıklık olmasına rağmen iyi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *L. culinaris* subsp. *orientalis* türünün 3 ayrı grupta baskın olarak yer aldığını ve her grubun coğrafik dağılımının farklı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, *L. culinaris* subsp. *culinaris* türünün iki ayrı grupta yer aldığını ve gruplardan birinin megasperm, diğerinin mikrosperm örnekler içerdiğini rapor etmişlerdir. Kültür türüne en yakın yabancı türün *L. culinaris* subsp. *orientalis* olduğunu, *L. nigricans* türünün diğer türlerden tamamen ayrıldığını ve mercimeğin kültüre alındığı bölgenin Türkiye’de Denizli’den Antakya’ya kadar uzanan bölge olduğunu belirtmişlerdir.

#### **2.1.4 Türlerle Özgü SSR Markörlerinin Farklı Türlerde Kullanılabilirliğinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar**

Mikrosatellitler ya da SSR’lar (Simple Sequence Repeats), ökaryotik organizmalarda yaygın olarak bulunan ve genom boyunca yayılan 2-6 bp uzunluğundaki tekrar dizileridir. SSR markörleri, polimorfik ve kodominant olmaları, tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması ve güvenilir olmaları gibi pek çok özelliklerinden dolayı bitki genetik araştırmalarında sıklıkla kullanılırlar (Powell ve ark. 1996). Ancak, yeni markör geliştirme maliyetinin yüksek olması, türlere özgü olmaları ve fazla iş gücü gerektirmeleri bu markörlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Bu yüzden genellikle tarımsal ve ekonomik olarak önemli olan bitkiler için SSR markörleri geliştirilmektedir. Türlerle özgü olan SSR markörlerinin farklı türlerde kullanılabilir olması, bu markörlerin bitki genetik araştırma çalışmalarında yaygın

olarak kullanılmasını kolaylaştırmaktadır. Türlerle özgü SSR markörlerinin farklı türlerde kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır.

Peakall ve ark. (1998), soya (*Glycine max*) için geliştirdikleri 31 SSR markörünün, *Glycine*, *Vicia*, *Trifolium*, *Lupinus*, *Albizia*, *Vigna* ve *Kennedia* cinslerine ait bazı türlere transfer olabilme yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar 31 SSR marköründen 15'inin *G. falcata*, *G. clandestina* ve *G. microphylla* türlerinde PCR ürünü verdiğini, 20 SSR markörünün de üç soya türünden bir ve daha fazlasında PCR ürünü verdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar AG81 adlı primerin çalışmada kullanılan bütün türlerde PCR ürünü verdiğini, bu PCR ürünlerinden elde edilen sekansların da büyük oranda korunmuş SSR bölgeleri olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar AG81 adlı markörün bütün türlerde korunmuş olmasını, bu markörün seril-tRNA sentez geninin yakınında olması ile açıklamışlardır. Peakall ve ark., (1998) hayvanlarla kıyaslandığında bitkilerde aynı yada yakın ilişkili cinslere ait türler arasında SSR markörlerinin başarılı bir şekilde kullanılma oranının kısıtlı olduğunu, bunun sebebinin de hem SSR bölgelerinde hem de bu bölgelerin komşu sekanslarında meydana gelen mutasyonlar olduğunu bildirmişlerdir.

De La Rosa ve ark. (2002), zeytinde (*Olea europaea* L.) SSR markörlerinin geliştirilmesi, bu markörlerin karakterizasyonu ve Oleaceae familyasındaki diğer cinslerde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada 7 SSR markörü geliştirmişlerdir. Araştırmacılar bu 7 SSR marköründen 2 SSR markörünün GA, 4 SSR markörünün CA ve 1 SSR markörünün AC tekrar dizileri ile zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerden geliştirildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, bu 7 SSR markörünün 23 zeytin çeşitinde lokus başına 6-9 allel ürettiğini ve GA tekrar dizisi ile geliştirilen 1 ve CA tekrar dizisi ile geliştirilen 2 SSR markörünün ise Oleaceae familyasından beş farklı türde polimorfik bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Guyomarc'h ve ark. (2002), ekmeklik buğday (*Triticum aestivum-AABBDD*)'ın D genom vericisi olan *Aegilops tauschii*'nin DNA'sını kullanarak geliştirdikleri 293 SSR primerinin ekmeklik buğdaya transfer olabilme oranını araştırmışlardır. Araştırmacılar geliştirdikleri 293 SSR primerinden 270'inin ekmeklik buğday genotiplerinde PCR ürünü verdiğini ve bu primerlerden de 84 'ünün

“Courtot” ve “Chinese Spring” çeşitleri arasında polimorfizm gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, “Courtot” ve “Chinese Spring” çeşitlerinin melezlenmesinden elde edilen haritalama populasyonunu kullanarak, 84 SSR markörünün hangi genomu yerleştiğini bulmaya çalışmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda; 64 SSR markörünün D genomundaki kromozomlara yerleştiğini, 7 SSR markörünün A genomundaki kromozomlara ve 11 SSR markörünün de B genomundaki kromozomlarda haritalandığı bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, *Aegilops tauschii*'den geliştirilen 84 SSR marköründen 64'ünün, *Triticum aestivum*'a transfer olabildiğini rapor etmişlerdir.

Kuleung ve ark. (2003), SSR markörlerinin buğday (*Triticum aestivum* L.), çavdar (*Secale cereale* L.) ve tritikale (*X Triticosecale* Wittmack) cinsleri arasında kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 148 adet buğdaya özgü SSR markörü ile 28 adet çavdara özgü SSR markörünü kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda, buğdaya özgü SSR markörlerinin çavdara aktarılabilirlik oranının %17 olduğunu ve çavdara özgü SSR markörlerinin %25'inin buğdayda PCR ürünü verdiğini rapor etmişlerdir. Buğdaya özgü SSR markörlerinin %58'inin, çavdara özgü SSR markörlerinin ise %39'unun tritikalede kullanılabilir olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, buğdaya özgü SSR markörlerinin buğday, çavdar ve tritikalede sırasıyla ortalama 2.6, 2.7 ve 2.4 polimorfik bant ürettiğini, çavdara özgü SSR markörlerinin ise çavdarda ortalama 2 polimorfik bant üretirken buğday ve tritikalede polimorfik bant üretmediğini rapor etmişlerdir.

Wang ve ark. (2005), buğday, çeltik, mısır ve sorgum için geliştirilen (sırasıyla 50 EST-SSR, 50 EST-SSR, 50-EST-SSR ve 30 EST-SSR+30 genomik SSR markörü) toplam 210 SSR markörünün bazı yem bitkilerine (*Eleusine coracana*, *Paspalum vaginatum* ve *Cynodon dactylon*) aktarılabilirlik oranlarını araştırmışlardır. Çalışmada dört tahıldan diğer yem bitkilerine transfer olan SSR'ların ortalama yüzdesinin %57 olduğunu, mısır ve çeltik için geliştirilmiş EST-SSR markörlerinin transfer olabilme yeteneğinin ortalamanın altında kaldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar 30 genomik SSR markörünün, *Sorghum bicolor* ile aynı altfamilya'da olan *Zea mays* ve *Paspalum vaginatum*'a aktarılma oranının (sırasıyla %68 ve %61), EST-SSR'larının aktarılma oranına göre daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Ayrıca transfer edilebilen SSR markörlerinin türler arasında, tür içine göre daha polimorfik olduğunu, sorgum türleri arasında ise SSR markörlerinin %69'unun, EST-SSR markörlerinin ise %33'ünün polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir.

Gutierrez ve ark. (2005), baklagillerde genetik ve genomik çalışmalar için model bitki olarak kabul edilen *Medicago truncatula* bitkisine özgü SSR (simple sequence repeat), EST (expressed sequence tag) ve BAC (bacterial artificial chromosome) temelli mikrosatellit bölgelerinin; Avrupa'nın en önemli üç baklagil bitkisi olan nohut (*Cicer sp.*), bezelye (*Pisum sativum*) ve bakla (*Vicia faba*) bitkilerine transfer olabilme oranlarını araştırmışlardır. Araştırmacılar bu çalışma için 242 SSR markörü, 209 EST markörü ve 33 BAC markörü kullandıklarını; 242 SSR marköründen 97'sinin (%40) baklada, 88'inin (%36.3) nohutta, 91'inin de (%37.6) bezelyede amplifiye olduğunu rapor etmişlerdir. 209 EST marköründen ise 89'unun baklada, 81'inin nohutta, 84'ünün bezelyede amplifiye olduğunu, 33 BAC marköründen de 8'inin baklada, 7'sinin nohutta, 7'sinin de bezelyede amplifiye olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar *Vicia faba*, *Cicer sp.*, *Pisum sativum* ve *Medicago truncatula* türlerinde amplifiye olan 11 SSR marköründen elde edilen PCR ürünlerini sekansladıklarını ve çoğunlukla trinükleotid motiflerinin nohut, bakla ve bezelye genomunda korunduğunu bildirmişlerdir.

He ve ark. (2006), soyaya özgü SSR markörlerinin bezelyede kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, soyaya özgü 432 SSR markörünü 4 bezelye hattında test ettiklerini ve bu SSR markörlerinin %25'inin bezelyede kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir. Bezelyede kullanılabilen SSR markörlerinin ise %28'inin polimorfik olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, bezelyede kullanılabilen bu SSR markörlerinin bezelye genom araştırmalarında, bezelye ile soya arasındaki karşılaştırmalı haritalama çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Choudhary ve ark. (2009), fonksiyonel EST-SSR markörleri geliştirmek için nohut'a özel 2131 EST-SSR sekansını kullanmışlardır. Araştırmacılar bu sekanslardan 246 SSR motifi tespit etmişler ve bu bölgelerden 183 primer çifti tasarlamışlardır. Dizayn ettikleri 183 primerden 60'ını fonksiyonel markör olarak tanımlayan araştırmacılar, 60 EST-SSR markörünü hem tür içi genetik çeşitliliği saptamak hem de

bu markörlerin, tek yıllık yabancı beş nohut türüne (9 gen kaynağından oluşan) transfer olabilme oranını saptamak için kullanmışlardır. Araştırmacılar, bu markörlerin en yüksek oranla (%96.6) *C. reticulatum*'a transfer olduğunu, en düşük oranla da *C. judaicum*'a transfer olduğunu ortalama ise %82.6 transfer oranı bulunduğunu rapor etmişlerdir. 41 markörün bütün tek yıllık nohut türlerinde amplifiye olduğu, bunlardan da 27'sinin yabancı türler arasında polimorfik olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar 60 lokusta toplam 156 allel elde ettiklerini, lokus başına düşen ortalama allel sayısının 2.6 olduğunu rapor etmişlerdir. Nohutun melezlenebilir grupları arasında 1 .grupta (*C. arietinum*, *C. reticulatum*, ve *C. echinospermum*) yer alan türler arasında 55 markörün amplifiye olduğunu, bunlardan 24 markörün polimorfik bulunduğunu, 2. Grupta (*C. bijugum*, *C. judaicum*, ve *C. pinnatifidum*) ise 41 markörün amplifiye olduğunu bunlardan 23 primerin polimorfik olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca 5 primerin sadece 1.gruptaki türlere özgü olarak transfer olduğunu bildirmişlerdir.

Garcia-Moreno ve ark. (2008), Asteraceae familyasına dahil olan ayçiçeğine özgü SSR markörlerinin aynı familyaya dahil olan yalancı safranda kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, ayçiçeğine özgü 117 SSR markörünü 6 yalancı safran ıslah hattı ile 2 ayçiçeği ıslah hattında test etmişlerdir. Ayçiçeğine özgü SSR markörlerinin yalancı safranda kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla yaptıkları bu çalışmada, yalancı safran bitkisine ait PCR ürünlerini; bantın güçlü veya zayıf oluşuna ve skorlamanın kolay veya zor oluşuna göre sınıflandırdıklarını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonunda, 117 SSR primerinden 33 SSR primerinin (%28.2) yalancı safranda PCR ürünü oluşturduğunu ancak bu primerlerden 19'unun (%16.2) güçlü ve kolay skorlanabilir bant ürettiğini rapor etmişlerdir. Yalancı safranda çoğalma gösteren 33 SSR primerinden 31'inin ayçiçeği ile benzer büyüklükte bant ürettiğini ve bu sonucun, SSR markörlerinin ayçiçeği ile yalancı safran bitkileri arasında yüksek oranda aktarılabilir olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Marquez-Lema ve ark. (2010), hardalda (*Brassica carinata*) ve hardalın yakın türlerinde SSR markörlerinin kullanılabilirliğini ve çoğalma kalitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu çalışma için *B. nigra* (B genomuna sahip) ve *B. napus*

(AC genomuna sahip) için geliştirilen SSR markörlerinden rastgele olarak toplamda 73 SSR primeri seçmişlerdir. Araştırmacılar, *B. nigra* türüne özgü 35 SSR primerinden 33'ünün (%94.3) ve *B. napus* türüne özgü 38 SSR primerinden 37'sinin (%97.4) *B. carinata* (BC genomuna sahip) türünde spesifik PCR ürünü verdiğini, diğer türler için ise; *B. nigra* türüne özgü 35 SSR primerinden, %94.3'ünün *B. juncea*'da, %91.4'ünün *B. oleracea*'da, %85.7'sinin *B. rapa*'da, %74.3'ünün *B. napus*'da spesifik PCR ürünü verdiğini, *B. napus* türüne özgü 38 SSR marköründen ise %97.7'sinin *B. juncea*'da, %97.4'sinin *B. rapa* ve *B. oleracea*'da, %68.4'ünün de *B. nigra*'da spesifik PCR ürünü verdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar *B. nigra*'ya özgü SSR markörlerinin en yüksek oranda B ve C genomuna sahip türlere, *B. napus*'a özgü SSR markörlerinin de en yüksek oranda A ve C genomuna sahip türlere transfer olduğunu, toplam 73 SSR marköründen 24 SSR markörünün de; A, B ve C genomlarında PCR ürünü verdiğini rapor etmişlerdir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak; 21 *Lens odemensis*, 45 *L. culinaris* subsp. *orientalis*, 35 *L. nigricans*, 19 *L. ervoides*, 5 *L. lamottei*, 5 *L. tomentosus*, 40 *L. culinaris* subsp. *culinaris* olmak üzere toplam 170 mercimek genotipi kullanılmıştır. Materyaller ile ilgili detaylı bilgi Ek 1’de verilmiştir.

#### 3.2. Metod

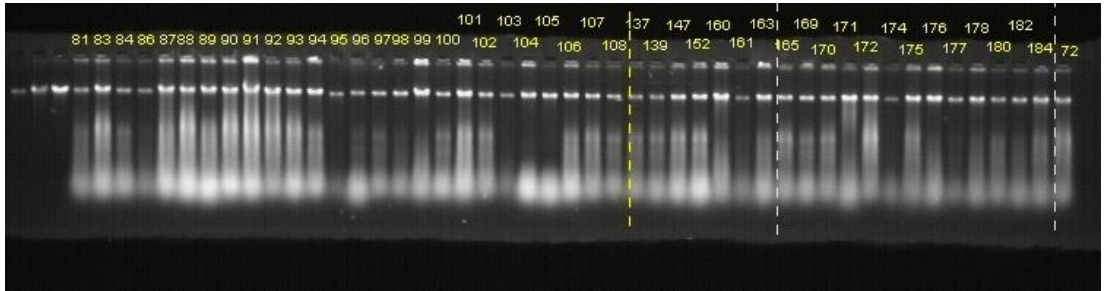
##### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Mercimek türlerinde DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1987)’nin geliştirdiği ve Kafkas ve ark. (2006) tarafından modifiye edilen CTAB yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde; bütün türlere ait taze yaprak örnekleri 0.7 g tartılarak 2 ml’lik tüplere konulmuş ve birkaç saniye sıvı azotta bekletildikten sonra Qiagen Retsch marka öğütücü aletde (Tissue Lyser) öğütülmüştür. Tüplerin içerisindeki öğütülmüş yaprak örnekleri üzerine 0,9 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ilave edilmiştir. Tampon çözeltisi eklenmiş tüpler, sıcaklığı 65°C olan sıcak su banyosunda 1 saat boyunca her 10 dakikada bir nazikçe karıştırılmak suretiyle tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiş, daha sonra tüpler içerisine yani ekstraksiyon tampon çözeltisinin üzerine 0,9 ml kloroform: isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiştir. İçerisinde kloroform-isoamil alkol bulunan tüpler, 15 dk boyunca sürekli ve yavaşça karıştırıldıktan sonra 14000 rpm’de 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj olan örneklerin üst fazları alınarak (yaklaşık 0,75 ml) yeni bir tüpe aktarılmış ve içerisine soğuk (-20°C’de bekletilmiş) isopropanol (0,5 ml) ilavesi yapılarak, DNA’nın çökmesi sağlanmıştır. Çökeltilmiş DNA bulunan tüpler, 5000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildikten sonra tüp içerisindeki üst faz dökülmüştür. Daha sonra tüpün içerisine, içerisinde 10 mM

amonyum asetat bulunan %76'lık etanol'den 1 ml ilave edilmiş ve tüpler 15 dk boyunca çalkalanmıştır. Yıkanan DNA, 2000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra üst faz dökülmüş ve DNA bir gün süreyle oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan DNA ultra saf su eklenerek çözdürülmüştür.

### 3.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

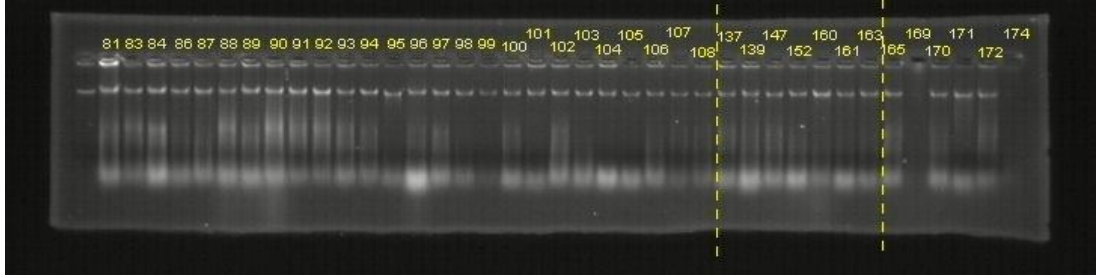
DNA konsantrasyonunun belirlenmesi sırasında her bir örnek için toplam hacim 20 µl olacak şekilde, 2 µl stok DNA ile 18 µl seyreltilmiş jel yükleme boyası karıştırılarak örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin 10 µl'si ve konsantrasyonu belli λ DNA'lardan 10 µl (1µl λ DNA+9µl boya-su karışımı), %0,8'lik konsantrasyonda hazırlanmış agaroz jel üzerindeki yuvalara yüklenmiş ve 120 voltta 40 dakika koşturma işlemi yapılmıştır. Koşan jel, ethidium bromide boyasıyla boyandıktan sonra UV transilluminatör yardımıyla görüntülenmiş, elde edilen görüntüde DNA'ların konsantrasyonu belli λ DNA'lar (50ng-100ng-200ng) ile karşılaştırılarak tahmin yapılmıştır. Böylece her bir genotip için mikrolitredeki DNA miktarı tahmin edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Bazı mercimek genotiplerin DNA miktarının agaroz jel üzerinde tahmin edilmesi

DNA tahminleri esas alınarak, PCR analizleri için her bir DNA örneğinin konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan örneklerin 10 ng/µl olup olmadığını kontrol etmek için, 10 µl DNA ile 2 µl saf jel yükleme boyası (bromophenol blue, gliserol ve 5x TBE karışımı) karıştırılarak %0,8'lik agaroz jele yükleme yapılmış ve 120 voltta 40 dakika süre ile elektroforez

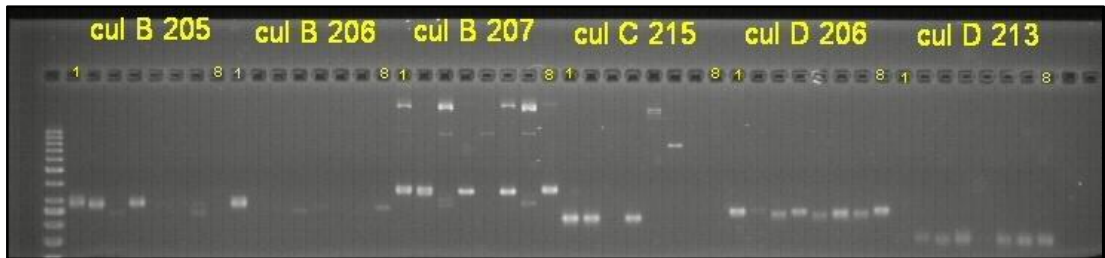
işlemi gerçekleştirilmiştir. Koşmuş olan jelin görüntüsü alınarak, jelde koşan örneklerle 100 ng'lık  $\lambda$  DNA kıyaslanmış ve her bir örneğin 10 ng/ $\mu$ l olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu işlemlerin sonucunda tüm DNA örnekleri PCR'a hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2.).



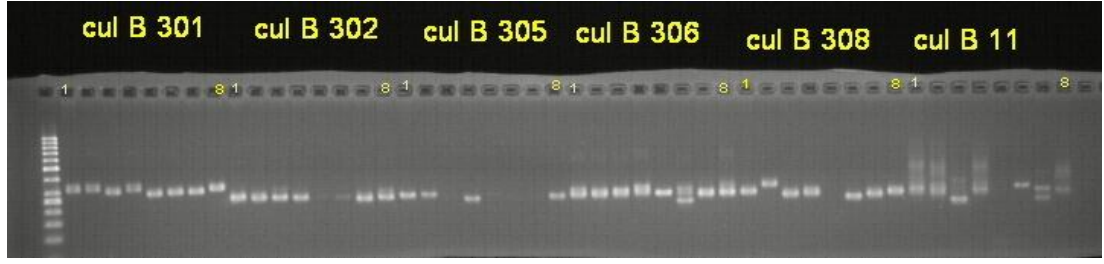
Şekil 3.2. Bazı mercimek genotiplerin DNA konsantrasyonlarının 10 ng/  $\mu$ l'a ayarlanması

### 3.2.3. Mercimeğe Özgü SSR Primerlerinin Yabani Mercimek Türlerinde Taranması

Bu çalışmanın ilk aşamasında, Andeden (2011) tarafından 'Karacadağ' isimli mercimek çeşidinin DNA'sı kullanılarak geliştirilmiş ve karakterizasyonu yapılmış olan mercimeğe özgü 102 SSR primeri ile Hamwieh ve ark. (2004) tarafından geliştirilen 19 SSR primeri yabancı mercimek türlerinde amplifikasyon bakımından taranmıştır (Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.). Bu taramada sekiz mercimek genotipi kullanılmış ve SSR analizleri Çizelge 3.1.'de verilen PCR koşullarında gerçekleştirilmiştir. Taramada kullanılan genotiplerin ilk ikisi *Lens culinaris* subsp. *culinaris* alt türüne, diğerleri sırasıyla; *L. odemensis*, *L. culinaris* subsp. *orientalis*, *L. nigricans*, *L. ervoides*, *L. lamottei* ve *L. tomentosus* türlerine aittir.



Şekil 3.3. Bazı SSR primerlerinin yabancı türlerde taranmasına ait jel görüntüsü



Şekil 3.4. Bazı SSR primerlerinin yabancı türlerde taranmasına ait jel görüntüsü

Çizelge 3.1. SSR primerlerinin taramasında kullanılan PCR koşulları

Aşama Sırası	İşlemler	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
1	Ön denatürasyon	94	5	1
2.1	Denatürasyon	94	1	
2.2	DNA'ya Bağlanma	B.S.*	1	<b>30</b>
2.3	Uzama	72	1	
3	Son uzama	72	10	1

B.S. : Primerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı

SSR-PCR reaksiyonu; 10X PCR buffer (MgCl<sub>2</sub> içeren), 2.5 mM dNTP, 5 µM ileri primer, 5 µM geri primer, 1 ünite Taq DNA polimeraz, ultra saf su ve DNA olacak şekilde, toplam 12 µl hacimde hazırlanmıştır. PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşularak yabancı türlerde tek ve temiz bant üreten 53 SSR primeri seçilmiştir.

Mercimeğe özgü 121 SSR primerinin yabancı mercimek türlerine aktarılabilirlik oranı da bu aşamada hesaplanmıştır. Bu oranlar, primerin çoğalma gösterdiği yabancı mercimek türü sayısına göre; bir yabancı mercimek türünde çoğalma gösteren primerlerin aktarılabilirlik oranı %16.6; iki yabancı mercimek türünde çoğalma gösteren primerlerin aktarılabilirlik oranı %33.3; üç yabancı mercimek türünde çoğalma gösteren primerlerin aktarılabilirlik oranı %50; dört yabancı mercimek türünde çoğalma gösteren primerlerin aktarılabilirlik oranı %66.6; beş yabancı mercimek türünde çoğalma gösteren primerlerin aktarılabilirlik oranı %83.3 ve bütün yabancı mercimek türlerinde çoğalma gösteren primerlerin aktarılabilirlik oranı %100 olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.4. Yabani Türlerde Bant Üreten SSR Primerlerinin Kapiller Elektroforez Sistemi İçin Optimize Edilmesi

Yabani mercimek türlerinde en iyi çalışan 53 SSR primerinin ABI cihazında analizi için çeşitli Touch-down PCR programları kullanılmıştır. Bu PCR programları, primerlerin önceden belirlenmiş olan bağlanma sıcaklıklarına göre modifiye edilmiş olup bu programlara ilişkin detaylı bilgi Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Taramada kullanılan PCR Programları

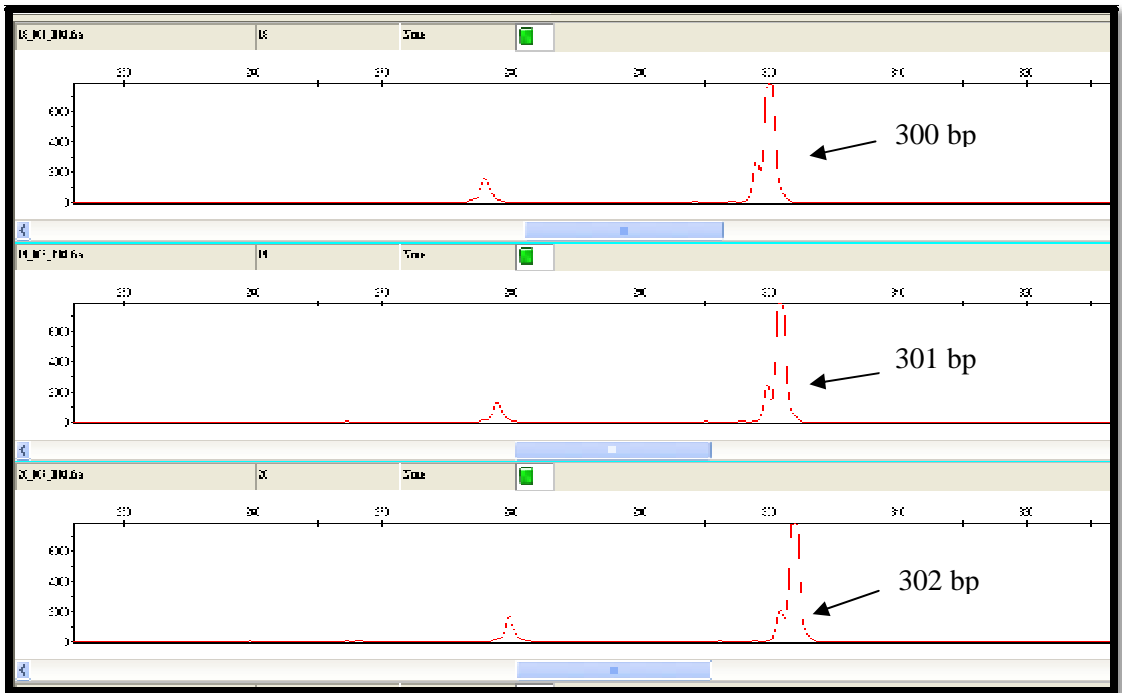
<b>TD-1</b>	1 döngü	10 döngü	25 döngü	8 döngü	1 döngü
	94°C, 5dk	94°C, 1dk 60-50°C, 30s 72°C, 1dk	94°C, 1dk 50°C, 1dk 72°C, 1dk	94°C, 30s 53°C, 45s 72°C, 45s	72°C, 15dk
<b>TD-2</b>	1 Döngü	19 döngü	19 döngü	8 döngü	1 döngü
	95°C, 5dk	95°C, 1dk 55-45°C, 1dk 72°C, 30s	95°C, 30s 50°C, 1dk 72°C, 30s	94°C, 30s 53°C, 45s 72°C, 45s	72°C, 15dk
<b>TD-3</b>	1 döngü	7 döngü	30 döngü	8 döngü	1 döngü
	95°C, 2dk	95°C, 1dk 65-60°C, 1dk 72°C, 1dk	94°C, 1dk 60°C, 1dk 72°C, 1dk	94°C, 30s 53°C, 45s 72°C, 45s	72°C, 15dk
<b>TD-5</b>	1 döngü	7 döngü	30 döngü	8 döngü	1 döngü
	95°C, 2dk	95°C, 1dk 63-58°C, 1dk 72°C, 1dk	94°C, 1dk 58°C, 1dk 72°C, 1dk	94°C, 30s 53°C, 45s 72°C, 45s	72°C, 15dk
<b>BS</b>	1 döngü	30 döngü	8 döngü	1 döngü	
	94°C, 5dk	94°C, 1dk B.S., 1dk 72°C, 1dk	94°C, 30s 53°C, 45s 72°C, 45s	72°C, 15dk	

BS: Primerin Bağlanma Sıcaklığı, TD: Touch-Down

Her bir primer için beklenen bant uzunlukları göz önünde bulundurularak, gruplar oluşturulmuş ve gruptaki her bir primer için, farklı floresan boyayla (6-FAM, VIC, NED VE PET) işaretlenmiş M13 primeri (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') kullanılmıştır. PCR reaksiyonu; 10X PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 5 µM ileri primer (5' ucunda M13 üniversal baz dizisi eklenmiş primer), 5 µM geri primer, 2.4 µM M13 primeri (floresan boyaların [6-FAM, VIC, NED ve PET] biriyle işaretli

üniversal primer), 1 ünite Taq DNA polimeraz, ultra saf su ve DNA olacak şekilde, yine toplam 12 µl hacimde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonundan sonra dört farklı PCR ürününden, her örnek için 1 µl alınarak, 9.8 µl Hi-Di formamid ve 0.2 µl LIZ-500 size standart ile birlikte bir kuyucuğa yüklenmiştir. Bu işlemden sonra, PCR ürünlerini içeren karışımlar 95°C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra, 5 dakika da buzda bekletilmiştir. Elektroforeze hazır hale gelen örnekler ABI cihazına yüklenmiştir. Böylece, ABI genetik analizör cihazında, dört farklı primerin aynı anda elektroforezi sağlanmıştır.

SSR analizlerinden elde edilen PCR ürünleri, ABI genetik analizör sisteminde kapiller elektroforeze tabi tutulduktan sonra DNA fragmentleri pikler halinde görülmekte ve her bir pik bir alleli temsil etmektedir. Genetik çeşitlilik çalışmalarında ABI genetik analizör cihazının kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri allel büyüklüklerinin kesin olarak belirlenmesi ve aralarında bir bp (baz çifti) büyüklüğü kadar fark olan allellerin dahi ayırt edilebilmesidir (Şekil 3.5.)



Şekil 3.5. ABI genetik analizör cihazında pik şeklinde görülen ve aralarında bir baz çifti fark bulunan DNA fragmentleri

GeneMapper (version 4.0) paket programı elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve en temiz sonuç veren (non-spesifik bağlanma gözlenmeyen) primerler ve bu primerlerin en iyi çalıştığı PCR programları seçilmiştir.

### **3.2.5. Mercimek Türlerinde Genetik Çeşitlilik Analizleri**

ABI taramasından sonra en iyi sonuç veren, Andeden (2011) tarafından geliştirilmiş SSR primerlerinden 20 SSR primerinin 170 mercimek genotipinde SSR analizi yapılmıştır. 20 SSR primerinden 7 primer için TD-1, 6 primer için TD-3, 5 primer için TD-5, 1 primer için TD-2 ve 1 primer için ise bağlanma sıcaklığına uygun PCR programı kullanılmıştır. PCR programları ve PCR reaksiyonu ile ilgili bilgiler bölüm 3.3.4.'te verilmiştir. GeneMapper (version 4.0) paket programı kullanılarak, PCR sonuçları değerlendirilmiş ve her bir primer için bütün genotiplerin ürettiği alleller belirlenmiştir.

#### **3.2.5.1. SSR Primerlerinin PBI, GÇİ, HtO ve AS Değerlerinin Belirlenmesi**

GeneMapper programı yardımıyla her bir primer için üretilen allel büyüklüğü belirlendikten sonra, PowerMarker 3.0 V (Liu ve Muse, 2004) paket programı kullanılarak her bir primer için polimorfizm bilgi içeriği (PBI), genetik çeşitlilik indeksi (GÇİ), heterozigotluk oranı (HtO) ve allel sayıları (AS) belirlenmiştir.

#### **3.2.5.2. Her Bir Tür İçin Polimorfik Markör Sayısının ve Polimorfizm Yüzdesinin Belirlenmesi**

PopGene Version 1.31 (Yeh ve ark., 1999) paket programı kullanılarak her bir tür için polimorfik markörler ve polimorfizm yüzdeleri belirlenmiştir.

**3.2.5.3. Türler Arasındaki Genetik Benzerlik ve Genetik Uzaklığın Belirlenmesi**

PopGene Version 1.31 (Yeh ve ark., 1999) paket programı kullanılarak, Nei'nin (1978) genetik benzerlik ve genetik uzaklık katsayısına göre türler arasındaki genetik benzerlik ve genetik uzaklık oranları belirlenmiştir.

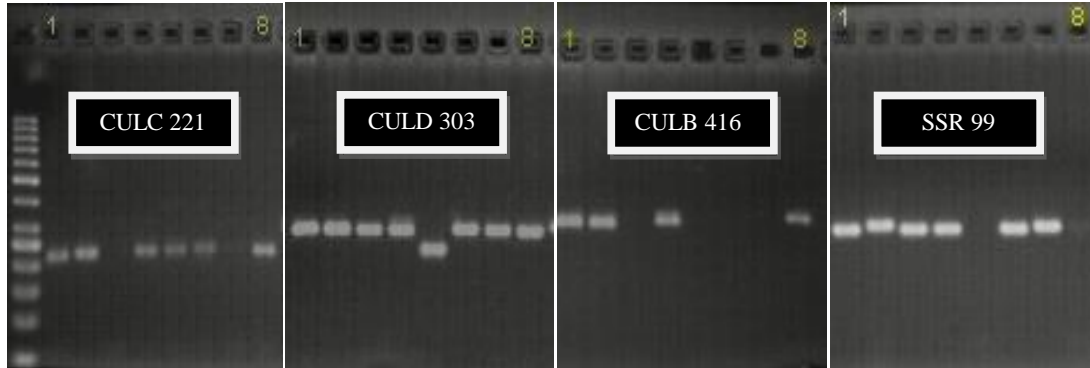
**3.2.5.4. Mercimek Türlerine Ait Soyağacının Oluşturulması**

ABI cihazındaki analizden elde edilen sonuçlara göre, her bir genotip için bütün primerlerden elde edilen allellerin tümü var (1) ve yok (0) şeklinde skorlanmıştır. Elde edilen veriler Splits Tree V 4.6 (Huson ve Bryant, 2006) paket programında analiz edilerek Nei (1978) genetik benzerlik katsayısına göre, Neighbor Net (NNet) Planar Graph oluşturulmuştur.

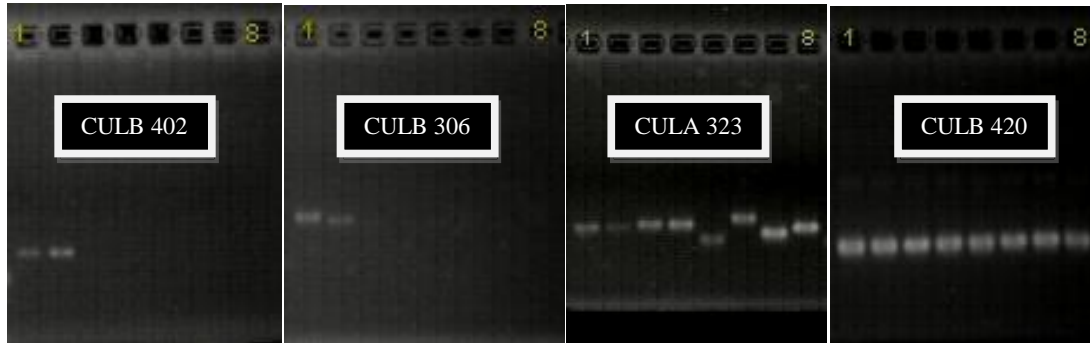
#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. Mercimeğe Özgü SSR Primerlerinin Yabani Mercimek Türlerinde Kullanılabilirliğinin Test Edilmesi

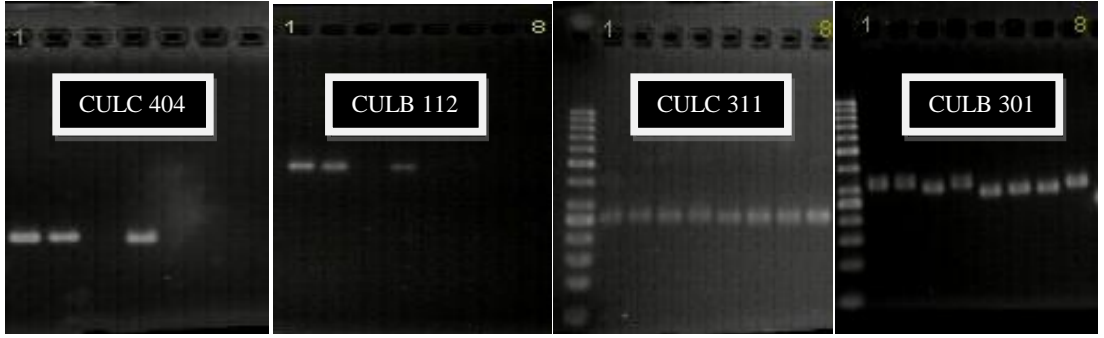
Mercimekte tür içi ve türler arası genetik çeşitliliği ve taksonomik ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada, ilk olarak 121 SSR primeri mercimeğin bütün türlerini temsil eden birer genotipte test edilmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.). Her bir genotip için, bant üretme durumuna göre primerler var (+) ve yok (-) şeklinde skorlanmıştır. Taramada kullanılan PCR reaksiyon koşulları ve amplifikasyon döngüleri bölüm 3.2.3.'de belirtilmiştir. Tarama sonuçları ise Çizelge 4.1.'de verilmiştir.



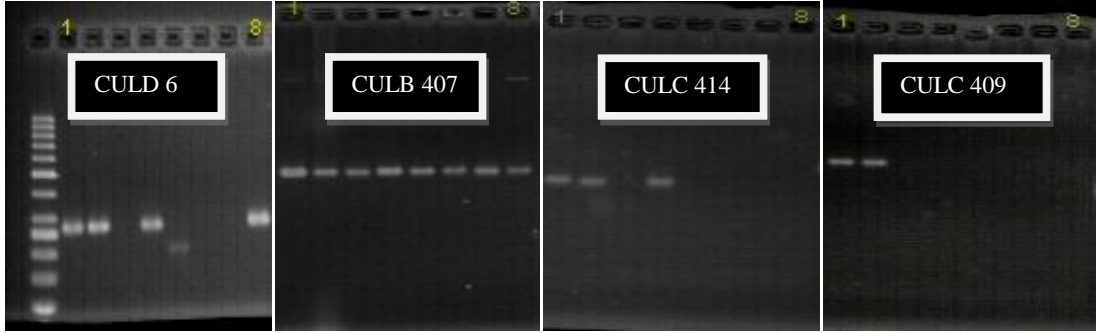
Şekil 4.1. CULC 221, CULD 303, CULB 416 ve SSR 99 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü (1ve 2: *L. culinaris* subsp. *culinaris*, 3: *L. odemensis*, 4: *L. orientalis*, 5: *L. nigricans*, 6: *L. ervoides*, 7: *L. lamottei*, 8: *L. tomentosus*)



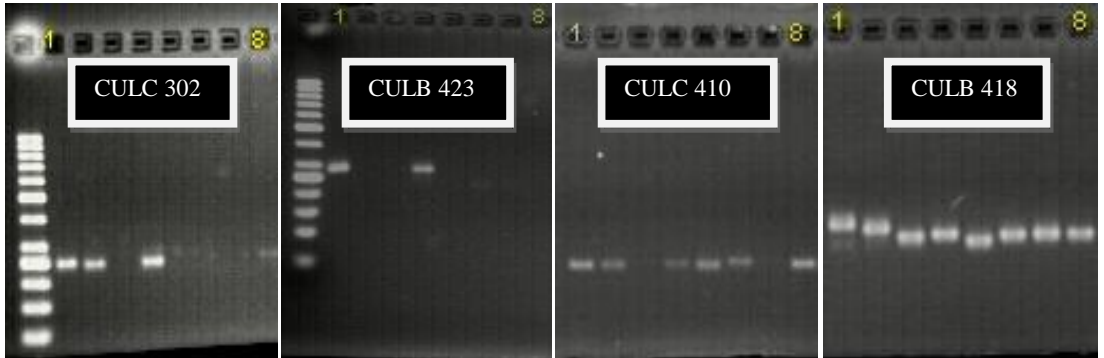
Şekil 4.2. CULB 402, CULB 306, CULA 323 ve CULB 420 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü (1ve 2: *L. culinaris* subsp. *culinaris*, 3: *L. odemensis*, 4: *L. orientalis*, 5: *L. nigricans*, 6: *L. ervoides*, 7: *L. lamottei*, 8: *L. tomentosus*)



Şekil 4.3. CULC 404, CULB 112, CULC 311 ve CULB 301 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü (1ve 2: *L. culinaris* subsp. *culinaris*, 3: *L. odemensis*, 4: *L. orientalis*, 5: *L. nigricans*, 6: *L. ervoides*, 7: *L. lamottei*, 8: *L. tomentosus*)



Şekil 4.4. CULD 6, CULB 407, CULC 414 ve CULC 409 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü (1ve 2: *L. culinaris* subsp. *culinaris*, 3: *L. odemensis*, 4: *L. orientalis*, 5: *L. nigricans*, 6: *L. ervoides*, 7: *L. lamottei*, 8: *L. tomentosus*)



Şekil 4.5. CULC 302, CULB 423, CULC 410 ve CULB 418 primerlerinin tarama sonuçlarına ait jel görüntüsü (1ve 2: *L. culinaris* subsp. *culinaris*, 3: *L. odemensis*, 4: *L. orientalis*, 5: *L. nigricans*, 6: *L. ervoides*, 7: *L. lamottei*, 8: *L. tomentosus*)

Çizelge 4.1. 121 SSR Primerine Ait Tarama Sonuçları

PRİMER ADI	MERCİMEK TAKSONU							
	CUL1	CUL2	ODE	ORI	NIG	ERV	LAM	TOM
CULA3	+	+	-	+	-	+	-	+
CULA7	+	-	-	-	-	-	+	+
CULA8	+	-	-	+	-	-	-	-
CULA9	+	+	-	+	-	-	-	-
CULA10	+	+	-	-	-	-	-	+
CULB3	+	+	+	+	+	-	+	+
CULB9	+	+	+	+	-	+	+	+
CULB11	+	+	+	+	-	-	+	+
CULC10	+	+	+	+	-	+	+	+
CULC11	+	+	+	+	+	+	-	-
CULD6	+	+	-	+	+	-	-	+
CULA103	+	+	+	+	-	-	-	-
CULA107	+	+	+	+	+	+	+	+
CULA109	+	+	-	+	-	-	+	+
CULA111	+	+	+	+	+	+	+	+
CULA114	+	+	+	+	+	+	+	+
CULA116	+	+	-	+	-	-	-	+
CULA119	+	+	+	+	-	-	-	+
CULA121	+	+	-	+	-	+	+	+
CULA123	+	+	-	+	-	-	-	+
CULB106	+	-	-	+	-	-	-	-
CULB107	+	+	+	+	-	+	-	-
CULB112	+	+	-	+	-	-	-	-
CULB113	+	+	-	+	-	+	-	+
CULB115	+	+	+	+	-	+	+	+
CULB117	+	+	+	+	-	+	+	+
CULB118	+	+	-	+	+	+	+	+
CULC102	+	+	+	+	-	-	+	+
CULC104	+	+	+	+	+	+	+	+
CULC112	+	+	-	+	-	-	-	-
CULC115	+	+	-	+	-	+	-	+
CULC116	+	+	-	-	-	-	-	-
CULD101	+	+	+	+	-	+	+	+
CULD102	+	+	-	+	-	-	-	-
CULD103	+	+	+	+	+	+	+	+
CULD116	+	+	+	+	-	-	-	-
CULD123	+	+	-	+	-	-	-	-
CULA211	+	-	-	+	-	-	+	+
CULA219	+	+	-	+	+	+	+	+
CULA220	+	+	+	+	+	-	-	-
CULA224	+	+	+	+	-	-	-	+
CULB201	+	+	+	-	+	-	-	+
CULB205	+	+	-	-	-	-	-	-
CULB206	+	+	+	+	-	-	+	+
CULB207	+	+	-	-	-	+	-	+
CULB216	+	+	+	+	-	+	+	+
CULB218	+	-	-	-	-	-	-	-
CULB223	+	+	+	+	+	+	+	+
CULC204	+	+	+	+	-	+	+	+
CULC207	+	+	+	+	-	-	+	+
CULC211	+	+	-	+	-	-	-	+
CULC215	+	+	-	+	-	-	-	-
CULC218	+	+	-	+	-	-	-	+
CULC221	+	+	-	+	+	+	-	+
CULD206	+	+	+	+	-	+	+	+
CULD213	+	+	-	-	-	-	-	+
CULA301	+	+	-	+	-	-	-	-
CULA305	+	+	-	+	+	-	-	+
CULA308	+	+	+	+	+	-	+	+

Çizelge 4.1.'in devamı

MERCİMEK TAKSONU								
PRİMER ADI	CUL1	CUL2	ODE	ORI	NIG	ERV	LAM	TOM
CULA312	+	+	-	+	-	-	-	+
CULA313	+	-	-	-	-	-	-	-
CULA317	+	+	+	-	+	+	+	+
CULA321	+	+	-	+	+	-	-	+
CULA323	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB301	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB302	+	+	+	+	-	+	+	+
CULB305	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB306	+	+	-	-	-	-	-	-
CULB308	+	+	+	+	-	-	+	+
CULB310	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB313	+	+	+	-	-	+	+	-
CULB118	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB322	+	+	+	+	-	-	+	-
CULC302	+	+	-	+	-	-	-	+
CULC306	+	+	+	+	+	+	+	+
CULC311	+	+	+	+	+	+	+	+
CULD303	+	+	+	+	+	+	+	+
CULD308	+	-	-	+	+	-	-	-
CULD309	+	+	+	+	+	+	+	+
CULD316	+	+	-	+	-	-	-	+
CULD324	+	+	+	+	-	+	+	+
CULA401	+	+	-	-	-	+	-	+
CULA402	+	+	+	+	+	+	+	+
CULA405	+	+	+	+	+	+	+	+
CULA412	+	+	+	+	+	+	+	+
CULA421	+	+	-	-	-	-	-	-
CULB402	+	+	-	-	-	-	-	-
CULB407	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB410	+	+	-	-	-	-	-	+
CULB414	+	+	+	+	-	-	+	-
CULB416	+	+	-	+	-	-	-	+
CULB418	+	+	-	+	-	+	+	-
CULB419	+	+	-	+	-	-	-	-
CULB420	+	+	+	+	+	+	+	+
CULB423	+	-	-	+	-	-	-	-
CULC404	+	+	-	+	-	-	-	-
CULC407	+	+	-	+	-	-	-	-
CULC409	+	+	-	-	-	-	-	-
CULC410	+	+	+	+	+	+	+	+
CULC414	+	+	-	+	-	-	-	-
CULC422	+	+	+	+	+	+	+	+
CULD409	+	+	+	+	-	-	-	-
SSR-19	+	+	-	+	-	-	-	+
SSR-48	+	+	-	+	-	+	+	+
SSR-80	+	+	-	+	-	+	-	+
SSR-130	+	+	-	+	-	-	-	+
SSR-96	+	+	+	+	-	+	+	+
SSR-107	+	+	+	+	-	+	+	+
SSR-113	+	+	-	+	-	-	-	-
SSR-119	+	+	-	+	-	-	-	+
SSR-323	+	+	-	+	+	-	-	-
SSR-32	+	+	+	+	-	-	+	+
SSR-33	+	+	-	+	-	-	-	+
SSR-99	+	+	+	+	-	+	+	+
SSR-167	+	+	-	+	-	-	-	-
SSR-212	+	+	+	+	-	+	+	+
SSR-213	+	+	-	-	-	-	-	-
SSR-124	+	+	-	+	-	-	-	+
SSR-204	+	+	+	+	+	+	+	+
SSR-336	+	+	-	+	+	+	+	+
SSR-156	+	+	-	+	-	-	-	+

CUL1 ve CUL2: *Lens culinaris* subsp. *culinaris* türüne ait genotipler, ODE: *L. odemensis*, ORI: *L. culinaris* subsp. *orientalis*, NIG: *L. nigricans*, ERV: *L. ervoides*, LAM: *L. lamottei*, TOM: *L. tomentosus*

Taramadan elde edilen sonuçlar ile mercimeğe özgü her bir SSR markörünün yabancı mercimek türlerine aktarılabilirlik oranları da belirlenmiştir (Çizelge 4.2.). SSR analizlerinden elde edilen PCR ürünlerinin, bantların durumuna göre 3 gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Bunlar; 1) Net ve temiz bant (+++), 2) Güçlü fakat ikili bant (++) ve 3) Zayıf bant (+)'dır. 121 SSR primerinden 41 SSR primerinin 1. grupta, 14 SSR primerinin 2. grupta ve 57 SSR primerinin 3. grupta yer aldığı, 9 SSR primerinin ise yabancı mercimek türlerinde hiç bant üretmediği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, 121 SSR primerinden 59 SSR primerinin (%48.7) *L. odemensis*'de, 103 SSR primerinin (%85.1) *L. culinaris* subsp. *orientalis*'de, 38 SSR primerinin (%31.4) *L. nigricans*'da, 54 SSR primerinin (%44.6) *L. ervoides*'de, 57 SSR primerinin (%47.1) *L. lamottei*'de ve 84 SSR primerinin (%69.4) *L. tomentosus*'da PCR ürünü verdiği saptanmıştır. Mercimeğe özgü SSR markörlerinin aktarılabilirlik oranının *L. culinaris* subsp. *orientalis* türünde en yüksek (%85.1) ve *L. nigricans* türünde en düşük (%31.4) olduğu bulunmuştur. 9 SSR primerinin *L. culinaris* subsp. *culinaris* dışında hiçbir türde çalışmadığı ve 23 SSR primerinin ise mercimeğin bütün türlerinde de çalıştığı saptanmıştır. Sadece yabancı türler göz önüne alındığında, 19 SSR primerinin bazı yabancı türlere özgü olduğu bulunmuştur. Bu 19 SSR primerinden, 3 SSR primeri (CULA10, CULD213 ve CULB410) sadece *L. tomentosus*'da çoğalırken, 16 SSR primeri ise sadece *L. culinaris* subsp. *orientalis*'de amplifikasyon göstermiştir.

Mercimeğe özgü 121 SSR markörü yabancı mercimek türlerine aktarılabilirlik bakımından değerlendirildiğinde, 23 primerin aktarılabilirlik oranı %100 (6 yabancı türde çoğalma gösteren), 20 primerin aktarılabilirlik oranı %83.3 (5 yabancı türde çoğalma gösteren), 10 primerin aktarılabilirlik oranı %66.6 (4 yabancı türde çoğalma gösteren), 19 primerin aktarılabilirlik oranı %50 (3 yabancı türde çoğalma gösteren), 21 primerin aktarılabilirlik oranı %33.3 (2 yabancı türde çoğalma gösteren) ve 19 primerin aktarılabilirlik oranı %16.6 (1 yabancı türde çoğalma gösteren) olarak bulunmuştur. 121 SSR primerinin yabancı türlere aktarılabilirlik oranı ortalama %58.3 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Mercimeğe özgü SSR primerlerinin yabancı mercimek türlerinde aktarılabirlik oranları

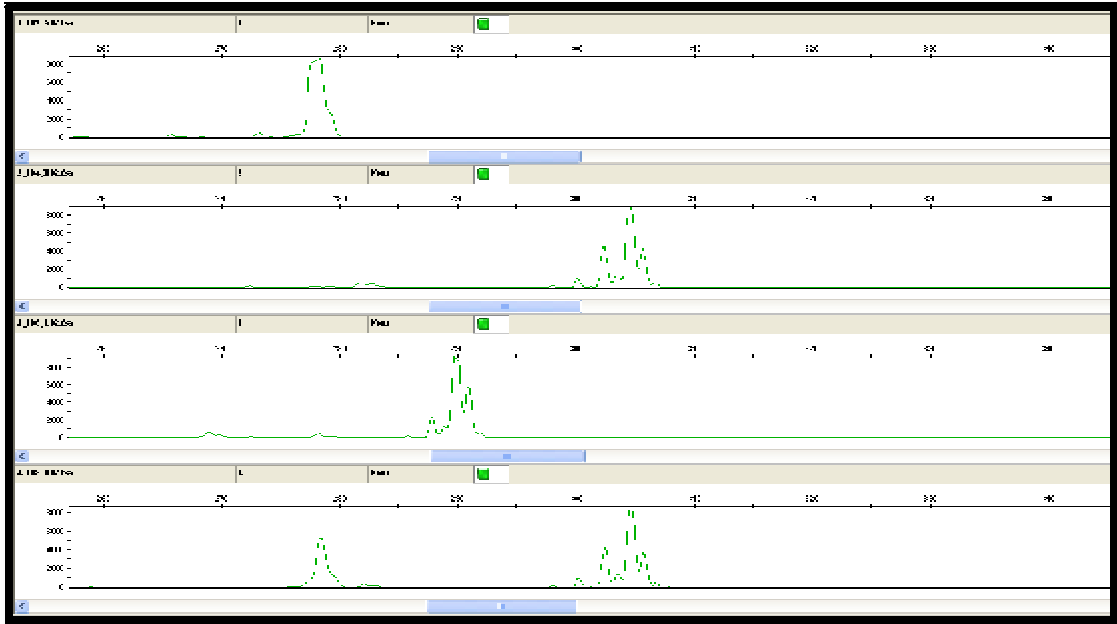
Markör	Kalite	A.o. %	Markör	Kalite	A.o. %	Markör	Kalite	A.o. %
CULA3	+++	50.0	CULB206	+	66.6	CULB402	-	-
CULA7	+	50.0	CULB207	+	33.3	CULB407	+++	100
CULA8	+	16.6	CULB216	+	83.3	CULB410	+	16.6
CULA9	+	16.6	CULB218	-	-	CULB414	+	50.0
CULA10	+	16.6	CULB223	+	100	CULB416	+++	33.3
CULB3	+	83.3	CULC204	+	83.3	CULB418	+	50.0
CULB9	++	83.3	CULC207	+	66.6	CULB419	+	16.6
CULB11	+	66.6	CULC211	++	33.3	CULB420	+++	100
CULC10	+	83.3	CULC215	+++	16.6	CULB423	+++	16.6
CULC11	+	66.6	CULC218	+++	33.3	CULC404	+++	16.6
CULD6	+++	50.0	CULC221	+++	66.6	CULC407	+	16.6
CULA103	+	33.3	CULD206	+	83.3	CULC409	-	-
CULA119	+	50.0	CULA313	-	-	SSR-48	+++	66.6
CULA121	+++	66.6	CULA317	+	83.3	SSR-80	+++	50
CULA123	+++	33.3	CULA321	+	50.0	SSR-130	+++	33.3
CULB106	+	16.6	CULA323	+++	100	SSR-96	++	83.3
CULB107	+	50.0	CULB301	+	100	SSR-107	+++	83.3
CULB112	+++	16.6	CULB302	+++	83.3	SSR-113	+	16.6
CULB113	+	50.0	CULB305	+++	100	SSR-119	+++	33.3
CULB115	+	83.3	CULB306	-	-	SSR-323	+++	33.3
CULB117	+	83.3	CULB308	+	66.6	SSR-32	+++	66.6
CULA107	+	100	CULD213	+	16.6	CULC410	+++	100
CULA109	+++	50.0	CULA301	+++	16.6	CULC414	+++	16.6
CULA111	++	100	CULA305	+	50.0	CULC422	+++	100
CULA114	++	100	CULA308	++	83.3	CULD409	+	33.3
CULA116	+++	33.3	CULA312	+	33.3	SSR-19	+++	33.3
CULB118	+	83.3	CULB310	+	100	SSR-33	+++	33.3
CULC102	+	66.6	CULB313	+++	50.0	SSR-99	+++	83.3
CULC104	+	100	CULB118	+++	100	SSR-167	+	16.6
CULC112	++	16.6	CULB322	+	50.0	SSR-212	+++	83.3
CULC115	+	50.0	CULC302	+++	33.3	SSR-213	-	-
CULC116	-	-	CULC306	+	100	SSR-124	+	33.3
CULD101	+	83.3	CULC311	++	100	SSR-204	++	100
CULD102	+++	16.6	CULD303	+++	100	SSR-336	++	83.3
CULD103	++	100	CULD308	+++	33.3	SSR-156	+	33.3
CULD116	+	33.3	CULD309	+++	100			
CULD123	+++	16.6	CULD316	+	33.3			
CULA211	++	50.0	CULD324	+	83.3			
CULA219	+	83.3	CULA401	+	33.3			
CULA220	++	50.0	CULA402	++	100			
CULA224	+	50.0	CULA405	+	100			
CULB201	+	50.0	CULA412	+	100			
CULB205	-	-	CULA421	-	-			

A.o. : Primerin diğer türlere aktarılabirlik oranı, +:zayıf bant, ++: temiz ve ikili bant, +++: temiz ve net bant

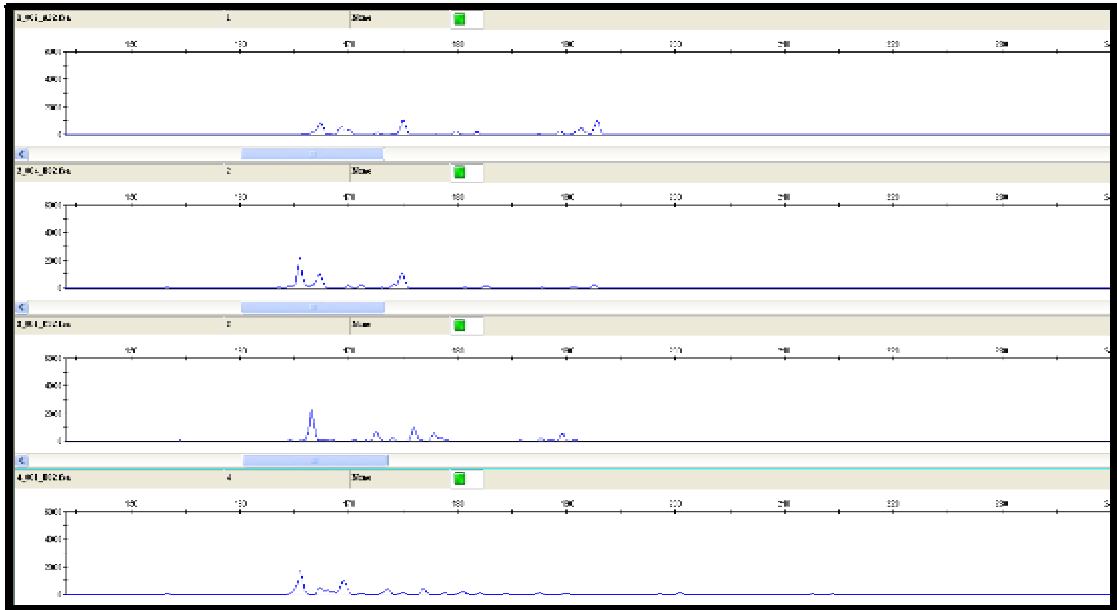
Weber (1990) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre, mikrosatellitler 3 gruba ayrılmaktadır: 1) mükemmel tekrarlar, 2) mükemmel olmayan tekrarlar ve 3) Birleşik tekrarlar. Bu sınıflandırma göz önünde bulundurularak; aktarılabilirlik oranı en yüksek olan 23 SSR primerinden 10 SSR primerinin dinükleotid, 8 SSR primerinin ise trinükleotid tekrarlar içerdiği ve 2 SSR primerinin birleşik SSR motifine, 3 SSR primerinin ise mükemmel olmayan SSR motifine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aktarılabilirlik oranı en düşük olan 19 SSR primerinden 7 SSR primerinin dinükleotid, 6 SSR primerinin ise trinükleotid tekrarlar içerdiği ve 2 SSR primerinin birleşik SSR motifine, 4 SSR primerinin ise mükemmel olmayan SSR motifine sahip olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.2. SSR Primerlerinin ABI 3130xl Genetik Analizör Cihazında Taranması**

Agaroz jel elektroforezi sonrasında elde edilen tarama sonuçlarına göre en temiz profile sahip olan 53 SSR primeri seçilmiştir. Bu 53 primer, dört genotip kullanılarak ve farklı PCR programları denenerek ABI cihazında da taranmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Tarama sonucunda, en temiz profile sahip olan 20 primer ve bu primerler için en uygun PCR programları seçilmiştir. Bu primerler ile ilgili bilgiler Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Seçilen PCR programlarının koşulları bölüm 3.3.4.'te belirtilmiştir.



Şekil 4.6. CULB310 primerinin TD-3 programında verdiği elektroforegram görüntüsü



Şekil 4.7. CULB117 primerinin BS programında verdiği elektroforegram görüntüsü

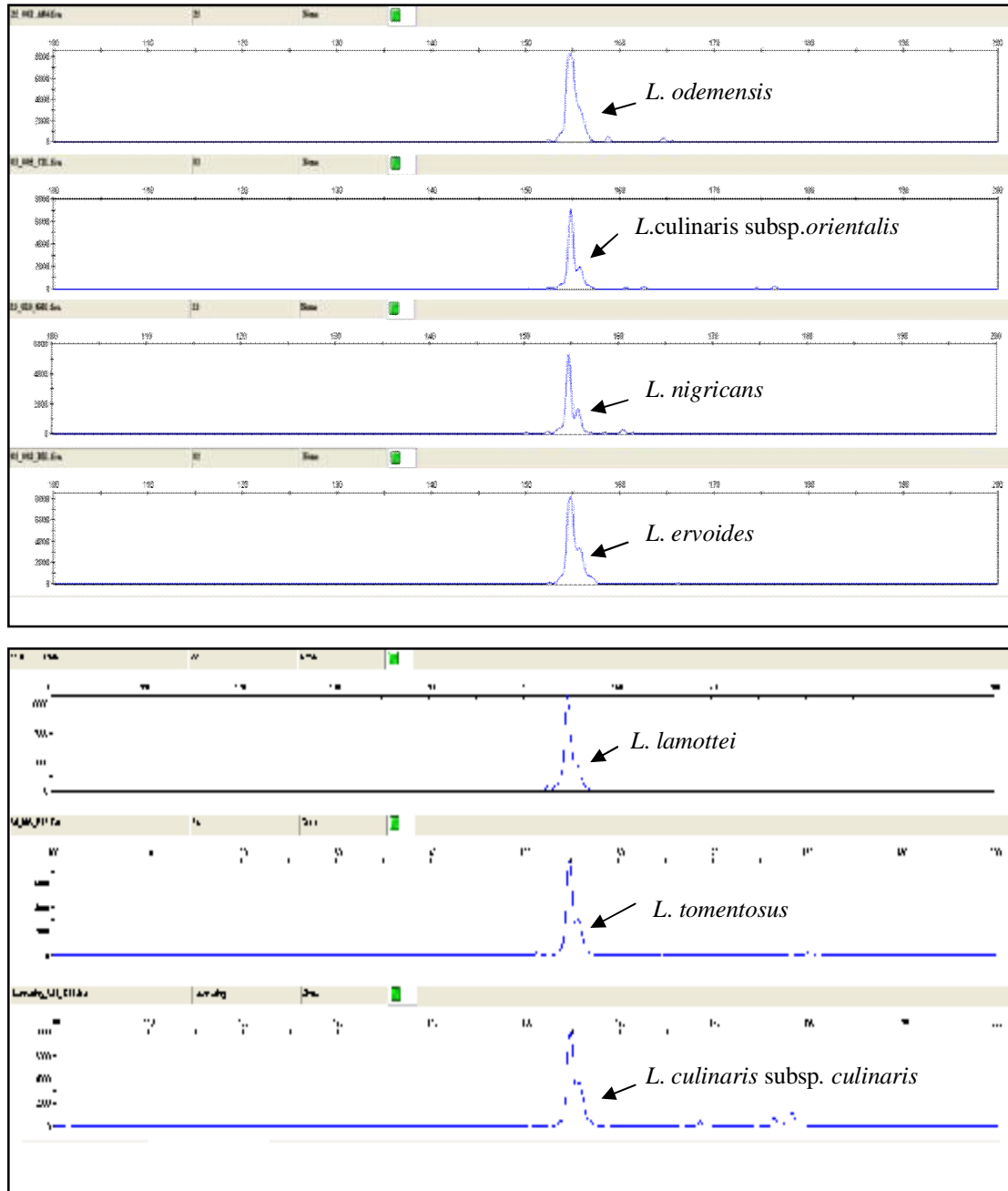
Çizelge 4.3. Genetik Çeşitlilik Analizlerinde Kullanılan 20 SSR Primeri

Primer	İleri (İ) ve Geri (G) Baz Dizisi	PPA	BBU (bp)	Tekrar Motifi
CULA111	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTAATAGGATTGTATGGCAAGATC G:GGACATGACCGTTTATTTATTC	60	158	(CA) <sub>11</sub>
CULC 422	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTTAAAAATGACATGGCATGAGTTG G: TGCATCAATAACAACAACATCC	TD-1	225	(TGT) <sub>4</sub>
CULC 311	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCTACTGTAGCCTAAATTGAG G: CTTGACATGCAACAACACAA	TD-1	252	(TGT) <sub>4</sub>
CULA 402	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTAAGCATAGACAGAAGCAAAAATG G: GGTCATGTGGTGTAGACTTTC	TD-1	284	(AC) <sub>10</sub>
CULB 223	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTTCACCTCTTGTGGTGCATAC G: TTCATGTGATCGTGGGAATAT	TD-1	154	(AG) <sub>15</sub>
CULB 420	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTAACGGTCTGTGAATCATCAAC G: AGCCACCTGGAGAGTGTAC	TD-1	205	(TC) <sub>16</sub>
CULD 303	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTCTACCCATTACAGAAAATC G: GGTGAGCTGCTTAATAATACG	TD-1	300	(TCA) <sub>5</sub>
CULA 114	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCACAGCCATGCTTTAC G: TATCGTATGGGGTTGTGTAATC	TD-1	263	(AC) <sub>11</sub> (AT) <sub>9</sub>
CULA 107	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTTTGGTTGACAAGATCACAATC G: CTCGTCACGGTAATCTATCATC	TD-3	291	(CA) <sub>7</sub> (CG) <sub>2</sub> (CA) <sub>7</sub>
CULD 309	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCATGAATTTATGTTGAGTTG G: ATACCCCTCTTAGGCAGGAG	TD-3	235	(GTT) <sub>5</sub>
CULA 308	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTATTTGGAGTGCAAGTAACCTAC G: CCTGAACACACGAACATTG	TD-5	242	(TC) <sub>20</sub> A(CA) <sub>6</sub>
CULA 119	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTAACAAGCTGCAACAAACTTG G: TGCAACAAAGACCTTTTATCC	TD-3	110	(AC) <sub>12</sub>
CULD 206	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTCGGATGGTAATTGATTAGTG G: CCACAAAACCTCTCATCG	TD-5	215	(GAT) <sub>9</sub>
CULB 9	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTACGTGGTGAAACTTTTGG G: TGGGATTTGTTTTGAGAAG	TD-5	200	(CT) <sub>24</sub>
CULB 301	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTATGCTCTCTCCGAGGTC G: GGACATAGCCTTCAGGGTTTAG	TD-3	297	(CT) <sub>31</sub>
CULB 118	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTCTCTCGTGGGATTCATAC G: GAAAAGGGGGATGTGTTAG	TD-2	125	(CT) <sub>23</sub>
CULA 219	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTAAATCCCTCAAGTGTATTATGTG G: TAACCCTATCCCTTTACAACC	TD-5	166	(AC) <sub>15</sub>
CULA 323	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTGTCTCTGACAATTCTTGAAGTC G: AGGCTTGAAAACATGCTTT	TD-5	187	(CA) <sub>9</sub>
CULC 410	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTAGAAGGAATTACGGTGAGTGG G: GCTGTGTAACGCTCCATCTAA	TD-3	245	(TGT) <sub>5</sub>
CULD 324	İ:TGTA AAAACGACGGCCAGTGACCGAAGTCTCAACATG G: ACGTGTAGGGATGATATGTC	TD-3	225	**

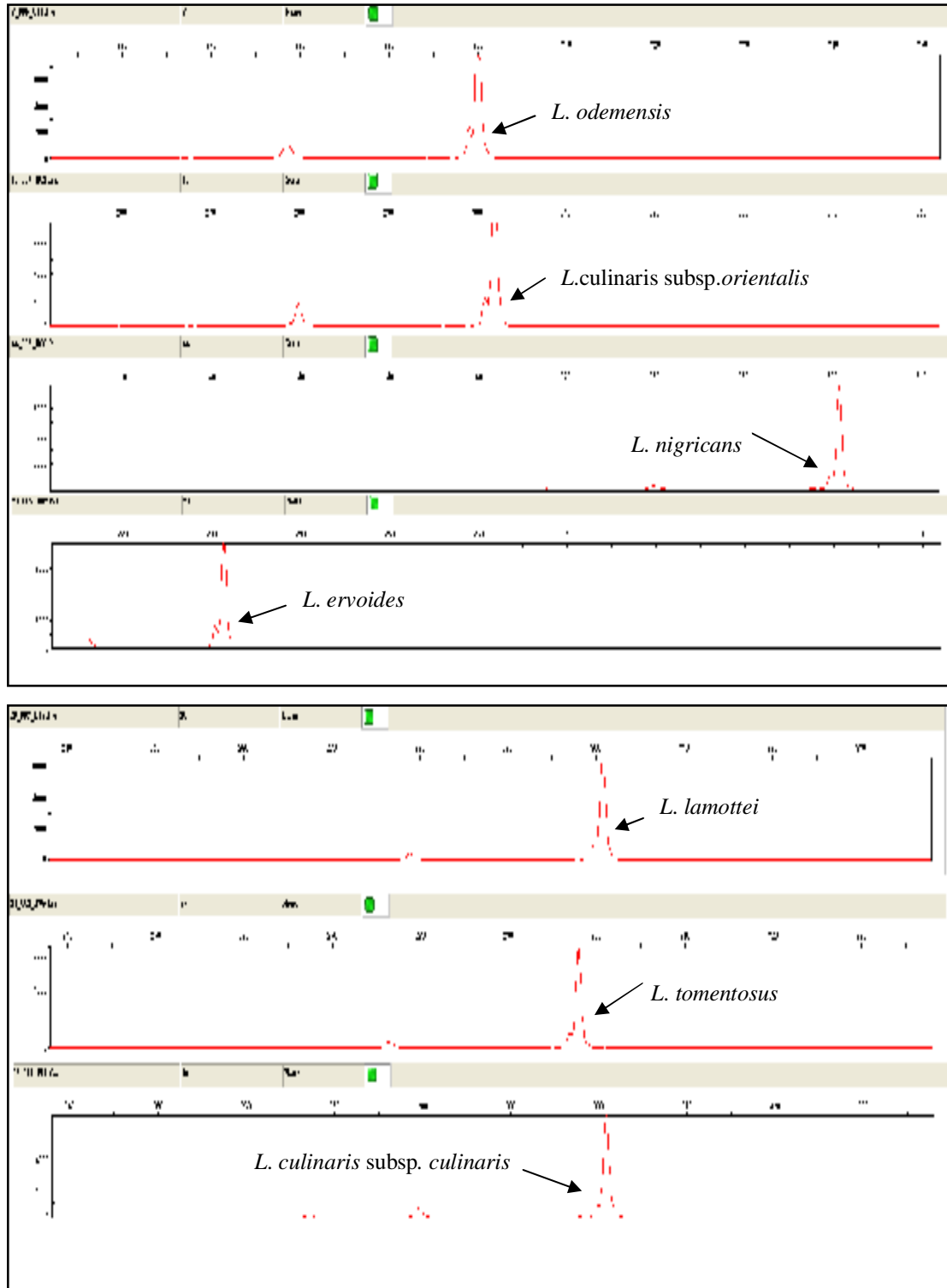
PPA: PCR Program Adı, BBU: Karacadağ çeşitinde Beklenen Bant Uzunluğu, \*\*: (CAT)<sub>3</sub>&(CAT)<sub>3</sub>&(CAT)<sub>3</sub>

#### 4.3. SSR Primerlerinin 170 Mercimek Genotipinde Analiz Edilmesi

ABI 3130xl genetik analizör cihazında gerçekleştirilen primer tarama işlemi sonucunda seçilen 20 SSR primeri, mercimeğin kültür türüne ait 40 ve yabancı türlerine ait 130 genotipte kullanılarak hem genetik çeşitlilik belirlenmeye çalışılmış hem de filogenetik analizler yapılmıştır. SSR analizleri ile ilgili bilgiler bölüm 3.3.4.'te verilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen veriler GeneMapper paket programı kullanılarak görüntülenmiş (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.) ve her bir primer için ürettikleri allellerin büyüklükleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. CULB 223 primerinin sırasıyla, *L. odemensis*, *L. culinaris* subsp. *orientalis*, *L. nigricans*, *L. ervoides*, *L. lamottei*, *L. tomentosus* ve *L. culinaris* subsp. *culinaris* türlerine ait birer genotipte verdiği elektroforegram görüntüsü



Şekil 4.9. CULD303 primerinin sırasıyla, *L. odemensis*, *L. orientalis*, *L. nigricans*, *L. ervoides*, *L. lamottei*, *L. tomentosus* ve *L. culinaris* türlerine ait birer genotipte verdiği elektroforegram görüntüsü

Her bir genotip için, analizde kullanılan 20 SSR primerinin ürettiği allel büyüklükleri belirlendikten sonra, PowerMarker 3.0 V (Liu ve Muse, 2004) paket programı kullanılarak her bir tür için ayrı ayrı olacak şekilde primerlere ait polimorfizm bilgi içeriği (PBİ), genetik çeşitlilik indeksi (GÇİ), heterozigotluk oranı (Hto) ve allel sayıları (AS) belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Bütün türler birlikte değerlendirildiğinde 20 SSR primerinden 14 SSR primerinin polimorfik, 6 SSR primerinin ise monomorfik olduğu bulunmuştur. Analizlerden elde edilen verilere göre; bütün lokuslardan elde edilen toplam allel sayısı 223 olarak bulunmuş olup bu allellerden 217 tanesinin polimorfik olduğu saptanmıştır. PBİ değeri 0.14 (CULD324) ile 0.94 (CULB301) arasında değişirken, ortalama PBİ değeri 0.72 olarak bulunmuştur. Polimorfik markörlerden elde edilen allel sayısı 2 (CULC422) ile 32 (CULA308) arasında değişirken, ortalama allel sayısı 15,5 olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm CULA308 (32) marköründe, en düşük polimorfizm ise CULC422 (2) marköründe saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar türler bazında değerlendirildiğinde, *L. odemensis* türü için, 6 primerin polimorfik olduğu ve bu primerlerin CULA107, CULA308, CULA119, CULB9, CULB301 ve CULA323 primerleri olduğu tespit edilmiştir. *L. odemensis* türü için en polimorfik primerin ise 12 allel üreten CULB9 olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.4. 20 SSR markörünün 170 mercimek genotipinde analizi sonucunda, 14 polimorfik SSR marköründen elde edilen değerler

Markör	<i>L. culinaris</i> (n=40)				<i>L. orientalis</i> (n=45)				<i>L. migricans</i> (n=35)				<i>L. ervoides</i> (n=19)			
	AS	GÇİ	Ht	PBİ	AS	GÇİ	Ht	PBİ	AS	GÇİ	Ht	PBİ	AS	GÇİ	Ht	PBİ
CULC422	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
CULD303	2.00	0.22	0.00	0.20	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.47	0.00	0.36
CULD324	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	1.00	3.00	0.41	0.00	0.36
CULA107	3.00	0.39	0.00	0.36	5.00	0.68	0.02	0.62	1.00	0.00	0.00	0.00	8.00	0.75	0.00	0.72
CULD309	2.00	0.05	0.00	0.05	2.00	0.23	0.00	0.20	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.44	0.00	0.35
CULA308	15.00	0.90	0.00	0.89	22.00	0.94	0.00	0.93	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	1.00
CULA119	7.00	0.66	0.00	0.63	9.00	0.78	0.00	0.75	0.00	1.00	NaN	1.00	0.00	1.00	NaN	1.00
CULD206	5.00	0.62	0.00	0.57	5.00	0.68	0.05	0.62	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.13	0.00	0.12
CULB9	13.00	0.90	0.00	0.89	16.00	0.91	0.00	0.90	0.00	1.00	NaN	1.00	2.00	0.27	0.00	0.23
CULB301	18.00	0.92	0.00	0.92	16.00	0.91	0.00	0.91	11.00	0.88	0.00	0.86	10.00	0.84	0.00	0.82
CULB118	11.00	0.84	0.00	0.83	14.00	0.89	0.00	0.88	5.00	0.59	0.00	0.54	9.00	0.85	0.00	0.84
CULA219	9.00	0.84	0.00	0.82	9.00	0.84	0.09	0.82	2.00	0.06	0.00	0.06	2.00	0.32	0.00	0.27
CULA323	5.00	0.65	0.00	0.59	9.00	0.80	0.00	0.77	1.00	0.00	0.00	0.00	8.00	0.74	0.06	0.71
CULC410	4.00	0.49	0.00	0.41	5.00	0.64	0.00	0.58	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00
Toplam	94				115				26				50			
Ortalama	7.83	0.62	0.00	0.59	10.45	0.75	0.01	0.72	8.66	0.51	0.00	0.48	5.00	0.52	0.006	0.47

Çizelge 4.4.'ün devamı

Markör	<i>L. lamottei</i> (n=5)				<i>L. tomentosus</i> (n=5)				<i>L. odemensis</i> (n=21)				Bütün türler (n=170)			
	AS	GÇİ	Ht	PBİ	AS	GÇİ	Ht	PBİ	AS	GÇİ	Ht	PBİ	AS	GÇİ	Ht	PBİ
CULC422	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.33	0.00	0.27
CULD303	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.48	0.00	0.36	1.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.50	0.00	0.45
CULD324	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.14	0.00	0.14
CULA107	2.00	0.48	0.00	0.36	1.00	0.00	0.00	0.00	3.00	0.58	0.00	0.49	17.00	0.87	0.01	0.86
CULD309	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.67	0.00	0.62
CULA308	3.00	0.64	0.00	0.56	1.00	0.00	0.00	0.00	3.00	0.36	0.00	0.33	32.00	0.85	0.00	0.84
CULA119	0.00	1.00	NaN	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.34	0.06	0.28	11.00	0.84	0.01	0.82
CULD206	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	13.00	0.83	0.01	0.81
CULB9	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	12.00	0.86	0.05	0.85	27.00	0.94	0.01	0.93
CULB301	2.00	0.50	0.00	0.38	1.00	0.00	0.00	0.00	9.00	0.85	0.00	0.83	30.00	0.95	0.00	0.94
CULB118	1.00	0.00	0.00	0.00	3.00	0.56	0.00	0.50	1.00	0.00	0.00	0.00	26.00	0.91	0.00	0.91
CULA219	2.00	0.48	0.00	0.36	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	NaN	1.00	14.00	0.86	0.03	0.85
CULA323	2.00	0.48	0.00	0.36	1.00	0.00	0.00	0.00	6.00	0.75	0.00	0.71	21.00	0.88	0.01	0.87
CULC410	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	11.00	0.82	0.00	0.80
Toplam	11				5				42				217			
Ortalama	2.20	0.51	0.00	0.40	2.50	0.52	0.00	0.43	7.00	0.62	0.01	0.58	15.5	0.74	0.005	0.72

*L. culinaris* subsp. *orientalis* türü için, 11 primer polimorfik bulunmuş olup, CULA107, CULD309, CULA308, CULA119, CULD206, CULB9, CULB301, CULB118, CULA219, CULA323 ve CULC410 primerleri olduğu tespit edilmiştir. En polimorfik primerin de 22 allel üreten CULA308 primeri olduğu tespit edilmiştir.

*L. nigricans* türü için, CULB301, CULB118 ve CULA219 primerlerinin polimorfik olduğu ve en polimorfik primerin 11 allel üreten CULB301 olduğu belirlenmiştir.

*L. ervoides* türü için, 10 primerin polimorfik olduğu ve bu primerlerin CULD303, CULD324, CULA107, CULD309, CULD206, CULB9, CULB301, CULB118, CULA219 ve CULA323 olduğu belirlenmiştir. En polimorfik primerin ise 9 allel üreten CULB118 olduğu tespit edilmiştir.

*L. lamottei* türü için, CULA107, CULA308, CULB301, CULA219 ve CULA323 primerlerinin polimorfik olduğu ve en polimorfik primerin 3 allel üreten CULA308 primeri olduğu saptanmıştır. *L. tomentosus* türü için, CULD303 ve CULB118 primerlerinin polimorfik olduğu ve en polimorfik primerin 3 allel üreten CULB118 primeri olduğu belirlenmiştir.

*L. culinaris* subsp. *culinaris* türü için, CULD303, CULA107, CULD309, CULA308, CULA119, CULD206, CULB9, CULB301, CULB118, CULA219, CULA323 ve CULC410 primerlerinin polimorfik olduğu ve en polimorfik primerin 18 allel üreten CULB301 primeri olduğu belirlenmiştir.

En çok allel *L. culinaris* subsp. *orientalis* (115) türünde gözlenmiştir ve bu türü sırasıyla *L. culinaris* subsp. *culinaris* (94), *L. ervoides* (50), *L. odemensis* (42), *L. nigricans* (26) ve *L. lamottei* (11) türleri izlemiştir. En az allel ise 5 allel ile *L. tomentosus* türünde tespit edilmiştir. SSR markörlerinin gösterdiği allelik varyasyon türlere göre değişiklik göstermiştir. Örneğin; CULA308 markörü, *L. culinaris* subsp. *culinaris* türünde 15, *L. culinaris* subsp. *orientalis* türünde 22 allel üretirken, *L. lamottei* ve *L. odemensis* türlerinde 3, *L. tomentosus* ve *L. nigricans* türlerinde 1 allel üretmiştir. Aynı markörün *L. ervoides* türünde amplifikasyon göstermediği saptanmıştır. Analizler sonucunda, 20 SSR marköründen 13'ünün türlere özgü bazı alleller ürettiği tespit edilmiştir. Lokuslar ve türlere özgü alleler Çizelge 4.5'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.5. Türler özgül alleller üreten SSR markörleri ve bu markörlerin ürettikleri allel büyüklükleri (bp)

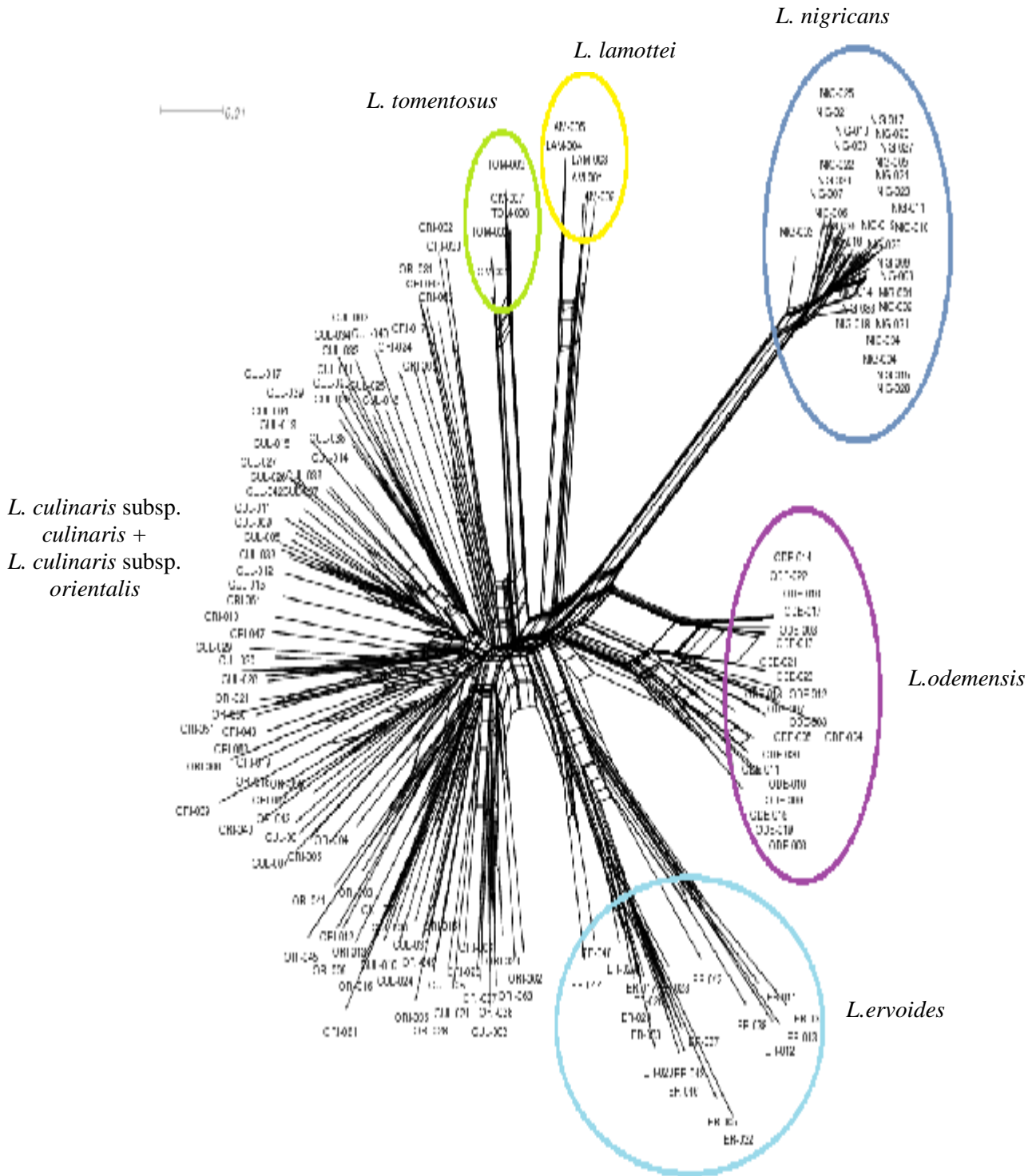
LOKUS	ALLEL (bp)	TÜR
CULC422	223	<i>L. nigricans</i>
CULD303	232	<i>L. nigricans</i>
CULD303	298	<i>L. tomentosus</i>
CULD324	242	<i>L. lamottei</i>
CULD324	230, 244	<i>L. ervoides</i>
CULA107	285, 301	<i>L. orientalis</i>
CULA107	287, 291, 295	<i>L. odemensis</i>
CULA107	317, 323, 331, 333, 335, 343	<i>L. ervoides</i>
CULA107	329	<i>L. nigricans</i>
CULA308	219, 223	<i>L. odemensis</i>
CULA308	232, 234, 264, 276, 278, 280, 284, 292, 294, 296, 298	<i>L. orientalis</i>
CULA308	236, 240, 242	<i>L. lamottei</i>
CULA308	250, 256, 270, 288	<i>L. culinaris</i>
CULA119	114	<i>L. odemensis</i>
CULA119	138, 142	<i>L. orientalis</i>
CULD206	215	<i>L. odemensis</i>
CULD206	216	<i>L. nigricans</i>
CULD206	218	<i>L. lamottei</i>
CULD206	225, 227	<i>L. ervoides</i>
CULD206	228, 231, 249	<i>L. orientalis</i>
CULD206	240, 243	<i>L. culinaris</i>
CULB9	178, 180, 192, 200	<i>L. odemensis</i>
CULB9	197	<i>L. ervoides</i>
CULB9	199	<i>L. lamottei</i>
CULB9	208	<i>L. culinaris</i>
CULB9	220, 234	<i>L. orientalis</i>
CULB9	223	<i>L. tomentosus</i>
CULB301	270	<i>L. nigricans</i>
CULB301	285, 289	<i>L. lamottei</i>
CULB301	300	<i>L. ervoides</i>
CULB301	304, 308, 326, 330	<i>L. culinaris</i>
CULB301	314	<i>L. orientalis</i>
CULB301	320	<i>L. odemensis</i>
CULB301	321	<i>L. tomentosus</i>
CULB118	99, 121, 123	<i>L. nigricans</i>
CULB118	126	<i>L. ervoides</i>
CULB118	130, 136	<i>L. orientalis</i>
CULB118	134, 144, 146	<i>L. culinaris</i>
CULA219	164	<i>L. nigricans</i>
CULA219	182, 186	<i>L. lamottei</i>
CULA219	184	<i>L. culinaris</i>
CULA219	195	<i>L. orientalis</i>
CULA323	168	<i>L. nigricans</i>
CULA323	183, 185, 187	<i>L. odemensis</i>
CULA323	196, 198	<i>L. lamottei</i>
CULA323	208, 210, 212, 218, 224, 226	<i>L. ervoides</i>
CULA323	211, 213, 215	<i>L. orientalis</i>
CULC410	176	<i>L. lamottei</i>
CULC410	200	<i>L. nigricans</i>
CULC410	261	<i>L. tomentosus</i>
CULC410	273	<i>L. ervoides</i>
CULC410	280	<i>L. culinaris</i>
CULC410	281	<i>L. odemensis</i>

Genetik çeşitlilik indeksi yabancı türlerde 0.06 (*L. nigricans*'da, CULA219 markörü için) ile 0.94 (*L. orientalis*'de, CULA308 markörü için) arasında değişmiş olup ve ortalama G.Ç.İ. değeri 0.57 olarak hesaplanmıştır. Kültür türü olan *L. culinaris*'de ise bu değer 0.05 (CULD309 markörü için) ile 0.92 (CULB301 markörü için) arasında bulunmuş ve ortalama G.Ç.İ değeri 0.62 olarak hesaplanmıştır. Her bir tür için genetik çeşitlilik karşılaştırıldığında, en yüksek genetik çeşitlilik *L. orientalis* (ortalama 0.75) türünde gözlenirken en düşük genetik çeşitlilik *L. nigricans* (ortalama 0.51) ve *L. lamottei* (ortalama 0.51) türlerinde gözlenmiştir.

#### 4.4. Mercimek Türleri Arasındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi

20 SSR primerinin, mercimeğe ait 170 genotipte analizinden sonra elde edilen veriler ile numerik matris oluşturulmuş ve Splits Tree V 4.6 (Huson ve Bryant, 2006) paket programında analiz edilmiştir. Analizlerde Nei genetik benzerlik katsayısı kullanılmış ve Neighbor Net (NNet) Planar Graph oluşturulmuştur (Şekil 4.10.).

Neighbor Net (NNet) Planar Graph'a göre çalışmada kullanılan mercimek genotipleri 6 gruba ayrılmıştır. *L. culinaris* subsp. *culinaris* ve *L. culinaris* subsp. *orientalis* alt türlerine ait genotipler aynı grupta yer alırken, diğer türler ayrı ayrı gruplarda yer almıştır. Elde edilen sonuçlara göre *L. culinaris* subsp. *culinaris* ve *L. culinaris* subsp. *orientalis* alt türleri tam bir ayırım göstermemiştir. Elde edilen genetik yakınlık değerlerine göre; kültür türüne en yakın türün *L. culinaris* subsp. *orientalis* (0.9200), en uzak türün ise *L. nigricans* (0.4350) olduğu tespit edilmiştir. *L. orientalis*'den sonra kültür türüne en yakın yabancı türlerin sırasıyla, *L. ervoides* (0.6701), *L. odemensis* (0.6562), *L. tomentosus* (0.6234) ve *L. lamottei* (0.5894) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).



Şekil 4.10. Mercimek türleri arasındaki Nei genetik benzerlik katsayısına göre oluşturulan NeighborNet Soyağacı

Çizelge 4.6. Mercimek türleri arasındaki genetik benzerlik (köşegenin üstü) ve genetik uzaklık (köşegenin altı) (Nei, 1978)

MERCİMEK TÜRLERİ	<i>L.</i>						
	<i>L. odemensis</i>	<i>L. culinaris</i> subsp. <i>orientalis</i>	<i>L. nigricans</i>	<i>L. ervoides</i>	<i>L. lamottei</i>	<i>L. tomentosus</i>	<i>L. culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i>
<i>L. odemensis</i>	*****	0.6894	0.4451	0.6466	0.5082	0.5605	0.6562
<i>L. orientalis</i>	0.3719	*****	0.4517	0.6920	0.5905	0.6656	0.9200
<i>L. nigricans</i>	0.8095	0.7947	*****	0.4329	0.3788	0.3556	0.4350
<i>L. ervoides</i>	0.4360	0.3682	0.8373	*****	0.5486	0.5627	0.6701
<i>L. lamottei</i>	0.6768	0.5268	0.9706	0.6003	*****	0.4267	0.5894
<i>L. tomentosus</i>	0.5789	0.4071	1.0340	0.5750	0.8517	*****	0.6234
<i>L. culinaris</i>	0.4213	0.0834	0.8323	0.4003	0.5287	0.4725	*****

#### 4.5. Mercimekte Moleküler Markörler Kullanılarak Yapılan Genetik Çeşitlilik Çalışmaları ve Filogenetik Çalışmalar

Mercimeğe özgü var olan SSR markörlerinin sayısı az olduğu için, mercimekte bugüne kadar SSR markörleri kullanılarak yapılan genetik ilişki ve genetik çeşitlilik çalışmaları yetersiz kalmıştır. Bu çalışmada, Andeden (2011) tarafından geliştirilen mercimeğe özgü SSR markörleri kullanılarak mercimek türleri arasındaki genetik ilişki değerlendirilmiştir. Mercimeğe özgü, yeni geliştirilen SSR markörlerinden 20 tanesinin kullanıldığı bu çalışmada, türler arasındaki genetik çeşitlilik ve taksonomik ilişki değerlendirilmiştir.

Pinkas ve ark. (1985) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, bulduğumuz sonucu desteklemektedir. Her iki çalışmanın sonuçları da kültür mercimeğine en yakın türün *L. culinaris* subsp. *orientalis* olduğunu ve *L. nigricans* türünün diğer türlerden ayrıldığını göstermiştir.

Mercimek filogenetiğini değerlendirmek amacıyla yapılan iki çalışmada ribozomal DNA dizileri analiz edilmiştir (Mayer ve Bagga 2002; Sonnante ve ark. 2003). İki çalışma sonucunda da *L. culinaris* ssp. *orientalis*'in kültür türüne en yakın

tür olduğu bildirilmişken, *L. nigricans*'ın da en uzak tür olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Havey ve Muehlbauer (1989)'ın yaptığı RFLP analizlerinin sonucuna göre kültür türü ile en yüksek benzerliği *L. culinaris* ssp. *orientalis* türü gösterirken, bu türü *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans* türleri takip etmiştir. Bu sonuç da bizim çalışmamızın sonucunu desteklemektedir. Fakat bizim çalışmamızın sonucuna göre *L. ervoides* türü, kültür türüne *L. odemensis*'den daha yakındır.

Ahmad ve ark. (1996), RAPD moleküler markör tekniğini kullanarak, farklı coğrafik bölgelere dağılmış mercimek türlerinde (*L. culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis* ve *L. nigricans*) genetik çeşitliliği değerlendirmişler ve çalışmalarını sonucunda, kültür türündeki genetik varyasyonun yabancı türlerdeki varyasyona göre daha az olduğunu ve *L. orientalis* türünün *L. culinaris* türünün atası olmaya en uygun tür olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre ise, kültür türü içindeki genetik varyasyon (0.62), *L. orientalis* (0.75) hariç diğer yabancı türler içindeki genetik varyasyondan daha yüksek bulunmuştur.

Duran ve Vega (2004), RAPD ve ISSR markörlerini kullanarak yaptıkları çalışmada mercimeğin bütün türleri arasındaki genetik ilişkiyi değerlendirmişler ve çalışmalarını sonucunda *L. tomentosus* türünün *L. culinaris* ssp. *culinaris* türüne en yakın tür olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre ise, *L. tomentosus*'un kültür türüne 4. dereceden yakın olduğu belirlenmiştir.

Hamwieh ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmanın sonucunda, yabancı türlere ait allel sayısının kültür türüne ait allel sayısından daha fazla olduğu belirtilmiştir. Nitekim bizim çalışmamızın sonuçları da bu yöndedir. Kültür türünden elde edilen allel sayısı 94 iken yabancı türlerden elde edilen allel sayısı 249'dur. Ancak genetik çeşitlilik bakımından karşılaştırıldığında; bu çalışmanın sonuçları yabancı türlerin genetik çeşitliliğinin daha yüksek olduğunu belirtirken bizim çalışmamızın sonuçları bunun aksini belirlemektedir (kültür türü için ort. G.Ç.İ:0.62; yabancı türler için ort. G.Ç.İ:0.57).

Alo ve ark. (2011) tarafından, CPs primerleri kullanılarak yapılan genetik çeşitlilik ve kültüre alınma süreci ile ilgili araştırma sonucunda kültür türüne en yakın yabancı türün *L. culinaris* subsp. *orientalis* olduğu ve *L. nigricans* türünün diğer

türlerden tamamen ayrıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da bizim çalışmamızın sonuçları ile örtüşmektedir.

Duran ve Vega (2004) tarafından gerçekleştirilen RAPD ve ISSR analizi haricinde, diğer çalışmalar gibi bizim çalışmamızın sonucu da mercimeğin yabancı atasının *L. culinaris* subsp. *orientalis* olduğunu göstermektedir.

#### 4.6. SSR Markörlerinin Farklı Türler veya Cinsler Arasında Kullanılabilirliği

Mercimeğe özgü SSR primerlerinin yabancı mercimek türlerinde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan SSR analizleri sonucunda 121 SSR primerinin yabancı mercimek türlerine aktarılabilirlik oranları hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucunda 23 primerin mercimeğin 6 yabancı türünde de çoğalma gösterdiği ve aktarılabilirlik oranının %100 olduğu, 20 primerin 5 mercimeğin yabancı türünde çoğalma gösterdiği ve aktarılabilirlik oranının %83.3 olduğu, 10 primerin mercimeğin 4 yabancı türünde çoğalma gösterdiği ve aktarılabilirlik oranının %66.6 olduğu, 19 primerin 3 yabancı türde çoğalma gösterdiği ve aktarılabilirlik oranının %50 olduğu, 21 primerin 2 yabancı türde çoğalma gösterdiği ve aktarılabilirlik oranının %33.3 olduğu ve 19 primerin tek bir yabancı türde çoğalma gösterdiği ve aktarılabilirlik oranının %16.6 olduğu bulunmuştur. 121 SSR primerinin yabancı türlere aktarılabilirlik oranı ortalama %58.3 olarak hesaplanmıştır. Bu aktarılabilirlik oranı, aynı cins içerisinde yer alan ve yakın türler olmasına rağmen diğer türlere özgü SSR markörlerinin aynı cinsler içinde aktarım oranı ile karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur. Örneğin; Choudhary ve ark (2009), tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre nohuta özgü SSR markörlerinin yabancı nohut türlerinde kullanılabilirlik oranının ortalama %82.6 olduğu rapor edilmiştir. Bu SSR markörlerinin en yüksek oranla (%96.6) *Cicer reticulatum*'a transfer olduğu bildirilmiştir ki *Cicer reticulatum*'un nohutun yabancı atası olduğu bilinmektedir. Marquez-Lema ve ark. (2010), hardalda (*Brassica carinata*) ve hardalın yakın türlerinde SSR markörlerinin kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmanın sonucuna göre, *B. nigra* türüne özgü SSR primerlerinin diğer hardal türlerine aktarılabilirlik oranının ortalama %88 ve *B. napus* türüne özgü SSR

primerlerinin diğ er hardal türlerine aktarılabirlik oranının ortalama %91.6 olduğunu bildirmişlerdir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mercimek türleri arasındaki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ve taksonomik ilişkinin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmanın sonucunda şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Mercimeğe özgü SSR markörlerinin yabancı mercimek türlerinde kullanılabilirliği test edilmiştir. Tarama sonuçlarına göre; 121 SSR primerinden 59 SSR primerinin *L. odemensis*'de, 103 SSR primerinin *L. culinaris* subsp. *orientalis*'de, 38 SSR primerinin *L. nigricans*'da, 54 SSR primerinin *L. ervoides*'de, 57 SSR primerinin *L. lamottei*'de ve 84 SSR primerinin *L. tomentosus*'da çalıştığı ve temiz bant ürettiği saptanmıştır.
2. 9 SSR primerinin *L. culinaris* subsp. *culinaris* dışında hiçbir türde çalışmadığı, 23 SSR primerinin ise mercimeğin bütün türlerinde de çalıştığı saptanmıştır. Sadece yabancı türler göz önüne alındığında, 19 SSR primerinin bazı yabancı türlere özgü olduğu bulunmuştur. Bu 19 SSR primerinden, 3 SSR primerinin sadece *L. tomentosus*'da çoğalma gösterdiği, 16 SSR primerinin ise sadece *L. culinaris* subsp. *orientalis*'de çoğalma gösterdiği tespit edilmiştir.
3. Taramadan elde edilen sonuçlar ile mercimeğe özgü her bir SSR markörünün yabancı mercimek türlerine aktarılabilirlik oranları da belirlenmiştir. Mercimeğe özgü SSR markörlerinin aktarılabilirlik oranının *L. culinaris* subsp. *orientalis* türünde en yüksek (%85.1) ve *L. nigricans* türünde en düşük (%31.4) olduğu bulunmuştur. 9 SSR primerinin *L. culinaris* subsp. *culinaris* dışında hiçbir türde çalışmadığı ve 23 SSR primerinin ise mercimeğin bütün türlerinde de çalıştığı saptanmıştır.
4. Aktarılabilirlik oranı en yüksek olan 23 SSR primerinden 10 SSR primerinin dinükleotid, 8 SSR primerinin ise trinükleotid tekrarlar içerdiği ve 2 SSR primerinin birleşik SSR motifine, 3 SSR primerinin ise mükemmel olmayan SSR motifine sahip olduğu tespit edilmiştir.

5. Agaroz jel elektroforezi sonrasında elde edilen tarama sonuçlarına göre en temiz profile sahip olan 53 SSR primeri seçilmiştir. Bu 53 primer, dört genotip kullanılarak ve farklı PCR programları denenerek ABI cihazında da taranmıştır. Tarama sonucunda, en temiz profile sahip olan 20 primer ve bu primerler için en uygun PCR programları seçilmiştir.
6. Seçilen 20 SSR primeri, mercimeğin kültür türüne ait 40 ve yabancı türlerine ait 130 genotipte SSR analizleri yapılmıştır. Her bir primer için ürettikleri allellerin büyüklükleri tespit edilmiştir. Türler için ayrı ayrı olacak şekilde primerlere ait polimorfizm bilgi içeriği (PBİ), genetik çeşitlilik indeksi (GÇİ), heterozigotluk oranı (HtO) ve allel sayıları (AS) belirlenmiştir.
7. Bütün türler birlikte değerlendirildiğinde 20 SSR primerinden 14 primerin polimorfik, 6 primerin ise monomorfik olduğu saptanmıştır.
8. Polimorfizm bilgi içeriği ve genetik çeşitlilik indeksi en yüksek olan primerlerin sırasıyla, CULB301, CULB9, CULB118 primerleri olduğu tespit edilmiştir.
9. Bütün lokuslardan elde edilen toplam allel sayısı 223 olarak saptanmış olup, bu allellerden 217 tanesinin polimorfik olduğu saptanmıştır. PBİ değeri 0,14 (CULD324) ile 0,94 (CULB301) arasında değişirken ortalama PBİ değeri 0,72 olarak bulunmuştur. Polimorfik markörlerden elde edilen allel sayısının 2 (CULC422) ile 32 (CULA308) arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 15,5 olduğu saptanmıştır.
10. En çok allel *L. orientalis* (115) türünde gözlenmiştir ve bu türü sırasıyla *L. culinaris* (94), *L. ervoides* (50), *L. odemensis* (42), *L. nigricans* (26) ve *L. lamottei* (11) türleri izlemiştir. En az allel ise 5 allel ile *L. tomentosus* türünde tespit edilmiştir. Markörlerin gösterdiği allelik varyasyonun türlere göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.
11. 20 SSR marköründen 13'ünün türlere özgü bazı alleller ürettiği tespit edilmiştir.
12. Genetik çeşitlilik indeksinin yabancı mercimek türlerinde 0.06 ile 0.94 arasında değiştiği ve ortalama G.Ç.İ. değerinin 0.57 olduğu

hesaplanmıştır. Kültür türü olan *L. culinaris*'de ise bu değer 0,05 ile 0,92 arasında bulunmuş ve ortalama G.Ç.İ değeri 0,62 olarak hesaplanmıştır. Her bir tür için genetik çeşitlilik karşılaştırıldığında, en yüksek genetik çeşitlilik *L. orientalis* türünde gözlenirken en düşük genetik çeşitlilik *L. nigricans* ve *L. lamottei* türlerinde gözlenmiştir.

13. Genetik yakınlık değerlerine göre oluşturulan NeighborNet grafiğinde, çalışmada kullanılan mercimek genotiplerinin 6 gruba ayrıldığı gözlenmiştir. *L. culinaris* subsp. *culinaris* ve *L. culinaris* subsp. *orientalis* türlerine ait genotiplerin aynı grupta yer aldığı, diğer türlerin ise ayrı ayrı gruplarda yer aldığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *L. culinaris* subsp. *culinaris* ve *L. culinaris* subsp. *orientalis* türleri tam bir ayırım göstermemiştir. Elde edilen genetik yakınlık değerlerine göre, kültür türüne en yakın türün *L. orientalis*, en uzak türün ise *L. nigricans* olduğu tespit edilmiştir. *L. orientalis*'den sonra kültür türüne en yakın yabancı türlerin sırasıyla, *L. ervoides*, *L. odemensis*, *L. tomentosus* ve *L. lamottei* olduğu gözlenmiştir.

Mercimekte türler arası ve tür içi genetik çeşitliliği ve mercimek türleri arasındaki taksonomik ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, Karacadağ yerel mercimek çeşidi kullanılarak geliştirilmiş 121 SSR primerinin yabancı mercimek türlerinde kullanılabilirlik oranları belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, aktarılabirliği yüksek olan SSR markörleri ile mercimeğin herhangi bir türünde genetik çeşitlilik çalışmaları yapılabilecektir. Ayrıca, mercimek için Andeden (2011) tarafından geliştirilmiş olan SSR markörleri, *Lens* cinsi içerisindeki türleri doğru bir şekilde sınıflandırmada olumlu sonuçlar vermiştir.



## KAYNAKLAR

- ABO-ELWABA, A., MURAI, K. and SHIMADA, T. 1995. Intra- and inter-specific variation in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 335–340.
- AHMAD M, MCNEIL D.L., FAUTRIER, A.G. 1996. Genetic relationships in *Lens* species and parentage determination of their interspecific hybrids using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 1091-1098.
- AHMAD, M., MCNEIL, D.L. and SEDCOLE, J.R. 1997. Phylogenetic relationships in *Lens* species and their interspecific hybrids as measured by morphological characters. *Euphytica* 94(1):101-111.
- ALO, F., FURMAN, B. J., AKHUNOV, E., DVORAK, J., and GEPTS, P. 2011. Leveraging genomic resources of model species for the assessment of phylogeny in wild and domesticated lentil. *Journal of Heredity* 102(3):315–329.
- ANDEDEN, E. E. 2011. Mercimekte SSR (Simple Sequence Repeat) Markörlerinin Geliştirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. (Yayınlanmamış)
- ANONYMOUS <http://www.cliffordawright.com/caw/food/entries/display.php/id/61/> (Erişim Tarihi: 18 Aralık 2011)
- ARAMUGANATHAN K. and EARLE E. D., 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208–218.
- BABAYEVA, S., Z. AKPAROV, M. J. ABBASOV, A. MAMMADOV, M. ZAIFIZADEH, and K. STREET, 2009: Diversity analysis of Central Asia and Caucasian lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm using SSR fingerprinting. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56, 293—298.
- BARULINA, H., 1930. Lentil of the U.S.S.R. and other countries. *Bull Appl Bot, Genet Plant Breed, Leningrad Suppl* 40:1–319.
- BAYAA, B., ERSKINE, W., HAMDİ, A. 1994. Response of wild lentil to *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* from Syria. *Genet Resources Crop Evol* 41 : 61-65.

- CHOUDHARY S, SETHY NK, SHOKEEN B, BHATIA S. 2009. Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. *Theor Appl Genet* .118:591-608.
- CUBERO, J.I., 1981. Origin, taxonomy and domestication. In: C.Webb & G. Hawtin (Eds.), *Lentils*, pp. 15–38. CAB, Slough, UK.
- CZEFRANOVA, Z. 1971. Review of species in the genus *Lens* Mill. (in Russian). *Nov Siestematiki Vysshikh Rastenii* 8 : 184-191.
- DAVIES, P. A., LÜLSDORF, M. M. and AHMAD, M..2007. Wild Relatives and Biotechnological Approaches. In: Shyam S. Yadav, David McNeil and Philip C. Stevenson (eds.). *Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*, pp. 225-240. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- DE LA ROSA R, JAMES CM, TOBUTT KR (2002) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 265–267.
- DOYLE, J.J. ve DOYLE, J.L., 1987. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- DURAN, Y., FRATINI, R., GARCIA, P. and PEREZ DE LA VEGA, M., 2004. An intersubspecific genetic map of *Lens*. *Theor Appl Genet* 108:1265–1273.
- ERSKINE, W., SMARTT, J., MUEHLBAUER, FJ. 1994. Mimicry of lentil and the domestication of common vetch and grass pea. *Economic Botany* 48: 326–332.
- ERSKINE, W. 2009. Global Production, Supply and Demand. In: William Erskine, Fred Muehlbauer, Ashutosh Sarker and Balram Sharma (eds). *The Lentil: Botany, Production and Uses*, pp. 4-12. CAB International, London, UK.
- FAO, 2009. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- FERGUSON, ME. VE ROBERTSON, LD. 1996. Genetic diversity and taxonomic relationships within the genus *Lens* as revealed by allozyme polymorphism. *Euphytica* 91: 163–172.

- FERGUSON, M.E., 1998. Studies of Genetic Variation within the Genus *Lens*. PhD thesis. School of Biological Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK.
- FERGUSON, M.E., FORD-LLOYD, B.V., ROBERTSON, L.D., MAXTED, N. ve 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.E., MAXTED, N., SLAGEREN, V.M., ROBERTSON, L.D., 2000. A reassessment of the taxonomy of *Lens* Mill. (*Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Vicieae*). *Bot J Linn Soc* 133:41–59.
- FERGUSON, M.E. ve ERSKINE, W., 2001. Lentils (*Lens* L.). In: Maxted N and Bennett SJ (eds.). *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*, pp. 125-131. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- FIKIRU E, TESFAYE K, BEKELE E. 2007. Genetic diversity and population structure of Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medikus) landraces as revealed by ISSR marker. *Afr. J. Biotech.* 6(12): 1460-1468.
- FORD, R., PANG, E.C.K., TAYLOR P.W.J., 1997. Diversity analysis and species identification in *Lens* using PCR generated markers. *Euphytica* 96:247–255.
- GARCIA-MORENO, M.J., VELASCO, L., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.M. AND PÉREZ-VICH, B. 2008. Transferability of sunflower microsatellite markers to safflower. In: *Proceedings of the 7th International Safflower Conference*, Wagga Wagga, NSW, Australia, 3-6 November 2008.
- GALASSO, I. 2003. Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* Miller. *Genome* 46: 1118–1124.
- GUTIERREZ MV, PATTO MCV, HUGUET T, CUBERO JI, MORENO MT, TORRES AM (2005). Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theor Appl Genet* 110: 1210–1217.

- GUYOMARC'H, H., P. SOURDILLE, G. CHARMET, K. EDWARDS and M. BERNARD, 2002. Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1164–1172.
- HAMDI, A. & ERSKINE, W. 1996. Reaction of wild species of the genus *Lens* to drought. *Euphytica* 91, 173–179.
- HAMDI, A., KUSMENOGLU, I. & ERSKINE, W. 1996. Sources of winter-hardiness in wild lentil. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43, 63–67.
- HAMWIEH, A., CHOUMANE W, UDAPA SM, DREYER F, JUNG C, BAUM M 2004. Development of microsatellite markers for the genus *Lens*. In: *Plant and Animal Genome XII Conf*, San Diego, p 135
- HAMWIEH, A., UDAPA, S.M., SARKER, F., JUNG, C. and BAUM, M., 2009. Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils. *Breeding Science.* 59: 77–86.
- HANSEN, J. and RENFREW, J.M., 1978. Paleolithic-Neolithic seed remains at Franchthi cave, Greece. *Nature* 71: 349–352.
- HAVEY, M.J. and MUEHLBAUER, F.J., 1989. Linkages between restriction fragment length, isozyme and morphological markers in lentil. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 395–401.
- HE, G.; WOULLARD, F.E.; MARONG, I. and GUO, B.Z. 2006. Transferability of soybean SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Science.* 33, no. 3, p. 22-28.
- HELBAEK, H. 1969. Plant collecting, dry-farming and irrigation agriculture in prehistoric Deh Luran. In: Hole F, Flannery KV, Neely JA (eds). *Prehistory and human ecology of the Deh Luran Plain*, pp. 383–426. *Memoirs Museum Anthropology* No. 1. University of Michigan, Ann Arbor, USA.
- HOFFMAN D.L., SOLTIS D.E., MUEHLBAUER F.J., LADIZINSKY, G., 1986. Isozyme polymorphism in *Lens* (Leguminosae). *Syst Bot* 11, 392-402.
- HUSON DH, BRYANT D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. 2006. *Mol. Biol. Evol.* 23:254–267.

- KAFKAS, S., OZKAN, H., AK, B.E., AÇAR, I., ATLI, H.S. and KOYUNCU, S., 2006. Detecting DNA Polymorphism and Genetic Diversity in a Wide Pistachio Germplasm: Comparison of AFLP, ISSR and RAPD Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(4): 522–529.
- KULEUNG C, BAENZIGER PS, DWEIKAT I. 2003. Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticale. *Theor Appl Genet* 108:1147–1150.
- LADIZINSKY, G. 1979. The Origin of lentil and its wild gene pool. *Euphytica*. 28: 179–187.
- LADIZINSKY, G., BRAUN, D., GOSHEN, D., MUEHLBAUER, FJ. 1984. The biological species of the genus *Lens*. *Botanical Gazette* 145: 253–261.
- LADIZINSKY, G. 1986. A new *Lens* species from the Middle East. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 43: 489-492.
- LADIZINSKY, G., 1989. Pulse domestication: fact and fiction. *Economic Botany* 43:131-132.
- LADIZINSKY, G. ve ABBO, S., 1996. Genetic diversity in the genus *Lens*. In: Pickergill B, Locks JM (eds). *Advances in Legume Systematics*, part 8. *Legumes of Economic Importance*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LADIZINSKY, G. 1997. A new species of *Lens* from south-east Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society* 123: 257–260.
- LADIZINSKY, G. (1999) Identification of lentil's wild genetic stock. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 115–118.
- LA`ZARO, A., RUIZ, M., DE LA ROSA, L., MARTIN, I. 2001. Relationships between agro/morphological characters and climatic parameters in Spanish landraces of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Genet Resour Crop Evol* 48:239–249.
- LIU, K. AND MUSE, S., 2004. PowerMarker: new genetic data analysis software. Version 3.0. 10 October 2005. <http://www.powermarker.net>.
- MARQUEZ-LEMA, A., VELASCO, L., PEREZ-VICH, B. 2010. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. *J Appl Genet* 51(2):123–131

- MAYER, MS. and SOLTIS, PS. 1994. Chloroplast DNA phylogeny of *Lens* (Leguminosae): Origin and diversity of cultivated lentil. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 773–781.
- MAYER, MS. VE BAGGA, SK. 2002. The phylogeny of *Lens* (Leguminosae): new insight from ITS sequence analysis. *Plant Systematics and Evolution* 232: 145–154.
- MUEHLBAUER, F.J. and TULLU, A., 1997. *Lens culinaris* Medik. New Crop Fact Sheet.
- 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.
- MUENCH, DG., SLINKARD, AE., SCOLES, GJ. 1991. Determination of genetic variation and taxonomy in lentil (*Lens* Miller) species by chloroplast DNA polymorphism. *Euphytica* 56: 213–218.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- NEI, M., LI, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76: 5269–5273.
- PEAKALL, R., GILMORE, S., KEYS, W., MORGANTE, M. & RAFALSKI, A. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.*, 15, 1275–1287.
- PINKAS R, ZAMIR D, LADIZINSKY G. 1985. Allozyme divergence and evolution in the genus *Lens*. *Plant Syst Evol.* 151:131–140.
- POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, **1**, 209–245.
- REDDY, M. R. K., R. RATHOUR, N. KUMAR, P. KATOCH, and T. R. SHARMA, 2010: Cross-genera legume SSR markers for analysis of genetic diversity in *Lens* species. *Plant Breed.* 129, 514—518.

- RENFREW, JM. 1969. The archeological evidence for the domestication of plants: methods and problems. In: Ucko PJ, Dimbleby GW (eds) The domestication and exploitation of plants and animals. Aldine, Chicago.
- RENFREW, JM. 1973. Paleoethnobotany. Columbia University Press, New York.
- ROBERTSON, D. L., SINGH K. B., ERSKINE, W. and MONEIM, A. M. ABD EL. 1996. Useful genetic diversity in germplasm collections of food and forage legumes from West Asia and North Africa. Genetic Resources and Crop Evolution. 43: 447-460.
- ROSA L., JOUVE N., 1992. Genetic variation for isozyme genes and proteins in Spanish primitive cultivars and wild species of *Lens*. Euphytica 59,181-187.
- RUPP, DW., MURRAY, MA., REESE, DS. 2000. Prastio Agios Savvas tis Karonis Monastery (Pafos District, Cyprus): Tentative Conclusions and 1992–1995 Ecofact Analyses. Echos du monde classique Classical Views XL: 255–300.
- 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. TheorAppl Genet 93:751-758.
- SMARTT, J. 1990. Grain Legumes – Evolution and Genetic Resources. Cambridge University Press, Cambridge.
- SONNANTE, G., GALASSO, I., PIGNONE, D. 2003. ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus *Lens* Mill. Annals of Botany 91: 49–54.
- SONNANTE, G., and D. PIGNONE, 2007. The major Italian landraces of lentil (*Lens culinaris* Medik.): their molecular diversity and possible origin, Genet. Resour. Crop Evol. 54, 1023—1031.
- SUVOROVA, G., and KORNIENKO N. 2011. Genetic Relationships Among Wild *Lens* Mill. Species Revealed by SDS –PAGE. Field Veg. Crop Res. 48:31-36
- TOKLU, F., KARAKOY, T., HAKLI, E., BICER, T., BRANDOLINI, A., KILIAN, B. and OZKAN, H., (2009). Genetic variation among lentil (*Lens culinaris* Medik) landraces from Souteast Turkey. Plant Breed. 128: 178-186.
- TOSUN, O. ve ESER, D., 1978. Mercimek (*Lens culinaris* M.)’te Ekim Sıklığı Araştırmaları I- Ekim Sıklığının Verim Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı: 28 (1): 218-236.

- TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU,2010. <http://www.tuik.gov.tr/Start.do>
- VAN OSS, H., ARON, Y., LADIZINSKY, G. 1997. Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens*. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 452–457.
- WANG ML, BARKLEY NA, YU JK, DEAN RE, NEWMAN ML, SORRELS ME, PEDERSON GA. 2005. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. *Plant Genet Res* 3:45–57.
- WEBER, J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7: 524–530.
- WILLIAMS, JT., SANCHEZ, AMC., JACKSON, MT. 1974. Studies on lentil and their variation. I. The taxonomy of the species. *SABRAO Journal* 6: 133–145.
- YEH, F. C., YANG, R.-C. AND BOYLE, T. 1999. POPGENE, version 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide. University of Alberta, Alberta, Canada.
- ZOHARY, D., 1972. The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Econ Bot* 26: 326–332.
- ZOHARY, D., 1992. Domestication of the Neolithic NearEastern crop assemblage. In: *Préhistoire de l'agriculture: Nouvelle approches experimentales et ethnographiques*, pp. 81–86. Monographie du CRA No. 6, CNRS, Paris.
- ZOHARY, D. and HOPF, M. 1988. *Domestication of Plants in the OldWorld*. Clarendon Press, Oxford.
- ZOHARY, D. and HOPF, M., 1993. *Domestication of Plants in the OldWorld:TheOrigin and Spread of Cultivated Plants in West Africa, Europe and the Nile Valley*. 2nd ed., Clarendon Press, Oxford.

## **ÖZGEÇMİŞ**

15.04.1987 tarihinde Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2005 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Çorum Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki eğitiminin 6'ncı yarıyılına ' Erasmus Öğrenci Hareketliliği Programı' kapsamında Macaristan /Debrecen Üniversitesi'nde tamamlayarak 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl da Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.

EKLER



EK 1: Araştırmada Kullanılan Mercimek Tür ve Genotipleri

Tür Adı	Gen Bankası Numarası	Toplandığı Bölge
<i>L. odemensis</i> (21)	IG72758	Suriye
	IG72926	Libya
	IG136662	Antakya
	IG72606	Antakya
	IG116021	Antalya
	IG116008	Aydın
	IG116010	Aydın
	IG72558	Balıkesir
	IG72562	İzmir
	IG116007	İzmir
	IG72631	Konya
	IG72745	Konya
	IG116029	Manisa
	IG72623	Mardin
	IG72744	Mardin
	IG116034	Uşak
	IG72725	Van
	IG72726	Van
	IG72559	Van
	IG72746	Konya
IG72837	Konya	
<i>L. culinaris</i> subsp. <i>orientalis</i> (45)	IG72610	Adıyaman
	IG72625	Adıyaman
	IG116042	Afyon
	IG72632	Amasya
	IG72747	Amasya
	IG72712	Antalya
	IG116015	Antalya
	IG72612	Bitlis
	IG72836	Burdur
	IG72622	Çorum
	IG72601	Denizli
	IG72605	Edirne
	IG72529	Elazığ
	IG136655	Elazığ
	IG72743	Gaziantep
	IG116039	Isparta
	IG72629	İçel
	IG72527	K.Maraş
	IG136672	Malatya
	IG72620	Tokat
IG72621	Tokat	
IG72619	Tunceli	
IG72748	Amasya	
IG72723	K.Maraş	
IG72724	K.Maraş	
IG72809	Adıyaman	
IG116040	Isparta	

Tür Adı	Gen Bankası Numarası	Toplandığı Bölge
<i>L. culinaris</i> subsp. <i>orientalis</i> (45)	IG72626	Gaziantep
	IG72624	Mardin
	IG72604	Antalya
	IG72618	Bitlis
	IG72835	Gaziantep
	IG72829	Amasya
	IG72615	Mardin
	IG136663	Gaziantep
	IG136669	Mardin
	IG136660	Antalya
	IG72812	Gaziantep
	IG72855	Gaziantep
	IG116041	Isparta
	IG136659	Denizli
	IG136677	Mardin
	IG116027	Denizli
	IG72833	Tokat
	IG116019	Burdur
<i>L. nigricans</i> (35)	IG72536	İtalya
	IG72540	Fransa
	IG72541	Fransa
	IG72542	İspanya
	IG72546	İtalya
	IG72549	Hırvatistan
	IG72554	İspanya
	IG72555	İspanya
	IG72557	Ukrayna
	IG72714	Hırvatistan
	IG72850	Ukrayna
	IG136638	İspanya
	IG136640	İtalya
	IG136641	Montenegro
	IG136642	Hırvatistan
	IG136646	Fransa
	IG136650	Ukrayna
	IG136681	Afyon
	IG72838	Afyon
	IG116020	Burdur
	IG116024	Denizli
	IG116025	Denizli
	IG136682	Isparta
	IG72834	Isparta
	IG116031	İzmir
	IG116032	İzmir
	IG72560	Konya
	IG72561	Konya
IG72637	Kütahya	
IG116030	Manisa	
IG116037	Manisa	

Tür Adı	Gen Bankası Numarası	Toplandığı Bölge
<i>L. nigricans</i> (35)	IG72713	Van
	IG72633	Afyon
	IG72634	Afyon
	IG72795	İzmir
<i>L. ervoides</i> (19)	IG72578	İsrail
	IG140927	Azerbaycan
	IG140929	Azerbaycan
	IG72585	Antalya
	IG72588	İçel
	IG72807	K.Maraş
	IG116012	Muğla
	IG136608	Antalya
	IG136610	İçel
	IG136632	Gaziantep
	IG136635	Antalya
	IG116014	Antalya
	IG72842	K.Maraş
	IG72815	K.Maraş
	IG72564	İzmir
	IG72814	K.Maraş
IG72784	Antalya	
IG72583	İzmir	
IG72794	İzmir	
<i>L. lamottei</i> (5)	IG72537	Fransa
	IG72552	İspanya
	IG110809	İspanya
	IG110812	İspanya
	IG110813	İspanya
<i>L. tomentosus</i> (5)	IG136665	Adıyaman
	IG136666	Diyarbakır
	IG136667	Diyarbakır
	IG72613	Diyarbakır
	IG72614	Diyarbakır
<i>L. culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i> (40)	Cağil2004	Türkiye
	Emre	Türkiye
	Firat87	Türkiye
	Kafkas	Türkiye
	Kışlıkkırmızı	Türkiye
	Altıntoprak	Türkiye
	Seyran96	Türkiye
	Özbek	Türkiye
	Çiftçi	Türkiye
	Şakar	Türkiye
	Yerlikırmızı	Türkiye
	Silvan	Türkiye
	Kumçatı	Türkiye
Hacıbey	Türkiye	
PI287516	Türkiye	

Tür Adı	Gen Bankası Numarası	Toplandığı Bölge
<i>L. culinaris</i> subsp. <i>culinaris</i> (40)	PI289072	Macaristan
	PI297775	Yunanistan
	PI297782	Yunanistan
	PI297785	Yunanistan
	PI297790	Yunanistan
	PI298022	Ankara
	PI298025	Ankara
	P298029	Ankara
	PI298921	İtalya
	PI308608	Suriye
	PI308609	Suriye
	PI308610	Suriye
	PI308611	Suriye
	PI319367	Meksika
	PI339266	Türkiye
	PI339269	Türkiye
	PI339274	Türkiye
	PI339282	Manisa
	PI339285	Antalya
	P339286	Eskişehir
	PI426166	Hindistan
	P435959	Lübnan
	PI435960	İran
	PI438519	Türkiye
	Karacadag	Türkiye