

**MERCİMEK HAT VE ÇEŞİTLERİNDE GENETİK VARYASYONUN
TESPİTİ**

ERTUĞRUL YÜZBAŞIOĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2005

ANKARA

Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU tarafından hazırlanan MERCİMEK HAT VE ÇEŞİTLERİNDE GENETİK VARYASYONUN TESPİTİ adlı bu tezin Doktora Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: : Prof Dr. Zeki KAYA

Üye : Prof. Dr. Zekiye SULUDERE

Üye : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

Üye : Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK (Danışman)

Bu, tez Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

**MERCİMEK HAT VE ÇEŞİTLERİNDE GENETİK VARYASYONUN
TESPİTİ
(Doktora Tezi)**

Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
EKİM 2005**

ÖZET

Genetik varyasyonun tespit edilmesinde, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, SDS-PAGE ve RAPD markırları kullanılarak *Lens culinaris* Medik. türüne ait mercimek hatları ve çeşitlerindeki genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. RAPD sonucuna göre Akm 2202-10 ile Meyveci, Akm 492 ile Akm 583, Akm 600 ile Akm 602 gibi bazı örnekler arasında genetik olarak bir farklılık bulunmamıştır. RAPD sonucuna göre mercimek çeşitleri 3 ana gruba ayrılmıştır ve her bir ana grup içindeki çeşitler de kendi aralarında farklılıklar göstermektedir. Birinci grubu Malazgirt, Fırat, Erzurum, Sultan, Pul çeşitleri, ikinci grubu Kafkas, Emre, Meyveci, Kayı, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi ve Ali Dayı çeşitleri ve üçüncü grubu ise sadece Seyran çeşidi oluşturmaktadır. SDS-PAGE yöntemine göre mercimek çeşitleri üç grup altında toplanmış olup, birinci grubu Ali Dayı, Seyran, Sultan gibi çeşitler, ikinci grubu Yerli Kırmızı, Erzurum, Özbek çeşitleri ve üçüncü grubu ise Meyveci ve Kayı çeşitleri oluşturmaktadır.

Bilim Kodu	:01
Anahtar Kelimeler	:RAPD, mercimek, <i>Lens culinaris</i> Medik., SDS-PAGE
Sayfa Adedi	:85
Tez Yöneticisi	:Prof. Dr. Leyla AÇIK ve Prof Dr. Sebahattin ÖZCAN

**DETERMINATION OF GENETIC VARIATION AMONG LENTIL
BREEDING LINES AND CULTIVARS**

(PhD. Thesis)

Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
OCTOBER 2005**

ABSTRACT

Morphological, biochemical and molecular markers are used to determine genetic variation. Genetic variations among and within breeding lines and cultivars of lentils were investigated by RAPD and SDS-PAGE methods. RAPD indicates that there is not any genetic difference between Akm 2202/10 line and Meyveci cultivar; Akm 600 and Akm 602 lines; Akm 492 and Akm 583 lines. RAPD data also placed the cultivars in three main groups and within each main groups cultivars differs distinctly from each other. The first group is composed of Malazgirt, Fırat, Erzurum, Sultan, Pul, the second is Kafkas, Emre, Meyveci, Kayı, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi and Ali Dayı and the third is Seyran. SDS-PAGE indicates that cultivars were divided into three different groups and the first group was composed of Ali Dayı, Seyran, Sultan cultivars, the second was composed of Yerli Kırmızı, Erzurum, Özbek cultivars and the third is composed of Meyveci and Kayı cultivars.

Science Code	:01
Key Words	:RAPD, lentil, <i>Lens culinaris</i> Medik., SDS-PAGE
Page number	:85
Advisor	:Prof. Dr. Leyla AÇIK and Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada beni bilgileriyle yönlendiren ve çalışmamın her safhasında desteklerini benden esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Leyla AÇIK ve Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, TİK üyeleri Prof. Dr. Zekiye SULUDERE, Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a, Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Coşkun ÖNEM, Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ'a, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Celal ER'e, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Bölüm Başkanı Prof. Dr. Hayri DUMAN'a, Doktora süresince bilimsel alandaki sorunlarımı dinleyen değerli dostum Doç. Dr. Khalid M.K. BHATTI'ye, SDS-PAGE yöntemindeki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ'ye, arkadaşlıklarından dolayı Dr. İskender PARMAKSIZ ve Doç. Dr. Serkan URANBEY'e, tez çalışmamda mercimek tohumlarını sağlayan Abdulkadir AYDOĞAN ve Dr. Alptekin KARAGÖZ'e, laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen özverili dostum Hüseyin Cevahir KALYONCU'ya, ayrıca, tez çalışmalarım boyunca göstermiş olduğu sabır, fedakarlık ve anlayıştan dolayı sevgili eşim Sema YÜZBAŞIOĞLU'na, annem Yaşar YÜZBAŞIOĞLU ve babam Ömer YÜZBAŞIOĞLU'na
Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
RESİMLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Morfolojik Markırlar	5
2.2. Biyokimyasal Markırlar.....	6
2.3. DNA Markırları	7
2.3.1. RAPD-PCR tekniği	9
2.4.Moleküler Markırların Mercimeklerde Uygulanması	15
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. RAPD-PCR yönteminde kullanılan materyal	25
3.1.2. Kullanılan mercimek çeşitlerinin özellikleri.....	27
3.1.3. SDS-PAGE yönteminde kullanılan materyal	30
3.2. Metot.....	33
3.2.1. DNA izolasyonu.....	33
3.2.2. DNA miktarı ve temizliği	35

	Sayfa
3.2.3. Primer seçimi	35
3.2.4. RAPD-PCR reaksiyonları	37
3.2.5. Bandların boyanması	37
3.2.6. RAPD-PCR bandlarının büyüklüğü	38
3.2.7. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması	38
3.3. Mercimek hatları ve çeşitlerinden izole edilen tohum proteinlerine SDS-PAGE uygulanması	38
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. RAPD-PCR tekniği kullanılarak mercimek hatları ve çeşitlerinin aralarındaki genetik ilişkinin belirlenmesi	40
4.1.1. DNA izolasyonu	40
4.1.2. DNA miktarı ve saflığı	41
4.1.3. Primer seçimi	46
4.1.4. RAPD-PCR polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması	47
4.2. SDS-PAGE yöntemiyle mercimek hatları ve çeşitlerinin aralarındaki genetik ilişkinin belirlenmesi	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	70
EKLER	78
EK-1. RAPD-PCR yöntemine göre hatlar ve çeşitler arasındaki genetik mesafe (Öklid Mesafesi)	79
EK-2. SDS-PAGE yöntemine göre hatlar ve çeşitler arasındaki genetik mesafe (Öklid Mesafesi)	81
EK-3. Mercimek hatları ve çeşitlerine ait RAPD-PCR bandlarının okunması	84
ÖZGEÇMİŞ	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. RAPD-PCR yönteminde kullanılan hatlar ve çeşitlerin adları	26
Çizelge 3.2. SDS-PAGE yönteminde kullanılan hat ve çeşitlerin adları	30
Çizelge 3.3. Mercimek hatlarında ve çeşitlerinde test edilen RAPD-PCR primerleri ve dizileri.....	36
Çizelge 4.1. Hatlar ve çeşitlerde DNA miktarları ve saflıkları.....	44
Çizelge 4.2. Denemede kullanılan primerlerdeki polimorfik band sayısı	47
Çizelge 4.3. OP04 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması.....	48
Çizelge 4.4. OP06 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması.....	49
Çizelge 4.5. OPU16 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması.....	50
Çizelge 4.6. SC1079 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması.....	51
Çizelge 4.7. OPB5 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması.....	52
Çizelge 4.8. OPB10 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması.....	53
Çizelge 4.9. OPC2 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması.....	54
Çizelge 4.10. SC1091 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması.....	55
Çizelge 4.11. OPA17 primeri ile hatlar ve çeşitlerin band profillerinin okunması ..	56
Çizelge 4.12. OPB7 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması.....	57
Çizelge 4.13. SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen protein bandlarının okunması....	66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. CTAB yöntemiyle izole edilen DNA’da meydana gelen kararma.....	42
Şekil 4.2. OP04 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	48
Şekil 4.3. OP06 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	49
Şekil 4.4. OPU16 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	50
Şekil 4.5. SC1079 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	51
Şekil 4.6. OPB5 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	52
Şekil 4.7. OPB10 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	53
Şekil 4.8. OPC2 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	54
Şekil 4.9. SC1091 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	55
Şekil 4.10. OPA17 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	56
Şekil 4.11. OPB7 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri	57
Şekil 4.12. RAPD bandları kullanılarak mercimek örneklerinde yapılan kümeleme analizi sonucu oluşan dendrogram.....	60
Şekil 4.13. SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen protein bandlarının elektroforegramı	65
Şekil 4.14. SDS-PAGE bandları kullanılarak mercimek örneklerinde yapılan kümeleme analizi sonucu oluşan dendrogram.....	66

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Mercimek hatları ve çeşitlerinin tarladaki genel görünümü.....	25
Resim 3.2. DNA izolasyonunda kullanılan taze yapraklar.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

μ

Mikron

kDa

Kilodalton

U

Ünite

Kısaltmalar

Açıklama

RAPD

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

RFLP

Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

AFLP

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi

SSR

Basit Dizi Tekrarları

PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CTAB

Setil Three Metil Amonyum Bromid

SDS-PAGE

Sodyum Dedosül Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. GİRİŞ

Mercimek çift çenekliler sınıfı (*Dicotyledonae*), Fabales takımı, baklagiller (*Fabaceae*) familyası ve *Lens* Miller cinsi içerisinde yer almaktadır. Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) diploid, kendine döllen ve $2n = 14$ kromozoma sahip bir baklagil bitkisidir.

Mercimeğin Neolitik Dönemde, Milattan önce 7000 yıllarında Doğu Akdeniz’de kültüre alındığı düşünülmektedir. Mercimek yine Neolitik Dönemde hızlı bir şekilde Nil Vadisi’ne, Avrupa’ya ve Asya’nın merkezine yayılmıştır. Mercimeğin kültürünün Pakistan’a ve kuzeybatı Hindistan’a yayılması Milattan önce 2250 ve 1750 yılları arasında olmuştur. Milattan sonra 1500 yıllarından sonra İspanyollar mercimeği Şili üzerinden Güney Amerika’ya tanıtmışlardır. Mercimek son zamanlarda ise Meksika, Kanada, Amerika ve Avustralya’ya tanıtılmıştır. Günümüzde hemen hemen neredeyse dünyadaki mercimek ekim alanının (%48.2) yarısı Güney Asya ülkelerindedir (1-2).

Ülkemizdeki hızlı nüfus artışı, gelir dağılımındaki dengesizlik ve özellikle kırsal kesimlerdeki hayvancılığın giderek yok olması en önemli protein kaynağı olan hayvansal ürünlerin fiyatlarının artmasına neden olmuş ve bu sebeple de halkın büyük çoğunluğu beslenmede baklagillere yönelmiştir. Ülkemizde hayvansal protein tüketimindeki yetersizlikler dikkate alındığında mercimek, tane kısmında %22-35 ve diğer kısımlarında ise %4-5 protein içermesi nedeniyle insan ve hayvan beslenmesinde büyük bir önem kazanmıştır. Ayrıca mercimek tohumunun saklanması hayvansal proteinlere göre daha kolaydır. Mercimek yüksek oranda B grubu vitaminleri, demir, fosfor, kalsiyum ve magnezyum gibi madensel maddeleri içermesi nedeniyle de beslenme açısından önemli bir yer tutmaktadır (3).

Mercimek, diğer baklagil bitkileri gibi toprakta bulunan *Rhizobium* ssp. bakterileri yardımıyla havanın serbest azotunu kökleri yardımıyla toprağa fiks ederek, toprağın azotça zenginleşmesini sağlamaktadır. Türkiye topraklarının büyük bir bölümünün

azotca fakir olduğu göz önüne alındığında, mercimek yetiştiriciliğinin önemi daha da artmaktadır.

Türkiye’deki tarım alanlarının önemli bir bölümü kurak yada yarı-kurak tarım alanıdır. Ülkemizin bu yörelerinde kuru tarım yapılmakta olup, tarlada ertesı yıla da bir miktar su sağlayabilmek için 1 yıl nadasa bırakılmaktadır. Bu açıdan ele alındığında; kuru tarım uygulamasının yapıldığı tarım alanlarımızda nadası kaldırabilmenin tek yolu tarlayı erken terk edebilen kışlık ve mercimek gibi bir yıllık baklagil çeşitlerinin ekim nöbetine dahil edilmesidir.

Tarla Bitkileri üretimi yapılan 18 milyon hektar ekim alanın 1.56 milyon hektarında Yemeklik tane baklagillerin ekimi yapılmaktadır. Yemeklik Tane Baklagiller ekim alanının %27’sini kırmızı mercimek, %6’sını da yeşil mercimek oluşturmaktadır (4).

Mercimek dış ticaretinde 1994 yılına kadar dış satım yapan ülkemiz, bu yıldan itibaren üretimdeki istikrarsızlık ve diğer nedenlerden dolayı hem dış alım hem de dış satım yapan ülke konumuna gelmiştir. Özellikle yeşil mercimekte 1980’li yıllara göre 1999 yılına gelindiğinde ekim alanlarındaki %65’lik azalma ile birlikte dış satımda ülkemiz pazar payı Kanada’ya kaptırılmıştır (5).

Ülkemizde kırmızı ve yeşil olmak üzere iki tip mercimek yetiştirilmektedir. Güney Doğu Anadolu Bölgesi ülkemiz kırmızı mercimek ekim alanının yaklaşık %80’ni, üretimin ise %77’lik kısmını karşılamakta ve kışlık olarak ekilmektedir. Yeşil mercimek ise çoğunlukla Orta Anadolu ve İç Anadolu ve Karadeniz bölgesi arasındaki yerlerde yazlık olarak ekilmektedir (6).

Türkiye’nin 1994 yılı verilerine göre mercimek üretimi toplam 610 000 ton iken 1998 verilerine göre ise 540 000 tona gerilemiştir. Buna rağmen mercimek üretimi nohuttan sonra ikinci sırayı almaktadır. İlk sıradaki nohut 625 000 ton üretime sahiptir (4). Buradan da anlaşılabacağı gibi mercimek ülkemiz için önemli bir besin kaynağı olmasına rağmen mercimek üretimimiz önemli miktarda gerilemiştir.

Mercimek ekim alanları ve mercimek üretimi incelendiğinde Güneydoğu Anadolu Projesinin (GAP) kapsadığı illerdeki (Şanlıurfa, Mardin, Gaziantep, Adıyaman, Diyarbakır ve Siirt) mercimek alanı ve mercimek üretimi sırasıyla, Türkiye mercimek ekim alanının %69.4'ünü ve üretiminin ise %68.6'sını içerdiği tespit edilmiştir. GAP bölgesi incelendiğinde bölgede tahıllardan sonra en fazla ekim alanı ve üretime sahip ürün grubu baklagillerdir ve baklagil ürünleri içinde de mercimek ve nohut en fazla yetiştirilmekte olup, bu iki ürün dışındaki baklagillerin yetiştiriciliği ekonomik açıdan bir önem arz etmemektedir. Sonuç olarak GAP bölgesinin başlıca geçim kaynağını tahıllarla birlikte baklagiller oluşturmaktadır. GAP illeri Türkiye mercimek üretiminin yarıdan fazlasını sağlamasına karşın, mercimek verimi Türkiye ortalamasının altında olmakta ve çeşitli sebeplerden dolayı verimde dalgalanmalar gözlenmektedir. Üretimdeki bu dalgalanmaların başlıca nedenleri; bölgedeki yağış yetersizlikleri, mercimek çeşitlerinin standart olmayışı ve zararlılara özellikle de mercimek tohum böceği olan *Bruchus lentis* Fröhl'e ve hastalıklara dayanıklı standart çeşitlerin olmayışıdır (6).

1994 verileri dış ticaret açısından incelendiği zaman mercimek ihracatı 291 331 ton olup, 959 666 000 Dolarlık döviz girdisi sağlamıştır. 1995 yılında ise 138 709 ton olarak gerçekleşen ihracatımız bir önceki yıla göre %52.3'lük bir azalma göstererek 70 674 000 Dolarlık döviz girdisi sağlamıştır (5). Türkiye'nin mercimek ihracatındaki düşüşün sebeplerinden biri verimde önemli düşüşlere neden olan mercimek tohum böceğine (*Bruchus lentis* Fröhl.) dayanıklı mercimek çeşitlerinin olmayışı ve diğeri de ihraç edilecek malın yurt dışı pazarlara uygunluk yönünden süreklilik göstermemesidir.

Son yıllarda, mercimek üretimimiz ve ihracatımızda görülen düşüşü durdurmak ve tekrar dünya pazarlarında lider konuma geçebilmek için standart, hastalıklara ve zararlılara dayanıklı çeşitler ıslah edilmelidir.

Bitki ıslahı programında gen kaynaklarının etkin bir şekilde kullanılabilmesi için ilk şart gen kaynaklarındaki ve kültür hatlarındaki genetik çeşitliliğin tespit edilmesidir.

Bu eşitililiğin tesbit edilmesinde morfolojik, biyokimyasal ve DNA markırları yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı da Türkiye’de üretimi yapılan 14 farklı çeşit ve ıslah çalışmaları sonucunda elde edilen 36 farklı hat arasındaki genetik farklılığı RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemleriyle belirlemektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Morfolojik Markırlar

Morfolojik markırlar en eski ve en yaygın kullanılan genetik markırlardır. En önemli avantajları ucuz olmaları, hızlı ve basit bir şekilde tanımlanabilmeleridir. Hatta herbaryum materyali ve ölü dokularda bile tanımlanabilirler (7). Fenotipe bakılarak en kolay tanımlanabilen markırlar genellikle olgun bitki döneminde alınabilmektedir. Bu nedenle bu markırları tespit edebilmek için çok fazla populasyonlar yetiştirilmelidir. Bir çok durumda albinizm, cücelik gibi mutant negatif karakterleri kodlayan genlerin kullanılması gerekebilir ve bu da iyi uyum sağlamış ıslah materyali için bir dezavantajdır (8). Sonuç olarak morfolojik markırların sayılarının az olması, çevre faktörlerinden etkilenmesi, epistatik ve pleotropik etkilere maruz kalması, genellikle resessif olmaları ve bir çoğunun mutasyonlar sonucu oluşması gibi olumsuz özellikleri nedeniyle bu markırların kullanımları sınırlı olabilmektedir (7, 9-14).

Morfolojik markırlar mercimekte de türlerin ayrılmasında ve haritalamada kullanılmıştır. Eujayl vd., mercimeklerde epikotil rengi, tohum kabuğundaki beneklilik gibi morfolojik markırların haritalamada kullanıldığını belirtmişlerdir (15).

Ahmad vd., korolla rengi, gövdedeki antosiyanin, stipul şekli, çiçek rengi gibi morfolojik markırları kullanarak *Lens* cinsindeki türleri sınıflandırmışlardır. *Lens* cinsine ait 22 örnekte morfolojik karakterlerle genetik ilişkiler araştırılmış ve *Lens culinaris* ssp. *orientalis*, *Lens nigricans* ve *Lens odemensis*'in aynı grupta toplandığı fakat *Lens ervoides* ve *Lens culinaris* ssp. *culinaris*'in ayrı ayrı gruplarda toplandığı belirtilmiştir (16).

2.2. Biyokimyasal Markırlar (Enzimler ve Protein Markırları)

Biyokimyasal markırların ilk grubunu enzimler oluşturmakta olup, enzimlerde izoenzimler ve alloenzimler olarak iki grupta toplanabilmektedirler. İzoenzim farklı bir lokus tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formları olarak tanımlanabilir. Alloenzimler ise aynı lokustaki farklı alleller tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formlarıdır (17). İzoenzimler bitkilerde 1960'larda kullanılmaya başlanmıştır. İzoenzim verileri poliploidiyi araştırmada çok değerli olup, poliploidlerin orijinini ve evrimini araştırmada uyarıcı bir rol oynamıştır (17). On beş yıl önceki çalışmalar bitki enzimlerinin çoklu formlarda olduğunu ortaya koymuştur. İzoenzimler genellikle kodominant allele sahip tek genle yönetilir ve lokus/allel modelleriyle açıklanabilirler. İzoenzim analizlerinde bitkilerin çeşitli organ ve dokuları kullanılabilen olup, analiz yöntemleri aşırı derece karışık değildir. İzoenzimlere ilaveten tohum depo proteinleri de bir çok türde tanımlamalarda kullanılmıştır. Tohum depo proteinlerinin kullanılmasının önemi; tohumun saklanması kolay olması, tohumun toplam proteininden elektroforez yapılması ve elde edilişi izoenzimlerden kolay olmasından kaynaklanmaktadır. Enzimler ile DNA markırları arasındaki farklardan birisi DNA markırlarının sayıca çok fazla olmasıdır. Teorik olarak DNA markırları genomun tümünü kaplamaktadır. Bir başka deyişle, genom üzerinde kodlama yapan, kodlama yapmayan, tek-kopya veya DNA dizi tekrarlarının da bulunduğu bölgelerin hepsinde DNA polimorfizmi meydana gelebilir. Oysa enzimi kodlayan lokuslar genom boyunca rastgele dağılım göstermezler. Diğer bir ifadeyle, alloenzimler genel olarak genlerin kodlama yapan dizilerindeki farklılıklarla ve fonksiyonel enzim gruplarıyla sınırlıdır. Bu nedenle de tüm genomu kaplamazlar (18). Bazı izoenzimler nötr olmadıklarından elektroforezde sadece amino asit dizisinde bulunan gerçek farklılığın sadece bir kısmını tespit ederler. Genetik çeşitlilik çalışmalarında aynı enzimatik aktiviteye ve elektroforetik yürüme oranına sahip izoenzimlerin homolog oldukları varsayılmasına rağmen amino asit analizi yapılmadan bu varsayım geçerli olamaz (17). Kısaca, biyokimyasal markırlarda gen ürünü oldukları için DNA markırlarına göre sayıca azdırlar, dokulara ve gelişme dönemlerine göre değişkenlik gösterirler ve çevre

faktörlerinden etkilenmelerinden dolayı kullanımları sınırlıdır (19). Enzimlerin bu çok iyi bilinen sınırlılıklarına rağmen onların kullanımları hem genetik düzeyde hem de organizma düzeyinde olmakla birlikte, sistematik ve evrim ile ilgili sorular üzerinde yoğunlaşmıştır. Azalan ilgiye rağmen, enzim elektroforezi bitki sistematğine önemli bir etki yapmıştır ve bu alandaki önemini korumaktadır (17).

Biyokimyasal markırlar bitki türlerinin tanımlanmasında uzun yıllardan bu yana sıkça kullanıla gelmiştir. Örneğin, Rick vd. (1974), domateslerde izoenzim çalışmalarına 1973 yılında başlamışlar ve *Lycopersicon esculantum* ile Andean çeşitleri arasındaki genetik benzerliği araştırmada izoenzim metodunu kullanmışlardır. Bu çeşitler arasında ve *L. cerasiforme* ve *L. pimpinellifolium* arasında da Ge^P allelinin yaygın olduğu belirtilmiştir (20).

2.3. DNA Markırları

Bitki türlerinin tanımlanmasında ve genetik varyasyonun araştırılmasında moleküler markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Son 20 yıl moleküler tekniklerin yılı olmuştur. Moleküler teknikler çevre faktörlerinden etkilenmezler, polimorfizm miktarı çok yüksektir, pleotropik ve epistatik etki göstermezler ve stabildirler (7, 19, 21-22). Morfolojik ve biyokimyasal markırların uygulamadaki yetersizlikleri moleküler markırların uygulanmasıyla ortadan kaldırılabilir. Moleküler teknikler, hibridizasyona dayalı, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı, bu iki yöntemin karışımı esasına dayalı ve dizi analizi, 16s rRNA gibi diğer teknikler olmak üzere 4 grupta toplanabilir.

Moleküler tekniklerden ilki 1980 yılında ortaya konan ve hibridizasyona dayalı olan Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) (23) tekniğidir. RFLP'ler türlerin tanımlanması, genetik haritalama, markır yardımıyla seleksiyon gibi moleküler biyoloji konularında yaygın olarak kullanılmıştır (12). RFLP tekniğinin; DNA-amplifikasyonuna dayalı moleküler tekniklere göre pahalı olması, radyoaktiviteye ihtiyaç duyması, zaman alıcı ve fazla miktarda DNA gerektirmesi ve uygulamasının zor olması gibi dezavantajları vardır (7, 9).

PCR, Kary Mullis (K. B. Mullis, U.S. patent 4 683 195, Temmuz, 1987) tarafından icat edilmiş olup, moleküler biyolojinin hızlı bir şekilde gelişmesinde katalizör olmuştur (24-25). PCR metodu adli tıptan ekolojiye ve DNA diagnostik çalışmalarından temel araştırmalara kadar her alanda uygulanma fırsatı bulmuştur. PCR tekniğinin hızlı bir şekilde kabul görmesinin sebebi onun basitliği, kolaylığı ve hızından dolayıdır (24). PCR'ın çalışma prensibi ise çok az miktardaki (genellikle ng düzeyindeki) kalıp DNA'da istenen bölgelerin *in vitro* koşullarda enzimatik yollarla milyonlarca kez çoğaltılıp, jelde yürütüldükten sonra boyanarak görüntülenmesi şeklindedir. PCR tekniğinin uygulanması 'thermocycler' adı verilen bir cihaz içinde *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmekte olup, gerekli reaksiyon karışımı kalıp DNA'yı, nükleotid karışımını (dNTPs), iki tane oligonükleotid primeri, DNA polimeraz enzimini, tampon çözeltisini ve $MgCl_2$ içerir. Kalıp DNA incelenecek organizmalardan çeşitli yöntemlerle izole edilir. Primerler kalıp DNA da çoğaltılmak istenen bölgeye özgündürler ve PCR primerleri genellikle 20-33 adet baza sahiptirler. PCR tekniğinde günümüzde en yaygın olarak kullanılan polimeraz enzimi Taq polimerazlardır. Bu enzim optimum 72°C sıcaklıkta çalışmakta olup, 94°C gibi yüksek sıcaklığa da dayanıklıdır.

PCR'ın çalışma prensibi ard arda tekrarlanan üç basamaktan oluşur;

1. Çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklıklarda denatürasyonu ve bu işlem sonucunda tek sarmallı polinükleotid zincirinin oluşturulması
2. Kullanılan primerlerin oluşturulan bu tek zincirli DNA molekülünde hedef bölgelere bağlanması
3. DNA polimeraz enzimi kullanılarak primerlerin DNA zincirini tamamlayacak şekilde uzatılarak tekrar çift zincirli DNA oluşturulması

PCR tekniğinde yapılan bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve döngü sayısı 25-35 kez tekrarlanır.

RAPD-PCR metodu PCR'a dayalı önemli metodlardan birisi olup, tesadüfi bir dizilime sahip 10 bazlık primerleri kullanarak *in vitro* koşullarda enzimatik yollarla DNA'nın çoğaltılması esasına dayanır ve RAPD-PCR olarakta bilinir. RAPD tekniği

bir PCR türü olmakla birlikte klasik PCR'dan farklı olarak tek bir primer kullanmakta ve bu primer PCR primerlerine göre daha az sayıda nükleotid içermektedir.

Daha sonra da bu iki metodun prensiplerinden yararlanılarak AFLP (26), SSR gibi bir çok moleküler metotlar ortaya konmuştur. AFLP ve SSR tekniklerinin üretilebilirlikleri ve polimorfizm düzeyi RAPD-PCR metoduna göre daha yüksektir. RAPD-PCR metodunun, genetik varyasyonun araştırılmasında, bitkilerin genetik haritaların çıkarılmasında ve markır yardımıyla seleksiyonda yoğun olarak kullanılmasının nedeni, metodun diğer moleküler metotlara göre daha ucuz, daha az DNA gerektirmesi ve otomasyonunun olmasıdır.

2.3.1. RAPD-PCR tekniği

RAPD-PCR metodu Williams vd. (27) ve Welsh ve McClelland (28), tarafından eş-zamanlı olarak tanımlanmış olup DNA'nın çoğaltılmasına dayalı bir tekniktir ve son 10 yılda türlerin ve varyetelerin moleküler düzeyde tanımlanmasında önemli bir rol oynamıştır (9, 13, 18, 29-30).

DNA izolasyonu

RAPD-PCR yönteminde bandların üretilebilirliği ve belirginliği DNA'nın saflığına ve kırılıp kırılmamasına göre değişir. Bitki türlerinden yüksek moleküler ağırlıklı DNA izole etmede bir takım sorunlarla karşılaşılabilir. Bunlar (1) kısmen veya tamamen DNA parçalanması, (2) bir hayli yapışıcı olan polisakkaritlerin de DNA ile birlikte izole edilmesi, (3) Taq polimeraz ve restriksiyon enzimlerini inhibe eden ve DNA ya zarar veren polifenollerin ve sekonder metabolitlerin DNA ile birlikte izole edilmesi olarak sıralanabilir. Bitki türlerinin önemli bir kısmında polifenollerden ve quinonik bileşiklerden dolayı DNA'nın renginin kahverengine dönüşmesi sıkça görülmektedir. Çünkü bu bileşikler güçlü birer oksidasyon ajanlarıdır ve DNA'ya zarar verirler. Polifenollerin zararlı ve oksitleyici etkisi genellikle izolasyon tamponuna (1) %1-2 düzeyinde bovin serum albumin (BSA), polivinilpyrrolidon gibi

polifenol tutucuların, (2) izolasyon tamponuna dietildithiokarbomik asit (DIECA) gibi fenoloksidaz inhibitörlerinin ve (3) sodyum bisülfid, sistein, askorbik asit, 2-merkaptoethanol gibi antioksidantların eklenmesiyle ortadan kaldırılabılır (31).

DNA çok kolay bir şekilde kırılabilir olup, DNA'nın parçalanmasının sebeplerinden birisi DNaz'lardır. Bir çok enzim sıcaklıkla aktif hale geçtiklerinden dolayı, dokulardan DNA izolasyonunu sırasında DNA'nın parçalanmasını önlemek için, dokuların parçalanması düşük sıcaklıklarda (genellikle 4°C) yapılabilir. Ayrıca dokuların ezilmesi sırasında uygulanan aşırı fiziksel güç ve ezilmiş dokunun aşırı derecede sallanması da DNA'nın parçalanmasına sebep olabilir (32).

Doyle ve Doyle, polisakkaritlerin izolasyon ortamından uzaklaştırılması için ise Setil Trimetil Amonyum Bromid (CTAB) konsantrasyonunun artırılmasının yeterli olabileceğini belirtmektedir. Polisakkaritlerce zengin bitkilerde izolasyon tamponundaki CTAB miktarı arttırılarak polisakkaritler DNA'dan uzaklaştırılabilir (33).

Murray ve Thompson, istenmeyen maddelerle kontaminasyonu önlemek için, DNA-CTAB kompleksinin sadece yüksek tuz ortamında çözünmesi ilkesinden yararlanarak, izopropanolü kullanma yerine tuz konsantrasyonunu %0.7'nin altına düşürerek DNA-CTAB kompleksini oluşturmuş ve bu aşamada polifenoller, proteinler ve polisakkaritler süpernatant kısımda çözünmeden kalmıştır. Santrifüjden sonra DNA pelleti 1 M dan büyük NaCl konsantrasyonları içeren tamponlarda tekrar çözündürülmüş ve DNA etanolle yıkanarak polisakkaritler ve polifenoller ortamdan uzaklaştırılmıştır (34).

Fang vd., polisakkaritleri DNA'dan uzaklaştırmak için DNA izolasyonundaki en son yıkama basamağında DNA pelletini 2M NaCl içeren TE içinde çözündürüp 2 hacim etanol ile tekrar presipite etmişlerdir. Yüksek tuzdaki etanol presipitasyonu sırasında bir çok polisakkarit çözünmeden kalmış ve DNA'dan uzaklaştırılmıştır (35).

RAPD-PCR yönteminde DNA'nın az miktardaki parçalanması PCR ürün profilinin değişmesine sebep olmakta, DNA'daki yüksek miktarda parçalanma ise amplifikasyonun yapılamamasına yani PCR ürününün oluşmamasına neden olmaktadır (31).

Reaksiyon şartlarının ve bileşenlerinin etkisi

PCR reaksiyonu bir çok bileşen içermesinden ve PCR programının farklı basamakları olmasından dolayı RAPD tekniğinin optimizasyonu zaman alıcıdır. RAPD profilini etkileyen bileşenlerin optimizasyonu hakkında bir çok araştırma yapılmıştır. Polimeraz enziminin ve PCR cihazının markası, primer, yapışma sıcaklığı ve magnezyum konsantrasyonu band profilinin kalitesine etki eden temel faktörler olarak belirlenmiştir (31, 36-37).

RAPD-PCR primerleri birçok üretici firmadan temin edilebilir. Primer konsantrasyonları genellikle 0.1-2 μ M dır. Türlerin çoğunda RAPD-PCR primerlerinin büyük bir kısmı 6-12 arasında fragment profili verir. Primerlerin G+C içeriği arttıkça primerlerin amplifiye ettiği ürünlerin üretilebilirliği de artmaktadır (31).

Fritsch vd., *Yucca*, *Helianthus* ve *Datusca*'da 480 tane 10 bazlık RAPD-PCR primerlerinin amplifikasyonlarının tekrarlanabilirliğini araştırmışlardır. Araştırma sonucu olarak herhangi bir primerden güçlü, zayıf veya hiçbir amplifikasyon ürünü elde edilememesinin DNA kaynağından büyük oranda bağımsız olduğunu belirtmişlerdir. Primerin karakteristiğinden amplifikasyon ürününün kalitesini tahmin etmede en iyi özelliğin primerin G+C içeriğinin olduğunu ve primerin amplifikasyon etkinliği ve amplifikasyondaki farklılıkların çeşitli faktörlerle etkileşim içinde olduğunu belirtmişlerdir. Cinsler arasındaki primerlere özgü farklılığın kaynağının genomik farklılıklar olduğu rapor edilmiş ve DNA'nın temizliğindeki farklılıklardan dolayı amplifikasyonun etkinliğinde de farklılıklar olabileceği belirtilmiştir. Bazı primerlerin DNA'nın saf olmamasından dolayı zayıf bandlar verdiği ve bu nedenle de bazı primerlerin DNA'nın temizliğine diğer primerlerden daha hassas olduğu

tespit edilmiş ve DNA temizliği artırıldığında bandlarda bir iyileşmenin olduğu kaydedilmiştir. Primerin amplifikasyonundaki farklılıkların diğer nedenleri arasında DNA'nın parçalanması ve araştırmacının hatasının yer aldığı tespit edilmiştir (38).

PCR'da kullanılan *Taq* polimeraz (Promega), *AmpliTaq* (Perkin Elmer), *SuperTaq* (HT Biyoteknoloji) gibi bir çok polimeraz çeşidi vardır. Bu polimerazların hepsinde 3'-5' ekzonükleaz aktivite yani hata düzeltme aktivitesi yoktur, fakat 5'-3' ekzonükleaz aktiviteye sahiptirler. Hata düzeltme aktivitesi enzimin nükleotid eşleştirmesini doğru yapmasını sağlar ve eğer yanlış nükleotid yerleştirilmiş ise bunu düzeltir. *Delta Taq*, *KlenTaq1* ve *stoffel* fragmenti gibi nükleotit dizisi kısaltılmış, 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi olmayan polimerazlarda saflaştırılmıştır. *Stoffel* fragmentinin amino ucundan 289 amino asit çıkartılmıştır ve uzunluğu tam olan *Taq* polimerazlardan sıcaklığa ve yüksek magnezyum konsantrasyonlarına daha dayanıklıdır. Fakat bunların düşük aktivite göstermelerinden dolayı, reaksiyon başına 2 kat fazla enzime ihtiyaç duyulur (31).

Schierwater ve Ender, ticari olarak satılan 13 farklı polimeraz enziminin amplifikasyon profilini incelemiş ve *Thermus aquaticus*'tan türetilen polimerazların amplifikasyon profilinin benzer sonuçlar verdiğini fakat sonuçların birbirinin aynısı olmadığını belirtmiştir (39).

RAPD-PCR tekniği ilk ortaya konduğunda sıcaklık profili 94°C'de 1 dakika, 36°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2 dakika olarak belirtilmiştir (27). Fakat birçok araştırmacı bu programı kendi şartlarına göre değiştirmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken noktalardan biri basamaklar arasındaki geçiş zamanının çok kısa olmaması yönündedir. Primer ile kalıp DNA'nın hedef bölgesi arasında genellikle %80-90 homoloji vardır. Eğer basamaklar arasındaki sıcaklık çok kısa süre içinde yükseltirse primer-kalıp DNA kompleksi uzama tamamlanmadan denatüre olur (31).

Dikkat edilmesi gereken noktalardan bir diğeri de yapışma sıcaklığıdır. Yapışma sıcaklığı genellikle erime sıcaklığının (T_m) 5°C aşağısına ayarlanır. Rastgele

dizilimli 10 bazlık primerlerde yapışma sıcaklığı olarak 36°C başlangıç olarak seçilebilir. Yapışma sıcaklığının 40-42°C ye yükseltilmesi daha az ve daha keskin bandın oluşmasına sebep olmaktadır. RAPD reaksiyonu genellikle 45 devirde gerçekleştirilir. Fakat bazı çalışmalarda 35 devir tavsiye edilmiştir (31).

Kalıp DNA konsantrasyonunun optimizasyonu iyi bir RAPD-PCR profili elde etmede son derece önemlidir. Başlangıç olarak fragment profiline ve arka plan görünümüne bağlı olarak 5 ila 500 ng arası DNA miktarı denenebilir. Kalıp DNA konsantrasyonu 400 ng'a kadar tavsiye edilse de 50 µl'lik reaksiyon için 10-50 ng uygun olacağı belirtilmiştir (31).

RAPD-PCR tekniğinde kalıp DNA'daki farklı hedef bölgeler birbirleriyle yarış içinde olduklarından dolayı, teorik olarak bir RAPD-PCR fragmentinin bulunması diğer amplifiye olabilecek hedef bölgenin varlığına veya yokluğuna bağlıdır.

Bazen RAPD-PCR fragmentlerinin yeniden amplifikasyonu gerçekleşmeyebilir, genellikle bunun yerine bir çok küçük fragmentler amplifiye edilir. Bu durum yüksek DNA konsantrasyonlarında primerle yapışma bölgesi arasındaki tam bir uyum olmamasından kaynaklanabilir. DNA'nın farklı oranlarda seyreltilmesi ile bu sorun çözülebilir (31).

Weeden vd., RAPD markırlarının güvenilirliğini ve kalıtımını denemişlerdir. Reaksiyon parametreleri olarak DNA miktarı, temizliği, Mg^{+2} miktarı, primer miktarı ve farklı üretici firmalardan alınan Taq polimeraz enzim çeşitlerinin amplifikasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. DNA kalitesinin bandların amplifiye edilmesi ve çözünürlüğü üzerinde büyük önemi olduğu belirtilmiş, fenolik bileşikler ve polisakkaritlerle kirlenmiş DNA'nın zayıf veya keskin olmayan RAPD bandı verdiği rapor edilmiştir. RAPD bandının kaliteli olmasında DNA kalitesinin DNA miktarından daha önemli olduğu vurgulanmıştır. 0.2-1µM primer miktarının üretilebilir sonuçlar verdiği fakat bunun 4 kat artmasının da bandların üretilebilirliğini etkilemediği belirtilmiştir. 1-3 mM arası Mg^{+2} konsantrasyonunda RAPD profilinde çok küçük değişiklikler olduğu ve hatta bazı denemelerde 13 mM'a

kadar olan miktarlarında RAPD profilini önemli derecede etkilemediği rapor edilmiştir (40).

Deoksiribonükleozid trifosfatlardaki (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2-3 katlık değişiminde RAPD profilini etkilemediği fakat RAPD bandlarının kayıt edilmesi sırasında zayıf amplifikasyondan dolayı %4'lük bir hata olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak RAPD profilinin denenen bir ya da birkaç parametreye çok fazla duyarlı olmadığı kaydedilmiştir (40).

Skroch ve Nienhuis, *Phaseolus vulgaris*'te RAPD bandlarının üretilebilirliğini ve bandların kayıt edilmesi sırasında oluşan hatayı araştırmış ve kayıt etme hatasını %2 olarak belirtmişlerdir. RAPD bandlarının üretilebilirliği üzerinde RAPD primerlerinin etkisinin önemli olduğu ve net band veren primerler seçilerek üretilebilirliğin artırıldığı belirtilmiştir (41).

Bir çok çalışmada magnezyum konsantrasyonunun RAPD profili üzerine etki ettiği belirtilmiştir. Geniş bir magnezyum konsantrasyonu aralığında güçlü ve üretilebilir bandlar alınmasına rağmen konsantrasyondaki bir değişiklik sıkça fragment profilinin değişimine sebep olabilmektedir. 1.5-10 mM arasındaki magnezyum konsantrasyonları tavsiye edilmektedir (31).

RAPD ürünlerinin laboratuvar içinde ve laboratuvarlar arasında üretilebilirliği bir çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Bir laboratuvarda RAPD yöntemiyle alınan polimorfik ürünlerin tekrarlanabilirliğinin bir çok faktöre bağlı olduğu belirtilmiştir (42-46).

Ellsworth vd., RAPD yöntemindeki bandların üretilebilirliğini primerin kalıp DNA'ya oranı, yapışma sıcaklığı ve magnezyum konsantrasyonunun etkilediğini belirtmiştir (47).

Penner, PCR reaksiyonuna giren maddelerin konsantrasyonlarındaki önemli değişikliklerin de PCR ürünlerinin üretilebilirliğini önemli derecede etkilediğini

belirtmiştir. Her bir reaksiyon için 2 ünitiden fazla *Taq* polimeraz kullanımı, 2mM'ın üstünde $MgCl_2$ kullanımının istenmeyen bandların oluşumuna sebep olabileceğini belirtmiştir. Aynı araştırmacı yine yapışma sıcaklığının kritik olduğunu belirtmiş ve 36°C'nin altındaki 1°C'lik değişimlerin bile farklı ürünlerin amplifikasyonuna sebep olabileceğini belirtmiştir (30).

Penner, RAPD yönteminde bir laboratuvarla elde edilen sonuçların diğer laboratuvarlarda tekrarlanabilirliğini test etmiştir. Yapılan araştırmada 5 farklı primerle 2 yulaf çeşidinde RAPD bandlarının 6 farklı laboratuvarla üretilirliği denenmiş ve üretilen polimorfizm amplifikasyon aralığında ise %90 aynı sonucu vermiştir (30).

RAPD yönteminden elde edilen reaksiyon ürünlerinin ayrıştırılması geleneksel olarak yatay agaroz jel elektroforezinde yapılmaktadır. Kullanılan agarozun konsantrasyonu amplifikasyon ürünlerinin büyüklüğüne bağlıdır. RAPD ürünlerinin çözünürlüğü akrilamid jel elektroforezi ile artırılabilir.

RAPD ürünlerinin dikey akrilamid jel elektroforezinde ayrıştırılması ile oluşan çözünürlük agaroz jellerindeki ayrıştırmadan oluşan çözünürlükten en az iki kat daha fazladır. Akrilamid jellerinin çözünürlüğünün daha iyi olmasının temel sebeplerinden biri por büyüklüklerinin agaroz jellerine göre çok daha homojen olmasındandır. Homojen por büyüklüğü, benzer büyüklükteki fragmentlerin daha etkin bir şekilde çözünürlüğünü sağlamaktadır (30).

2.4. Mercimekte Moleküler Markırların Uygulanması

Lens Miller cinsinin ülkemizde *Lens montbretii* (Fisch. & Mey) Davis & Plitm., *L. orientalis* (Boiss.) Hand.-Mazz., *L. culinaris* (Medik.), *L. ervoides* (Brign.) Grande, *L. nigricans* (Bieb.) Godr., *L. tomentosus* (Ladizinsky) ve Avrupa'da ilave olarak *L. lenticulata* (Schreber) Alef. olmak üzere 7 türü vardır (48-50).

Ferguson ve Robertson, *Lens* cinsinin 439 örneğinde 11 lokustaki allozim polimorfizmini araştırmıştır. 439 örneğin 153'ü *Lens orientalis*, 35'i *Lens odemensis*, 117'si *Lens ervoides*, 34'ü *Lens nigricans*, 100'ü 10 farklı ülkeden alınan kültür mercimeği popülasyonudur. Çalışma tür içi genetik varyasyonu ve türler arası genetik yakınlığı tespit etmeyi amaçlamıştır. Lokus başına düşen ortalama allel sayısı ve polimorfik lokus yüzdesine bakılarak kültür mercimeğindeki genetik varyasyonun yabani türlerdekinden daha az olduğu tespit edilmiştir. Nei (1972)'nin ortalama genetik mesafesine göre kültür mercimeğindeki genetik varyasyonun sadece *Lens ervoides*'den fazla olduğu rapor edilmiştir. Yabani türlerdeki genetik varyasyonun farklı türler içindeki popülasyonlar arası farklılığı gösterdiği rapor edilmiştir. Yapılan filogenetik analiz *Lens odemensis* ve *Lens ervoides*'in ortak bir atası olduğunu ve *Lens orientalis*'in *Lens odemensis*'den türediğini ortaya koymuştur (51).

Ferguson vd., *Lens* cinsinin *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. ervoides*, *L. nigricans* ve *L. lamottei* olmak üzere beş yabani türünde popülasyonların genetik yapısını araştırmışlar ve her bir türden 5 popülasyon, her popülasyondan da 20 bitki alarak 11 izoenzim lokusuna ve 3 RAPD primerinden oluşan genetik varyasyonu rapor etmişlerdir. *L. orientalis* ve *L. lamottei*'nin popülasyonları arasında önemli derecede bir genetik varyasyon görülmesine rağmen genel olarak düşük varyasyon düzeyi tespit etmişlerdir. İzoenzim ve RAPD sonuçlarından alınan moleküler varyansın %78-99'unun popülasyonlar arası farklılıktan kaynaklandığı ortaya konmuştur (52).

Eujayl vd., haritalama popülasyonunda polimorfizm miktarını arttırmak için çaprazlamada kullanacağı ebeveynleri önce yabani tür olan *Lens orientalis* ile çaprazlamış ve ebeveynlerin genomunun %50'sinin bu türün genomunu kapsadığı ve yapılan melezlemelerde RAPD markırının %1.83'ünün segregasyon kuralına uymadığını, morfolojik ve izoenzim markırlarının da bu sonucu desteklediğini belirtmişlerdir. Yapılan 2 nolu çaprazlamada denenen 390 primerden 116'sının 192 polimorfik fragment verdiğini ve bu polimorfizmin üretilebilir olduğunu belirtmişlerdir. Genetik haritalama için açılım gösteren 78 lokusta 28 RAPD, 1 RFLP, 1 morfolojik, 3 oligo markırı kullanılarak 9 bağlı grup bulduklarını ve RAPD

markırının genetik haritalamada çok değerli bir teknik olduğunu vurgulamışlardır (15).

Bayaa vd., *Lens orientalis*'in 86 örneğinin 24'ünde; *Lens odemensis*'in 35 örneğinin 12'sinde; *Lens nigricans*'ın 35 örneğinin 3'ünde; *Lens ervoides*'in 39 örneğinin 36'sında ascochyta blight hastalığına dayanıklılık bulmuştur. Yapılan çalışmada mercimek antraknozuna dayanıklılığın *Lens ervoides* ve *Lens odemensis* 'te birbirini tamamlayan dominant iki gen çiftiyle sağlandığı ortaya konmuştur. Mercimek antraknozuna tam bir dayanıklılık sağlanabilmesi için her iki geninde baskın olması gerektiği belirtilmiştir. Genin bir çiftinin ressessif homozigot olduğunda diğer dominant gen çiftinin etkisini örterek mercimek bitkisini patojene duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir. Sonuçlarda aynı zamanda *Lens orientalis* 'te antraknoza dayanıklılığın tek bir dominant gen çiftiyle kontrol edildiğini de rapor etmişlerdir (53).

Ford vd., *Lens culinaris*'in 16 hat ve çeşitlerinde RAPD analizi ile yapılan genetik yakınlık analizinde, bütün hatlar en yüksek 0.36 genetik uzaklık ile polimorfizm gösterdiğini belirtmişler ve bunun da sınırlı bir genetik varyasyon olduğunu kaydetmişlerdir. Toplam 45 tesadüfi dizilimli primerden 7'si belirgin ve üretilebilir bantlar vermiştir. Toplam 44 band kayıt edilmiş ve bunların 25'i polimorfizm (%57) göstermiştir. Herhangi iki çeşit veya hat arasındaki genetik varyasyonun düzeyi minimum %9 (ILL3640 ve ILX 87247) ve maksimum %46 (ILL3257 ve ILL 4532) arasında bulunmuş ve ortalaması %23 olarak kaydedilmiştir. Her bir primer 4-9 arasında kayıt edilebilir band vermiş ve bunların büyüklüklerinin 300 - 3500 baz çifti arasında olduğu rapor edilmiştir. Altmış dört birey ikişerli karşılaştırıldığında maksimum genetik uzaklık %48 olarak bulunmuştur. Dendrogram sonucunun varyeteler/ hatlar arasında kısmen düşük bir genetik mesafe (0.36) ile sıkı bir gruplanma gösterdiğini kaydetmişlerdir (54).

Bitki ıslahı programında gen kaynaklarının etkin bir şekilde kullanılması için ilk şart cins içindeki genetik varyasyonun dağılımının ve miktarının tespit edilmesidir. Bu nedenle morfolojik, biyokimyasal ve DNA markırları genetik varyasyonu belirlemek

için bir çok cins ve türde kullanılmıştır. Örneğin RAPD tekniği mercimeklerde (55), *Cynara scolymus* L.'de (56), *Stenbergia*'da (57), *Astragalus*'da (58), lahanalarda (59-60), hıyarda (14), *Staphylococcus* türleri ve prinçte (28), *Allium*'da (61), elmada (62) tür ve çeşitlerin tanımlanmasında kullanılmıştır. Yine RFLP'ler mercimekler (63) ve lahanalarda çekirdek DNA'sında (64); SSR özellikle de AT tekrarları bitkilerde (65) tür ve çeşitlerin filogenetik analizlerinin yapılmasında kullanılmıştır. Mercimek türleri ve varyeteleri de çeşitli moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmıştır (55, 66-69).

Abo-elwafa vd., RAPD markırlarını kullanarak mercimek türleri arasındaki ve mercimek türleri içindeki varyasyonu araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında 40 tane 10 bazlık polimorfik primerler kullanmışlar ve bu primerlerden 10 tanesinde 50 tane kayıt edilebilir bandlar tespit etmişler ve bunlarında %90'ının polimorfik olduğunu belirtmişlerdir. Araştırma sonucu kültür mercimeğindeki genetik varyasyonun yabani türlerine göre düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca mercimek büyüklüğüne göre küçük tohumlular ve büyük tohumlular olarak yapılan çeşit ayırımında RAPD markırlarınca bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar tür içi varyasyonun 0.000-0.316 ile en düşük kültür mercimeğinde olduğunu, kültür mercimeğinin *Lens ervoides* hariç yabani türleri *L. odomensis*, *L. nigricans*, *L. orientalis*'te ise yüksek miktarda tür içi varyasyonun olduğunu belirtmişlerdir. Fakat *Lens ervoides*'te ise tür içi varyasyonun düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak mercimek türleri içindeki varyasyonu belirlemede RAPD markırlarının kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Araştırma, kültür mercimeklerine en yakın türün *Lens orientalis* olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Araştırmacılar çalışmalardan elde ettikleri verilere göre kültür mercimeklerinde varyasyonun sınırlı olduğunu belirterek, tanımlamanın daha iyi yapılabilmesi için daha çok RAPD markırının kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (68).

Sharma vd., mercimeklerde yaptıkları araştırmada 24 tane tesadüfi dizilimli 10 bazlık primerler kullanmışlar ve 54 örnekte 88 polimorfik RAPD bandını türler arası ve türler içi varyasyonu tespit etmede kullanmışlardır. Aynı zamanda 4 primer kombinasyonundan (PstA-Mse2, PstA –Mse3, PstA –Mse4, PstA –Mse5) elde

edilen 148 AFLP bandlarını da kullanmışlar ve 148 AFLP bandının RAPD markırlarının ayıramadığı genotipleri ayırdığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar AFLP'lerin RAPD ve RFLP'lere göre daha fazla polimorfik olduğunu bu nedenle çeşitler arası ayırımı daha iyi yapabildiğini belirtmişlerdir. Sharma (1995), AFLP primerinin RAPD primerine göre 10 kat daha fazla polimorfizm verdiğini belirtmiştir. Araştırma sonucunda en yüksek genetik varyasyonun *Lens nigricans*'ta olduğunu ve bunu sırasıyla *L. ervoides*, *L. culinaris* ssp *orientalis*, büyük tohumlular (çapı 6-9mm) ve küçük tohumlular (çapı 3-6 mm)'ın izlediğini bulmuşlardır. En yüksek genetik benzerlik 0.897 ile kültür mercimeği (*Lens culinaris*) içindeki büyük tohumlular ve küçük tohumlular arasında, sonra 0.894 ile *Lens orientalis*, 0.662 ile *Lens odomensis*, 0.750 ile *Lens nigricans* ve 0.596 ile de *Lens ervoides* içinde gerçekleşmiştir (55).

Araştırmacılar RAPD yönteminin etkinliğinin izoenzimlerler ve RFLP'ler (63, 70)'den daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Erskine, mercimek populasyonlarının bölgelere göre dağılışını sıcaklığa duyarlılığına, çiçeklenme dönemindeki fotoperiyoda, tohumun çimlenmesi için toprak sıcaklığına, kışa dayanabilirliğine bağlı olduğunu ve bu gibi faktörlerin mercimeklerin bölgelere göre adaptasyonunu sağladığını belirtmiştir. Ayrıca yöresel mercimek populasyonları arasında önemli derecede heterojenlik olduğu da belirtilmiştir (2).

Ferguson vd., Nepal, Hindistan ve Pakistan olmak üzere üç Güney Asya ülkesi ve Afganistan, Bulgaristan, Şili, Mısır, Etiyopya, İran, Ürdün, Lübnan, Fas, İspanya, Suriye, Türkiye ve Yemen olmak üzere 13 ülkenin her birinden 10 örneği alarak yöresel mercimek örnekleri arasında RAPD tekniği ve izoenzim elektroforezine dayalı olarak genetik varyasyonun hesaplanmasına yönelik yaptıkları çalışmada 7 izoenzim ve 22 RAPD lokusunda polimorfizm gözlemişler ve Nei (1972)'nin formülünden hesapladıkları genetik mesafeye göre en az genetik varyasyonun Pakistan, Afganistan ve Nepal'de olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçların morfolojik markırlardan elde edilen sınırlı genetik varyasyonu

desteklediğini bildirmişlerdir. Ayrıca mercimeklerde yapılan büyük tohumlular ve küçük tohumlular sınıflandırmasının ülkeler arasında bir farklılık oluşturmadığını tespit etmişlerdir. İzoenzim çalışmalarında 12 enzim sistemi kullanmışlar. Araştırmada aspartat aminotransferaz (Aat), fosfoglikoz izomeraz (Pgi), malik enzim (Me), skimik asit dehidrogenaz (Skdh), asit fosfotaz (Aps), lösin aminopeptidaz (Lap), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (Pgd), peroksidaz (Prx), diaphoraz (Dia), aldolaz (Aldo), izositrat dehidrogenaz enzimlerini ve OPF, 1, 4, 14 ve OPS14 primerlerini kullanmışlardır. Bunlardan elde edilen sonuçlara göre Güney Asya ülkeleri dışındaki ülkeler 4 farklı grupta toplanmıştır. RAPD analizine göre 1. grupta Etiyopya ve Yemen yer almaktadır. İkinci grubu Suriye, Ürdün ve Lübnan oluşturmakta ve bu gruba RAPD sonucuna göre Fas'da girmektedir. RAPD analizine göre üçüncü grubu Avrupa grubu olan Bulgaristan ve İspanya oluşturmakta fakat izoenzim sonuçları Fas ve İspanya gen kaynakları arasında benzerlik olduğunu göstermiştir. Dördüncü grubu İran ve Mısır oluşturmuştur. İzoenzim verilerine göre Türkiye'de bu gruba dahildir, fakat RAPD sonucuna göre Türkiye Avrupa grubu ile İran ve Mısır grubu arasında yer almaktadır (1).

Sonnante ve Pignone, çoğunluğu İtalya'dan olmak üzere Akdeniz ve diğer yabancı ülkelere ait çiftçi populasyonlarını RAPDs, mikrosatellit–primerli PCR ve ISSR markırlarıyla analiz etmiş, analiz sonucu önceki iki markırın düşük düzeyde kullanılabilir polimorfik band verdiğini fakat ISSR (Inter Basit Dizi Tekrarları) markırının yüksek düzeyde polimorfizm verdiğini belirtmişlerdir. Araştırmada 46 mercimek örneği kullanılmış ve bunun 31'i İtalya'ya ait diğerlerinin de büyük bir kısmı Akdeniz ülkelerine aittir. Araştırmada 51 tane 10 baz dizilimli primer test edilmiş ve bunların içinden 12'si üretilebilir ve belirgin polimorfik bandlar vermiştir. 12 primer 57 band oluşturmuş ve bununda 31'i yani %54'ü polimorfizm göstermiştir. Etiyopya'dan gelen örnekler hariç diğerleri keskin bir grupta birbirinden ayrılmamıştır. Etiyopya örnekleri 0,718'lik bir genetik benzerlik ile diğer türlerden barizce ayrılmıştır. Araştırmada 19 mikrosatellit dizisi primer olarak kullanılmış ve belirgin 9 band elde edilmiş ve bununda 5'i (%55) polimorfizm göstermiştir. Bunlara ilaveten 20 ISSR primeri test edilmiş ve bunlardan 6 tane primer ((AG)8YG, (CA)8RY, (AC)8YA, (GA)8YT, (GT)8YC, ve BDB(CA)7) araştırmada kullanılmış

ve bu primerler toplam 74 band üretmiş ve bunlarında %65'i polimorfizm göstermiştir. Ayrıca Jaccard benzerlik indeksine göre RAPD ve ISSR markırlarının farklı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Fakat hem RAPD tekniğinde hemde ISSR tekniğinde diğer örneklerle göre en fazla farklılığı Etiyopya'dan gelen örnek göstermiştir ve ayrıca İtalyan örnekleri bir grup altında toplanmışlardır (71).

Kojima vd., buğdayda yaptığı araştırmada RAPD markırlarının daha çok kromozom üzerinde tekrarlanan bölgeleri temsil ettiğini buna karşın ISSR markırlarının RFLP'lerle ilişkili yani kodlama yapan bölgeleri temsil ettiğini göstermişlerdir (71).

Ahmad vd., RAPD tekniğini kullanarak melez azmanlığını belirlemede ve melez azmanlığını arttırmaya yönelik yaptığı araştırmada *Lens culinaris*'e ait 3 varyeteyi ve 4 yabancı türdeki genetik varyasyonu araştırmışlar ve 1 tane tesadüfi dizilimli 11 bazlık ve 14 tane de tesadüfi dizilimli 10 bazlık primerler kullanmışlardır. Bu primerlerden 158 üretilebilir ve kayıt edilebilir bandlar gözlemlemişlerdir. Araştırmalarında RAPD tekniğinin hibridlerin gücünün ölçülmesinde ve mercimek türleri içi ve türleri arası genetik varyasyonun belirlenmesinde uygun olduğu ve sonuçların morfolojik, protein analizleri ile paralel olduğu belirtilmiştir (66).

Ahmad ve McNeil, morfolojik markırlar ve çaprazlanabilirlik durumuna göre *Lens* cinsinin moleküler tekniklerden (RFLP ve RAPD) ve tohum protein elektroforezi gibi biyokimyasal markırlardan farklı bir sınıflandırma gösterdiğini belirtmiştir. Sitolojik çalışmalara ve çaprazlanabilirlik durumuna göre *Lens* cinsinin *Lens culinaris* ve *Lens nigricans* olmak üzere iki türü içerdiğini belirtmiş olup, *Lens culinaris*'in *culinaris*, *odemensis* ve *orientalis* olmak üzere 3 alt tür içerdiğini ve buna karşın *L. nigricans*'ın *nigricans* ve *ervoides* olmak üzere iki alt tür içerdiğini belirtmiştir. Ayrıca *Lens* cinsi içindeki türler arası hibridizasyon oranının türlerin genetik içeriklerine ve genetik benzerliklerine göre değiştiğini açıklamıştır. *Lens* türlerinin çaprazlanabilirlik durumlarına göre *Lens culinaris* ssp. *orientalis* ve *Lens ervoides*'in kültür mercimeği olan *Lens culinaris* ssp. *culinaris* ile rahatlıkla çaprazlanabildiğini ve sonuç olarak bu iki türü kültür mercimeğine en yakın akrabalar olarak belirlemiştir. Kültür mercimeğine ikinci en yakın akraba türler yine kolay bir şekilde çaprazlanabildiğinden dolayı *Lens odemensis* ve *Lens nigricans*

olarak tespit edilmiştir. RAPD sonuçları *Lens culinaris* ssp. *orientalis*'in kültür mercimeğine en yakın tür olduğunu belirterek her ikisinin de aynı grupta yer aldığını ve *Lens nigricans*, *Lens ervoides* ve *Lens odemensis*'in üç ayrı grup oluşturduğunu göstermiştir (67).

Ladizinsky vd., *Lens orientalis*'in kültür mercimeğine en yakın tür ve *Lens nigricans*'ın da kültür mercimeğine en uzak tür olduğunu belirtmişlerdir (66).

Van Oss vd., *Lens* cinsi içinde kloroplast DNA varyasyonunu ve evrimini 6 *Lens* türünün 30 örneğinde 21 prob ve enzim kombinasyonu ile son zamanlarda tanımlanan *Lens lamottei* ve *Lens tomentosus*'u da dahil ederek araştırmışlardır. 118 fragment kayıt edilmiş ve 26 restriksiyon kesim bölgesi mutasyonu belirlenmiş ve kloroplast DNA restriksiyon deseni *L. lamottei* ve *L. tomentosus*'un ayrı iki tür olduğunu desteklemiştir. *Lens lamottei*'nin 2 örneğinde restriksiyon bölgesinde 7 mutasyon belirlenmiş ve bunların 4'ünün bu iki örneğe özgü olduğu tespit edilmiştir. *Lens nigricans*'ta bu 7 mutasyonun hepsi, *Lens ervoides*'te ise beşi görülmüştür. En yüksek kesim bölgesi mutasyonu 21 mutasyonla *Lens nigricans*'ta görülmüş, bunların 13'ünün bu taksona özgü olduğu belirtilmiş, 10'unun ise *Lens ervoides* ve *Lens odemensis*'te ortak olduğu tespit edilmiştir. *Lens tomentosus*'un morfolojik olarak *Lens culinaris* ssp. *orientalis*'e en yakın tür olduğu belirtilmiş fakat ondan meyvesinin tüylü olması, karyotipinin farklı olması ile ayrıldığı belirtilmiştir. *Lens odemensis* örneğinde 3 mutasyon tespit edilmiş, bunların ikisinin örneklerde ortak olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen ilk mutasyonun *Lens tomentosus*'ta da olduğu, sonrakinin ise *Lens ervoides* ve *Lens nigricans* örneklerinde gözlendiği belirtilmiştir (72).

Altı *Lens* türünün otuz örneğinde kloroplast DNA'sına göre yapılan sınıflamada ilki aralarında küçük farklılıklar bulunmakla birlikte *Lens culinaris*, *Lens tomentosus* ve *Lens odemensis* ikincisi *Lens ervoides*, *Lens lamottei* ve üçüncüsü diğer türlere en uzak görünen *Lens nigricans* olmak üzere 3 farklı grup oluşturmuştur (72).

Erskine vd., yetiştirme alanının yarısının Güney Asya'da olmasına rağmen buradaki mercimek gen kaynaklarında sınırlı bir varyasyonun gözlendiğini belirtmişlerdir. Varyasyondaki azlığın ıslahın etkinliğini sınırlandırdığını, bunu aşmak ve genetik kaynakları genişletmek için bitki tanıtılması, hibridizasyon ve mutasyon ıslahına başvurulduğunu belirtmişlerdir. Batı Asya'dan ve Kuru Tarım Alanları İçin Uluslararası Araştırma Merkezi (International Center For Research in the Dry Areas = ICARDA)'dan bitki materyali getirilmiş, yapılan hibridizasyonlarla Bangladeş ve Pakistan'da yüksek verimli ve hastalıklara dayanıklı varyeteler ıslah ettiklerini belirtmişlerdir. Mutasyon ıslahı ile de yeni morfolojik markırları elde ettiklerini ve bir kaç tane ümit verici hatlar geliştirdiklerini belirtmişlerdir (73).

Emami ve Sharma, *Lens culinaris*'te 7 çaprazlamada tohum kabuğu ve kotiledon rengini araştırmışlar, ebeveyn olarak siyah, kahverengi, yeşil testa ve portakal, sarı veya koyu yeşil kotiledon rengine sahip ebeveynleri çaprazlamada kullanmışlar ve yapılan çaprazlamadan elde edilen F_1 'den elde edilen F_2 ve F_2 'den elde edilen F_3 tohumlarının analizinde siyah tohum kabuğu renginin diğer renklere dominant olmasına rağmen, F_1 ve F_2 farklı oranlarda açılım göstermesinden dolayı diğer renklere tam bir baskınlık sağlamadığını belirtmişlerdir. Yeşil veya kahverengi tohum kabuğu olanlarla yeşil veya portakal renkli tohum kabuğu olanların çaprazlandığında tohum renginin ekspresyonu kotiledon renginden etkilendiği belirtilmiştir. Çaprazlamalardan elde edilen F_2 tohumlarında tohum kabuğu yeşil olanlar her zaman yeşil kotiledonlara sahip olduğu ve hiçbir zaman portakal renkli kotiledonlara sahip olmadıkları gözlenmiştir. Yine çaprazlamalardan elde edilen F_2 tohumlarında kahverengi tohum kabuğu olanların her zaman portakal rengi kotiledonlara sahip oldukları ve asla yeşil kotiledonlara sahip olmadıkları belirtilmiştir (74).

Mercimek yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda ürün kaybına sebep olan hastalıkların başında mercimek antraknozu ve çökerten (*Fusarium vascular wilt*) hastalığı gelir (15, 53). Bayaa vd., 33 ülkeden gelen 577 mercimek örneğinin mercimek çökerten hastalığına (*Fusarium oxysporum* sp. *Lentis*) dayanıklı olup olmadığını 1993 yılında kontrol etmişlerdir. Bunlardan dayanıklılık gösteren 85 ve 3 dayanıksız örneği 1994

yılında tekrar dayanıklılık testine tabi tutmuşlar ve bunların arasından da bazı dayanıklı örnekleri belirlemişlerdir (53).

Ye vd., mercimeklerde Titore çeşidi ile *Lens orientalis*'in W63261 populasyonunun çaprazlamasından elde ettiği F₃'lerde mercimek antraknozuna dayanıklılığın genetik mekanizmasını çalışmışlardır. Dayanıklılığı iki genin sağladığı, bunlardan birinin büyük etkiyi yapan dominant bir gen (A) diğerinin yine dominant bir gen (B), fakat az etki yaptığını belirtmişlerdir. Bu genlerden her birinin tek başına dayanıklılık sağlamadığını, yine bir genin birden fazla kopyalarının da diğer gen olmadan dayanıklılık sağlamadığını belirtmişlerdir (75).

Zavodna vd., yaptığı çalışmada birbirlerine çok yakın olan mercimek çeşitleri arasındaki genetik varyasyonu belirlemek için VNTR ve AFLP tekniklerini kullanmışlardır ve bu tekniklerin tohumdaki depo proteinleriyle yapılan ayırma göre daha etkili olduğu belirtilmiştir (76).

Bu tez çalışmasının amacı da Türkiye'de üretimi yapılan ve *Lens culinaris* türü içerisinde yer alan 14 mercimek çeşidi ve 36 mercimek hattı arasındaki genetik farklılığı RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemleriyle belirlemektir. Literatür özetinde belirtildiği gibi yabancı ülkelerdeki bazı araştırmacılar genetik çeşitlilikle ilgili çalışmalarına Türkiye'den bazı mercimek örneklerini dahil etmelerine rağmen, ülkemizde ticari amaçlı olarak üretimi yapılan mercimek çeşitleri ve ıslah hatlarına ait DNA düzeyinde şu ana kadar bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma hem ülkemiz mercimek çeşitlerinin ve hatlarının DNA düzeyinde genetik profilinin belirlenmesine hemde çeşitler ve hatlar arasındaki genetik ilişkinin tespit edilmesine katkı sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. RAPD yönteminde kullanılan materyal

Araştırmada *Lens culinaris* Medik. türüne ait 14 çeşit ve 36 hat kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Mercimek hatları ve çeşitlerine ait örnekler Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (Ankara)'nın Haymana'daki arazisinden alınmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Mercimek hatları ve çeşitlerinin tarladaki genel görünüm

Çizelge 3.1. RAPD yönteminde kullanılan hat ve çeşitlerin adları

Hat ve Çeşit Adı	Hat ve Çeşit Adı
Akm 613	Akm 565
Akm 606	Akm 563
Kafkas	Akm 602
Özbek	Akm 272
Akm 2202-11	Akm 427
Akm 2202-10	Akm 604
Akm 2206-2	Akm 2202-2
Yerli Kırmızı	Akm 2204-6
Akm 242	Akm 105
Akm 235	Akm 2202-7
Çiftçi	Akm 237
Ali Dayı	Akm 583
Akm 2204-5	Akm 493
Malazgirt	Akm 574
Sultan	Akm 2201-11
Kayı	Akm 2204-4
Emre-20	Akm 2204-10
Fırat	Akm 434
Meyveci-2001	Akm 492
Erzurum	Akm 2201-8
Pul 11	Akm 600
Seyran	Akm 2206-3
Akm 610	Akm 2202-6
Akm 612	Akm 2206-5
Akm 397	Akm 2202-1

3.1.2. Kullanılan mercimek çeşitlerinin özellikleri

Seyran 96

Kışlık, tohum rengi gri, üzeri siyah noktalı, kotiledon rengi kırmızı, tohum çapı 4-5.2 mm, tohum kalınlığı 2.6-3.1 mm, kışa dayanımı orta, meyve boyu 12-13 mm, genişliği 6-8 mm, tohum sayısı 2, kurağa dayanımı iyi, erkenci, ortalama verimi 152.2 kg/da, 0.028 gr/dane, şişme indeksi 0.250 ve kuru pişirme süresi 32 dakikadır.

Kayı 91

Kışlık yeşil, standartlara göre iyi, uzun boylu, makinalı hasada uygun, 1000 dane ağırlığı 52.8 (standart 40.1) gr ve geçit bölgeleri için ıslah edilmiştir.

Sazak 91

En iri taneli kırmızı mercimek çeşididir. Standartlara göre uzun, ilk bakla yüksekliği fazla, bakla sayısı fazla, kalite yönünden üstün olup geçit bölgeleri için ıslah edilmiştir.

Fırat 87

Üstün verimli olup (200 kg/da) standartlara göre %19 fazla verim vermektedir. Yatmaya ve kışa dayanıklıdır. Kotiledon rengi kırmızıdır.

Malazgirt 89

Yazlık kırmızı mercimek çeşididir. Verimi standartlardan yüksek, solgunluğa dayanıklı ve dane dökme bakımından standartlardan iyidir.

Erzurum 89

Yazlık yeşil mercimek çeşididir. Verim bakımından standartlardan 20-25 kg/da daha fazladır. Tane çapı standartların gerisinde olup, diğer özellikleri bakımından yazlık yeşil mercimeklerle arasında fazla bir fark yoktur.

Sultan 1

Tane kısmında %26-28 protein vardır. Yazlık, yeşil, erkenci kurağa dayanıklı, yatmaya eğilimi göstermemekte olup, seleksiyonla ıslah edilmiştir. Verim bakımından tatmin edicidir, tane dökmediği için harman olma kabiliyeti iyidir. İç Anadolu ve İç Anadolu ile Karadeniz ve Akdeniz bölgeleri arasında kalan yerler için ıslah edilmiştir.

Emre 20

Kırmızı, yazlık bir çeşittir. Seleksiyonla ıslah edilmiş olup Orta Anadolu koşullarına uygundur.

Pul 11

Tane kısmında %25-28 protein içerir, kışlık bir çeşit olup kotiledon rengi kırmızıdır.

Ali Dayı

Morfolojik özellikleri bakımından incelendiğinde bitki boyu 9 cm, bitki büyüme şekli diktir. Tane özellikleri bakımından ise 1000 tane ağırlığı 50 gr, tohumun kabuk rengi kahverengi ve kotiledon rengi ise kırmızıdır. Tarımsal özellikleri bakımından yazlık bir çeşittir. Teknolojik özellikleri bakımından ise su alma kapasitesi 0.052 gr/tane, su alma indeksi %1.072, şişme kapasitesi 0.040 ml/tane, şişme indeksi %1.9 ve elek değerleri, 5 mm'lik elekte %46.8 ve 4.5 mm'lik elekte %53.0'dür. Verim bakımından incelendiğinde tescil denemelerindeki ortalama verimi 145.8 kg/da olup, verim potansiyeli 268.8 kg/da'a kadar çıkmaktadır. Orta Anadolu Bölgesi koşullarına tavsiye edilen bir çeşittir (77).

Meyveci 2001

Morfolojik özellikleri bakımından incelendiğinde bitki boyu 29 cm, bitki büyüme şekli diktir. Tane özellikleri bakımından ise 1000 tane ağırlığı 79 gr, tohumun kabuk rengi yeşil ve kotiledon rengi ise sarıdır. Tarımsal özellikleri bakımından yazlık bir çeşittir. Teknolojik özellikleri bakımından ise su alma kapasitesi 0.056 gr/tane, su alma indeksi %0.813, şişme kapasitesi 0.069 ml/tane, şişme indeksi %2 ve elek değerleri; 7 mm'lik elekte %11.3 ve 6 mm'lik elekte %74.1'dir. Verim bakımından

incelendiğinde tescil denemelerindeki ortalama verimi 121.3 kg/da olup, verim potansiyeli 143.3 kg/da'a kadar çıkmaktadır. Orta Anadolu Bölgesi koşullarına tavsiye edilen bir çeşittir (77).

Çiftçi

Morfolojik özellikleri bakımından incelendiğinde bitki boyu 39 cm, bitki büyüme şekli diktir. Tane özellikleri bakımından ise 1000 tane ağırlığı 40.4 gr, tohumun kabuk rengi gri ve kotiledon rengi ise kırmızıdır. Tarımsal özellikleri bakımından kışlık bir çeşittir. Teknolojik özellikleri bakımından ise su alma kapasitesi 1.115 gr/tane, su alma indeksi %0.816, şişme kapasitesi 0.020 ml/tane, şişme indeksi %1.6 ve elek değerleri, 4.5 mm'lik elekte %56 ve 4 mm'lik elekte %34.7'dir. Verim bakımından incelendiğinde tescil denemelerindeki ortalama verimi 173 kg/da olup, verim potansiyeli 288 kg/da'a kadar çıkmaktadır. Antraknoza orta derecede hassastır. Orta Anadolu Bölgesi koşullarına tavsiye edilen bir çeşittir (77).

Özbek

Morfolojik özellikleri bakımından incelendiğinde bitki boyu 38 cm, bitki büyüme şekli diktir. Tane özellikleri bakımından ise 1000 tane ağırlığı 37 gr, tohumun kabuk rengi gri ve kotiledon rengi ise kırmızıdır. Tarımsal özellikleri bakımından kışlık bir çeşittir. Teknolojik özellikleri bakımından ise su alma kapasitesi 0.027 gr/tane, su alma indeksi %0.765, şişme kapasitesi 0.031 ml/tane, şişme indeksi %1.5 ve elek değerleri, 4.5 mm'lik elekte %36.5 ve 4 mm'lik elekte %58.7'dir. Verim bakımından incelendiğinde tescil denemelerindeki ortalama verimi 155.8 kg/da olup, verim potansiyeli 267 kg/da'a kadar çıkmaktadır. Antraknoza orta derecede toleranslıdır. Orta Anadolu Bölgesi koşullarına tavsiye edilen bir çeşittir (77).

Kafkas

Morfolojik özellikleri bakımından incelendiğinde bitki boyu 40 cm, bitki büyüme şekli diktir. Tane özellikleri bakımından ise 1000 tane ağırlığı 36 gr, tohumun kabuk rengi kahverengi ve kotiledon rengi ise kırmızıdır. Tarımsal özellikleri bakımından kışlık bir çeşittir. Teknolojik özellikleri bakımından ise su alma kapasitesi 0.031 gr/tane, su alma indeksi %0.733, şişme kapasitesi 0.031 ml/tane, şişme indeksi %1.9

ve elek değerleri, 4.5 mm'lik ekte %31.3 ve 4 mm'lik ekte %64.2'dir. Verim bakımından incelendiğinde tescil denemelerindeki ortalama verimi 170.5 kg/da olup, verim potansiyeli 315 kg/da'a kadar çıkmaktadır. Antraknoza orta derecede toleranslıdır. Orta Anadolu Bölgesi koşullarına tavsiye edilen bir çeşittir (77).

3.1.3. SDS-PAGE yönteminde kullanılan materyal

SDS-PAGE yöntemiyle protein analizinde *Lens culinaris* (Medik.) türüne ait 14 çeşit ve 4 hat kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Mercimek hatları ve çeşitlerine ait örnekler Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'nden (Ankara) alınmıştır.

Çizelge 3.2. Tohum depo protein profilleri çıkarılan hat ve çeşitlerin adları

Hat ve Çeşit Adı	Hat ve Çeşit Adı
Kafkas	Çiftçi
Özbek	Ali Dayı
Yerli Kırmızı	Malazgirt
Emre	Sultan
Fırat	Kayı
Meyveci	Akm 242
Erzurum	Akm 235
Pul 11	Akm 434
Seyran	Akm 237

RAPD yönteminde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

- %2 CTAB DNA izolasyon tamponu (pH 8.0)	: 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, %2 PVP, %3'lik 2- Mercaptoethanol
-Tris-EDTA (TE) Tamponu	: 10 mM Tris, 1 mM EDTA ve pH 8.0
-Stok nükleotid karışımı	: 1000 µM lık dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP,dTTP)
-Stok primer çözeltisi	: 100 µM
-10X Taq polimeraz tamponu	: 100 mMTris-HCl
-MgCl ₂	: 25 mM
-Stok DNA çözeltisi	: 100 ng
-Tris borat tamponu	: 90 mM tris borat, 2mM EDTA ve borik asit kullanılarak pH:8.2'ye ayarlandı
-Etidyum bromür çözeltisi	: 10 mg / ml
-Yükleme tamponu	: %25 bromofenol mavisi, %25 xylene cyanol , %30 gliserol ve %100'e TE tamponu ile tamamlanır
-Agaroz jeli	: %3'lük agaroz jeli (TBE içinde)
-DNA yıkama çözeltisi	: %76 etanol ve 10 mM amonyum asetat
-10 X Taq polimeraz tamponu	: 100 mM Tris-HCL, 500 mM, KCL ve %1 Triton X-100
-PEX tamponu	: 6.25 mM PEX, 700 mM NaCl, 10 mM EDTA

Protein elektroforezinde kullanılan çözeltiler

- Ekstraksiyon tamponu : 0.5 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 SDS, %1 2-Merkaptoetanol, %74 üre
- Elektroforez tampon çözeltisi : 0.025 M Tris, 0.192 M Glisin, %0.1 (w/v) SDS ve pH:8
- Örnek tamponu : 0.5 M Tris-HCl (pH:6.8), Gliserol, SDS, 2-Merkaptoethanol, Bromfenol mavisi
- Ön ayırıcı jel çözeltisi : %3 (w/v) akrilamid, %0.043 (w/v) N’N’metilenbisakrilamid, 1 M Tris (pH:6.8), %0.1 (w/v) SDS
- Ayırıcı jel çözeltisi : %10 (w/v) akrilamid, %0.06 (w/v) N’N’metilenbisakrilamid, 1 M Tris (pH:8.8), %0.1 (w/v) SDS
- Stok boya çözeltisi : Coomassie Brilliant Mavisi G-250 (2gr boya + 56 ml derişik H₂SO₄’le 2 litreye tamamlanmıştır)
- Boyama çözeltisi : 300 ml stok boya çözeltisi, 35 ml 10 N KOH, 50 ml’lik %100’lük trikloro asetik asit (TCL) (w/v)

3.2. Metod

3.2.1. DNA izolasyonu

Mercimeğin her bir kültür hattı ve çeşidinden alınan 8-10 bitkinin taze yaprakları kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır (Resim 3.2.).



Resim 3.2. DNA izolasyonunda kullanılan taze yapraklar

Potasyum etil santojenat (PEX) yöntemi

DNA izolasyonunda ilk olarak Potasyum Etil Santojenat (PEX) yöntemi (78) kullanılmıştır. Her hat ve çeşidin taze yapraklarından 0.5-0.75 gr yaprak mikrosantrifüj tüplere konmuştur. Tüplere 50 µl PEX izolasyon tamponu ilave edilerek dokular parçalayıcı ile ezilmiştir. Dokular parçalandıktan sonra tüplere tekrar 450 µl PEX tamponu konmuş ve tüpler kısa bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Tüpler su banyosunda 65 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra 12000 rpm de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı (supernatant) temiz 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra tüpler 6:1 oranında etanol ve 7.5 M amonyum asetat ile doldurularak tüpler oda sıcaklığında 30

dakika bekletilmiştir. Tüpler birkaç kez ters-düz edildikten sonra 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı döküldükten sonra tüplere önce 300 µl TE tamponu, sonrada 100 µg/ml RNAaz A ilave edilerek 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler 14000 rpm de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üstteki sıvı temiz mikrosantrifüj tüplerine konarak üzerleri 10:1 oranında etanol ve 3 M sodyum asetat karışımı ile doldurulmuştur. Tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı kısım dökülerek tüplerdeki DNA pelleti %70’lik etanol ile yıkanmıştır. Alkol dökülerek tüpler kağıt havlular üzerinde ters çevrilerek kurutulmaya bırakılmıştır. DNA kurutulduktan sonra pelletin büyüklüğüne göre değişmekle birlikte 50-200 µl arasında TE tamponu konarak kullanılıncaya kadar –20°C’de saklanmıştır.

Rogers ve Bendich yöntemi

Rogers ve Bendich yönteminde (79) her hat ve çeşitten 8-10 bitkinin yaprağı, porselen havanda sıvı azot içinde ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki 1gr materyal 50 ml’lik tüplere konarak üzerine 20 ml 2X CTAB izolasyon tamponu ilave edilmiştir. Bu tampona %2’lik askorbik asit ve %1’lik sodyum bisülfid eklenmiştir. Bu karışım 15 saniye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Tüpler 60 °C 1 saat kadar bekletilerek her 10 dakikada bir karıştırılmıştır. Daha sonra tüplerin üzerine 20 ml kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek 15 saniye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Tüpler buzda 10-30 dakika bekletildikten sonra 9000 rpm de 9 dakika santrifüj yapılarak supernatantın temizliğine göre üstte kalan sıvı (supernatant) kısmı yeni mikrosantrifüj tüplerine alınarak kloroform:izoamil basamağı tekrarlanmıştır.

Üsteki süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarılarak 3 µl RNAaz A (30 mg/ml) eklenerek 37 °C’de 1 saat bekletilmiştir. Tüplere süpernatant miktarı kadar yaklaşık 10-20 ml arası soğuk izoproponal eklenerek buzdolabında +4°C’de 30 dakika kadar saklandıktan sonra 9000 rpm de 9 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı atılarak tüplerin dibinde beyaz renkli DNA pelleti elde edilmiştir. Tüplerin içine yaklaşık 10 ml yıkama çözeltisi ilave edilerek tüpler birkaç kez ters düz edilerek oda sıcaklığında 30 dakika kadar bekletildikten sonra üstteki sıvı dökülerek tekrar %70 ve %95’lik etanolde 30 dakika bekletilerek yıkanmıştır. Daha sonra üstteki yıkama sıvısı dökülerek, DNA miktarına göre 200-500 µl arası TE eklenip, DNA’lar kullanıma hazır halde –20°C’ de saklanmıştır.

3.2.2. DNA miktarı ve temizliği

DNA miktarı ve temizliği Eppendorf marka spektrofotometre (BIOPHOTOMETER)’ de ölçülmüştür. DNA miktarı RAPD reaksiyonları için 100 ng’a seyreltilmiştir. DNA miktarları hesaplanırken $C = A_{260} \times F \times SF$ formülü kullanılmıştır. C = Hesaplanan miktar, A_{260} = 260 nm dalga boyundaki absorbansı, F = faktörü ve SF ise seyreltme faktörünü göstermektedir (çift zincirli DNA için 50 µg/ml) (80).

DNA miktarları 100-5000 µg/ml arasında sonuçlanmıştır (Çizelge 3.2.). DNA’nın temizliği için ise $A_{260/280}$, $A_{260/230}$ ve A_{320} ye bakılmıştır. Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlarda 230 nm dalga boylarında pik yapmaktadırlar. Temiz bir DNA da $A_{260/280}$ oranı 1.8 ile 2.00 arasında; $A_{260/230}$ oranı ise 2.00 dan büyük; A_{320} ise sıfıra yakın olmalıdır (80).

3.2.3. Primer seçimi

Mercimeklerde daha önce yapılmış benzer çalışmalardan (51, 54, 66, 68, 71) yararlanılarak alınan 10 baz dizisine sahip rastgele dizilimli 45 primer denenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Mercimek hatlarında ve çeşitlerinde denenilen primerler ve dizileri

Primer Adı	Primerin Baz Dizisi	Primerlerin % G+C İçerikleri
OPA 02	TAGCGAGCTG	60
OPB 08	GTCCACACGG	70
OPB 11	GTAGACCCGT	60
OP 01	CCTGTAGTGG	60
OP 02	TACCTTCCGT	50
OP 03	GTCCGTTGGG	70
OP 04	GTTAGGTCGT	50
OP 05	TCTCTGTCCC	60
OP 06	TCGCCCCATT	60
OP 07	CGTGGTTCCC	70
OP 08	GTCCCGTTAC	60
OP 09	ACGCCCTAGT	60
OP 10	TTTCACATGG	40
OP 11	CTGTGCTGTG	60
SC 10-22	GTAGGCGTCG	70
SC 10-23	GGCTCGTACC	70
SC 10-38	GACCCCGGCA	80
SC 10-43	GCCTGGTTAC	60
SC 10-48	CTGGTATGCG	60
SC 10-53	CAGGGGACGA	70
SC 10-65	CAGGGGTGAT	60
SC 10-76	CGCAGACTTG	60
SC 10-77	AGATAGCGGG	60
SC 10-79	CGCCACGTTC	70
SC 10-82	GCCGTGAAGT	60
SC 10-91	CTCGACTAGG	60
SC 10-93	GCCTCCTACC	70
SC 10-94	GGGGTCGATT	60
SC 10-95	GGCGTCGGGG	90
SC 10-99	CAGGGCCGCT	80
OPB-4	GGACTGGAGT	60
OPG-13	CTCTCCGCCA	70
OPH-9	TGTAGCTGGG	60
OPH-12	ACGCGCATGT	60
OPR-3	ACACAGAGGG	60
OPU-16	CTGCGCTGGA	70
OPW-6	AGGCCCGATG	70
OPA-01	CAGGCCCTTC	70
OPA-10	GTGATCGCAG	60
OPA-11	CAATCGCCGT	60
OPA-12	TCGGCGATAG	60
OPA-17	GACCGCTTGT	60
OPB-05	TGCGCCCTTC	70
OPB-10	CTGCTGGGAC	70

3.2.4. RAPD-PCR reaksiyonları

RAPD reaksiyonları Biometra marka T-GRADIENT thermalcycler'da 0.2 ml'lik ince cidarlı tüplerde gerçekleştirilmiştir. RAPD reaksiyonları her bir tüp içinde 25 µl'ye ayarlanmıştır. 25 µl'lik reaksiyon hacmi 12.75 µl iki kez distile edilmiş su, 2.5 µl 10x Taq polimeraz tamponu, 3.75 µl dNTPs (150 µM), 2.5 µl primer, 0.4 µl Taq polimeraz (5 U/µl), 1 µl DNA (100 ng) ve 2 µl MgCL₂ (2.5000 µM)'den oluşmuştur. En son reaksiyon karışımının konsantrasyonu 10 mM Tris-HCL, 50 mM KCL ve %0.1 Triton X-100, 9µM primer, 150µM dNTPs, 2mM MgCL₂, 100 ng DNA ve 2 U Taq polimeraz olarak ayarlanmıştır.

RAPD reaksiyon karışımının üzerine 25 µl mineral yağı konarak reaksiyonlar T-GRADIENT thermalcycler'da gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu toplam 44 devirde yapılmıştır. İlk önce, 94 °C'de 2 dakikalık bir ön denatürasyon yapılmış olup 44 deviri kapsayan reaksiyon döngüleri: 94°C' de 1 dakika denatürasyon sıcaklığı, kullanılan primerlere göre farklı derecelerde 1 dakikalık primer birleşme sıcaklığı (31-46°C) ve 72 °C'de 2 dakikalık uzatma sıcaklığından oluşmuştur. En son aşamada da sentez için 72°C'de 5 dakikalık bir son uzatma sıcaklığı uygulanmıştır.

Araştırmada kullanılan 10 primerin yapışma sıcaklıkları :

OPB05 primerinde 31°C, OPB10 primerinde 39°C, OPA17 primerinde 38°C, OPC02 primerinde 40°C, SC1091 primerinde 46°C, OPU16 primerinde 34°C, OPB07 primerinde 36°C, SC1079 primerinde 42°C, OP06 primerinde 40°C ve OP04 primerinde ise 30°C'ye ayarlanmıştır

3.2.5. Bandların boyanması

RAPD reaksiyonlarından oluşan ürünler %3'lük 20X20 cm lik agaroz (1:1 Sea Kem LE : Nuisieve) jelinde elektroforeze tabi tutularak 85 voltda 3 saat yürütülmüştür. Ayırıştırılan RAPD bandları agaroz jeline 0.5-1 µg/ml olarak ilave edilen etidyum

bromür ile boyanarak görüntüleme sisteminde (UVP Laboratory Products) fotoğraflanmıştır (81).

3.2.6. RAPD-PCR bandlarının büyüklüğü

RAPD bandlarının büyüklüklerini belirlemek için 16 fragment içeren ‘Directload Wide Range’ DNA markırı kullanılmıştır. Bu fragmentler 50-10.000 baz çifti arasındadır. Bu markır jelde yürütüldüğünde aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1400, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000 ve 10.000 baz çifti verecek şekilde fragmentlerine ayrılmaktadır. Polimorfik RAPD bandlarının büyüklükleri DNA markırındaki bandların büyüklükleri ile kıyaslanarak yapılmıştır.

3.2.7. RAPD-PCR polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması

RAPD bandları 1 ve 0 olarak kayıt edilmiş olup, ‘1’ bandın varlığını ‘0’ ise bandın yokluğunu göstermektedir. Mercimek hatları ve çeşitleri arasındaki benzerlik ilişkilerinin belirlenmesinde polimorfik ve monomorfik bantlar birlikte değerlendirilmiştir. Mercimek örnekleri arasındaki benzerlik ilişkileri SPSS paket programındaki (82) analiz, sınıflandırma ve hiyerarşik sınıflandırma komutları içerisinde yer alan Öklid (Euclidean distance) mesafesine göre belirlenmiştir.

$$\text{Öklid mesafesi} = d(x,y) = \|x-y\|^2$$

Öklid mesafeleri kullanılarak yapılan kümeleme analizi sonucu mercimek hatları ve çeşitleri arasındaki benzerlik ilişkisini gösteren dendrogram yapılmıştır.

3.3. Mercimek hatları ve çeşitlerinden izole edilen tohum proteinlerine SDS-PAGE uygulaması

Her bir mercimek hat ve çeşidinden alınan 5-10 tohumun proteinine SDS-PAGE uygulanması Laemli yöntemine göre yapılmıştır (83). SDS-PAGE elektroforezinde,

200 x 200 mm boyutlarında ve dikey konumda olan bir elektroforez cihazı (Owl Separation System, P10DS, 147566) kullanılmıştır.

Ayırıcı jel çözeltisine 0.25 g/lt amonyum persülfat (APS) eklenerek ve 0.5 ml/lt tetrametilen diamiit (TEMED) eklenerek 160 x 160 x 1.0 mm'lik kalıba dökülmüştür. Polimerleşme gerçekleştikten sonra ön ayırma jeline 0.375 gr/lt APS ve 0.75 ml/lt TEMED eklenerek, ayırma jeli üzerine dökülmüştür. Elektroforez işlemi bandları 20 mA/jel sabit akımda 6-8 saat yürütülerek yapılmıştır. Jeller elektroforez işleminden sonra, bir gece boyama çözeltisinde bekletilerek boyanmıştır. Boyaması yapılan jeller, %10'luk TCA ve %33'lük derişik metanol içeren boya giderme çözeltisine alınmıştır. Jeller saf su ile birkaç kez yıkandıktan sonra fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflardan polimorfizm gösteren protein bandları bir ve sıfır olarak okunmuştur.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. RAPD-PCR Tekniği Kullanılarak Mercimek Hatları ve Çeşitlerinin Aralarındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi

Bitki ıslahı programında gen kaynaklarının etkin bir şekilde kullanılabilmesi için gen kaynaklarındaki ve kültür hatlarındaki genetik çeşitliliğin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada mercimek hatları ve çeşitlerindeki genetik çeşitlilik SDS-PAGE ve RAPD tekniği ile tespit edilmiştir.

4.1.1. DNA izolasyonu

Mercimek hatları ve çeşitlerine ait örneklerden ilk olarak Potasyum Etil Santojenat (PEX) tamponu (78) kullanılarak DNA izole edilmiştir. Bu yöntemin seçilmesinin amacı mercimek materyalinin sıvı azot içinde ezilmesine gerek duyulmaması olmuştur. Fakat bu yöntemle izole edilen mercimek DNA'larında kırılmalar meydana gelmiştir.

PEX yöntemiyle izole edilen mercimek DNA'ları %1'lik agaroz jelinde yürütüldüğünde kırılma gösteren DNA'larda çizgi şeklinde tek bir band elde edilemeyerek bandlar kuyucuklar boyunca dağılım göstermiştir.

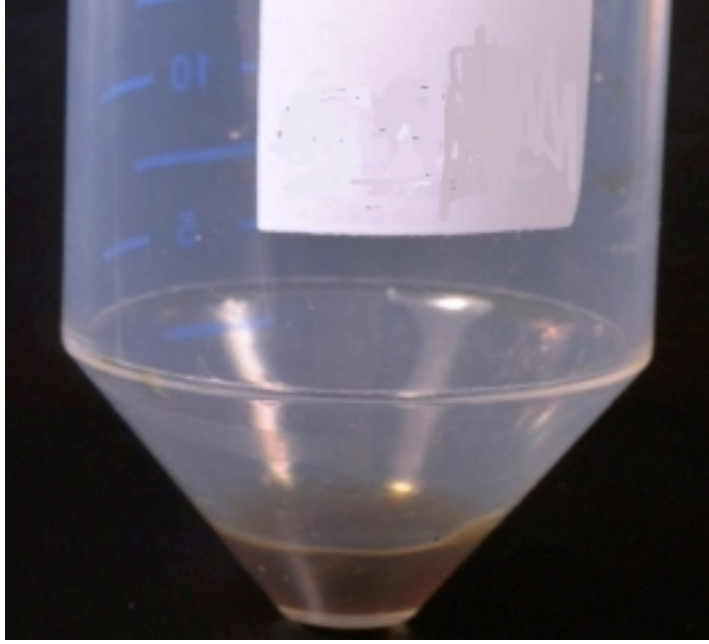
DNA çok kolay bir şekilde kırılabilirdiğinden dolayı, Wilson ve Walker (32)'ın belirttiği gibi DNA'da meydana gelen bu kırılmaların sebepleri arasında DNaz'lar ve izolasyon sırasında uygulanan fiziksel güç olabilmektedir. DNA izolasyonu sırasında dokuları ezmek için sıvı azot kullanılmadığından dolayı dokuların parçalanmasıyla aktif hale geçen DNaz'lar DNA'nın kırılmasına neden olmuş olabilirler.

Weising vd., RAPD yönteminde ne kadar saf ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA izole edilebilirse bandların belirginliğinin ve üretilebilirliğinin o derece arttığını belirtmişlerdir (31). Mercimek hatları ve çeşitlerinde yapılan araştırma sonuçları da Weising vd., nin (31) ve Penner' in bulgularıyla (30) uyum içindedir. Araştırmacılar RAPD yönteminde ne kadar saf ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA izole edilebilirse

bandların belirginliğinin ve üretilebilirliğinin o derece arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca Weising vd. (1995), RAPD yönteminde DNA'nın az miktardaki parçalanmasının amplifikasyon profilinin değişmesine sebep olduğunu, DNA'daki yüksek miktarda parçalanmanın ise amplifikasyonun yapılamamasına yani PCR ürününün oluşmamasına neden olduğunu belirtmişlerdir. PEX tamponu kullanılarak izole edilen mercimek DNA'larında kırılmalar meydana gelmiş olup, bu DNA'larda yapılan optimizasyon çalışmalarının hiç birinde amplifikasyon ürünü elde edilememiştir.

4.1.2. DNA miktarı ve saflığı

PEX metoduyla parçalanmamış tek bir çizgi halinde DNA izole edilememesinden dolayı, daha sonra bir başka DNA izolasyon metodu olan CTAB metoduyla, çeşitler ve hatlarda DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. %2 CTAB (79) tamponu kullanılarak, buna %2'lik polivinilpyrrolidon eklenmiştir. Bu yöntemin sonucunda izole edilen DNA'larda ise kararma meydana gelmiştir. Weising'in de belirttiği (77) gibi DNA'nın kararması polifenollerden ve quinonik bileşiklerden dolayı olabilmektedir.



Şekil 4.1. CTAB yöntemiyle izole edilen DNA’da meydana gelen kararma

Araştırma sonuçları fenolik bileşikler tarafından DNA’larda meydana gelen kararmaların, PCR amplifikasyonunu etkilediğini hatta hiç amplifikasyon yapılamadığını ortaya koymuştur.

Polifenollerin zararlı ve oksitleyici etkisi genellikle izolasyon tamponuna (1) %1-2 düzeyinde bovin serum albumin (BSA), polivinilpyrrolidon gibi polifenol tutucuların, (2) izolasyon tamponuna dietildithiokarbomik asit (DIECA) gibi fenoloksidaz inhibitörlerinin ve (3) sodyum bisülfid, sistein, askorbik asit, 2-merkaptoethanol gibi antioksidantların eklenmesiyle ortadan kaldırılabilir (31).

CTAB metoduyla izole edilen DNA’larda meydana gelen kararma sorunu, Rogers ve Bendich’in %2’lik CTAB tamponuna (79) %2’lik askorbik asit ve %1’lik sodyum bisülfid ilave edilerek çözülmüştür. Sonuç olarak PCR amplifikasyonu DNA’da kararma sorunu ve kırılma sorunu çözüldükten sonra yapılabilmektedir.

Rogers ve Bendich'in %2'lik CTAB metoduyla izole edilen DNA'ların miktarları, DNA'nın proteinlerce ve karbonhidratlarca kontaminasyon durumları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde DNA miktarı 20 µg ile Akm 434 ve 237 hatlarında en az bulunurken, Seyran çeşidinde ise 1820 µg ile en yüksek bulunmuştur. DNA'nın proteinlerce saflığı yani $A_{260/280}$ oranı ise Akm 2202-6 hattında 1.24 ile en az, Akm 493'te ise 2.9 ile en yüksek bulunmuştur. Geriye kalan hatlar ve çeşitlerin büyük bir kısmında $A_{260/280}$ oranı 1.80 ile 2.00 arasında bulunmuştur. DNA'nın karbonhidratlarca saflığı yani $A_{230/260}$ oranı Akm 2202-10 hattında 0.11 ile en az bulunurken, Akm 427 hattında ise 2.94 ile en yüksek bulunmuştur. Tablodan da görüldüğü gibi $A_{230/260}$ oranı hatlar ve çeşitlerin büyük bir kısmında 2.00'dan aşağı bulunmuştur.

Fritsch vd., bazı primerlerin DNA'nın saf olmamasından dolayı zayıf bandlar verdiğini ve bu nedenle de bazı primerlerin DNA'nın temizliğine diğer primerlerden daha hassas olduğu tespit edilmiştir. DNA'nın saflığının artırıldığında bandlarda bir iyileşmenin olduğu kaydedilmiştir (38). Araştırmanın bulguları da Fritsch vd. (1993)'nin sonuçlarına paralellik göstermektedir. DNA'nın protein ve karbonhidrat ile kontaminasyonunun PCR amplifikasyonunu zayıflattığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Hatlar ve çeşitlerde DNA miktarları ve saflıkları

Hatlar ve Çeşitler	DNA miktarı (µg/ml)	A _{260/280}	A _{230/260}
Akm613	62	1.58	2.17
Akm 606	668	2.04	2.27
Kafkas	23	1.66	2.91
Özbek	714	2.12	1.04
Akm 2202-11	506	1.59	1.50
Akm 2202-10	30	2.88	0.11
Akm 2206-2	109	2.17	1.15
Yerli Kırmızı	1091	1.73	1.64
Akm 242	35	2.01	0.52
Akm 235	240	1.80	1.0
Çiftçi	1744	1.55	2.08
Ali Dayı	685	1.81	1.80
2204-5	198	1.89	1.54
Malazgirt	310	1.89	2.03
Sultan	1773	1.68	1.73
Kayı	1527	1.86	1.87
Emre	1377	1.58	1.31
Fırat	486	1.75	1.5
Meyveci	564	1.68	1.51
Erzurum	1013	1.72	2.72
Pul 11	43	2.64	0.54
Seyran	1820	1.70	1.59
Akm 610	119	2.11	1.89
Akm 612	77	2.11	2.0
Akm 397	486	1.73	1.99
Akm 2206-5	704	1.49	1.16
Akm 615	141	1.89	0.89

Çizelge 4.1. (Devam) Hatlar ve çeşitlerde DNA miktarları ve saflıkları

Akm 2206-3	266	2.08	0.81
Akm 565	988	1.92	0.77
Akm 563	183	1.97	1.77
Akm 602	86	1.89	0.71
Akm 272	908	1.52	0.77
Akm 427	370	1.97	1.31
Akm 604	806	1.89	2.94
Akm 616	161	1.86	1.23
Akm 2204-6	76	2.60	1.14
Akm 105	97	2.64	0.94
Akm 272	174	2.08	1.23
Akm 237	20	1.70	1.43
Akm 583	270	1.89	1.36
Akm 493	87	2.9	0.87
Akm 574	196	1.38	0.92
Akm 2201-11	90	2.49	1.55
Akm 2204-4	246	1.91	1.56
Akm 2204-10	131	2.33	1.21
Akm 434	20	2.1	1.45
Akm 492	198	1.74	1.26
Akm 2201-8	704	1.79	1.54
Akm 600	141	1.84	0.63
Akm 2202-6	266	1.24	1.06

4.1.3. Primer seçimi

Toplam 45 primer araştırmada denenmiş olup, bunlar arasından üretilbilirliği en yüksek olan, polimorfik 10 primer araştırmada kullanılmıştır. Kırk beş primerin denenmesi sırasında Akm 606 hattı kullanılmıştır. Bu hattın seçilmesinin nedeni DNA okumasının, $A_{260/280}$ ve $A_{230/260}$ oranlarının literatürde belirtilen optimum değerlerle (80) uyum içinde olmasındandır.

Skroch ve Nienhuis, *Phaseolus vulgaris*'te RAPD bandlarının üretilbilirliğini ve bandların kayıt edilmesi sırasında oluşan hatayı araştırmış olup, kayıt etme hatasını %2 olarak belirtmişlerdir. RAPD bandlarının üretilbilirliği üzerinde RAPD primerlerinin etkisinin önemli olduğu vurgulanarak ve net band veren primerler seçilerek üretilbilirliğin artırıldığı belirtilmiştir (41).

Araştırmada kullanılan 10 primerin parlaklığı ve netliği de birbirinden farklılık göstermektedir. OPB10, OPB5, OPC2, OPU16 ve SC1091 primerleri OP04, OP06, SC1079, OPA17 ve OPB7 primerlerine göre daha parlak ve daha net polimorfik bandlar vermiştir. Araştırmadan elde edilen bulgular Skroch ve Nienhuis'un sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Üretilbilir RAPD primerleri seçilerek hem tekniğin beraberinde getirdiği hatalar azaltılabilir hem de laboratuvarlar arasında ve içinde RAPD bandlarının yüksek oranda tekrarlanabilirliğinin sağlanabileceği sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 4.2'te OPB5 primerinden 5, OPB10 primerinden 4, OPA 17 primerinden 6, OPC02 primerinden 4, SC1091 primerinden 3, OPU16 primerinden 2, OPB7 primerinden 2, SC1079 primerinden 1, OP06 primerinden 4 ve OP04 primerinden 1 polimorfik band kayıt edilmiştir.

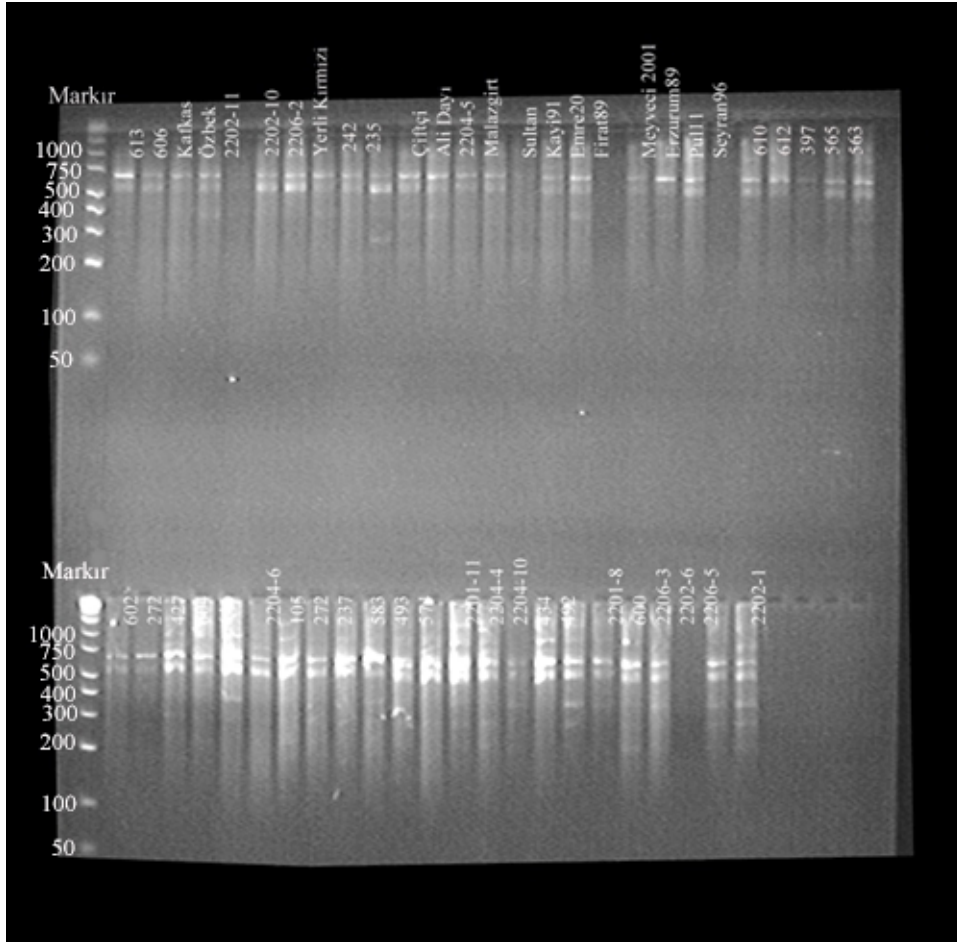
Çizelge 4.2. Denemede kullanılan primerlerdeki polimorfik band sayıları

Primer Sayısı	Primer Adı	Polimorfik Bandsayısı	Toplam Band Sayısı	% Polimorfik Band Sayısı
1	OPB05	5	5	100
2	OPB10	4	5	80
3	OPA17	6	8	75
4	OPC02	4	5	80
5	SC1091	3	7	43
6	OPU16	2	4	50
7	OPB7	2	4	50
8	SC1079	1	5	20
9	OP06	4	5	80
10	OP04	1	3	33
Toplam		32	51	63

4.1.4. RAPD-PCR polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması

Polimorfik band üreten 10 primer ile yapılan hat ve çeşitlerin RAPD profilleri Şekil 4.2; 4.3; 4.4; 4.5; 4.6; 4.7; 4.8; 4.9; 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Primerlere göre polimorfizm miktarı ise çizelge 4.2’de verilmiştir. Polimorfik RAPD bandlarının okunması da Çizelge 4.3; 4.4; 4.5; 4.6; 4.7; 4.8; 4.9; 4.10; 4.11; 4.12’de verilmiştir.

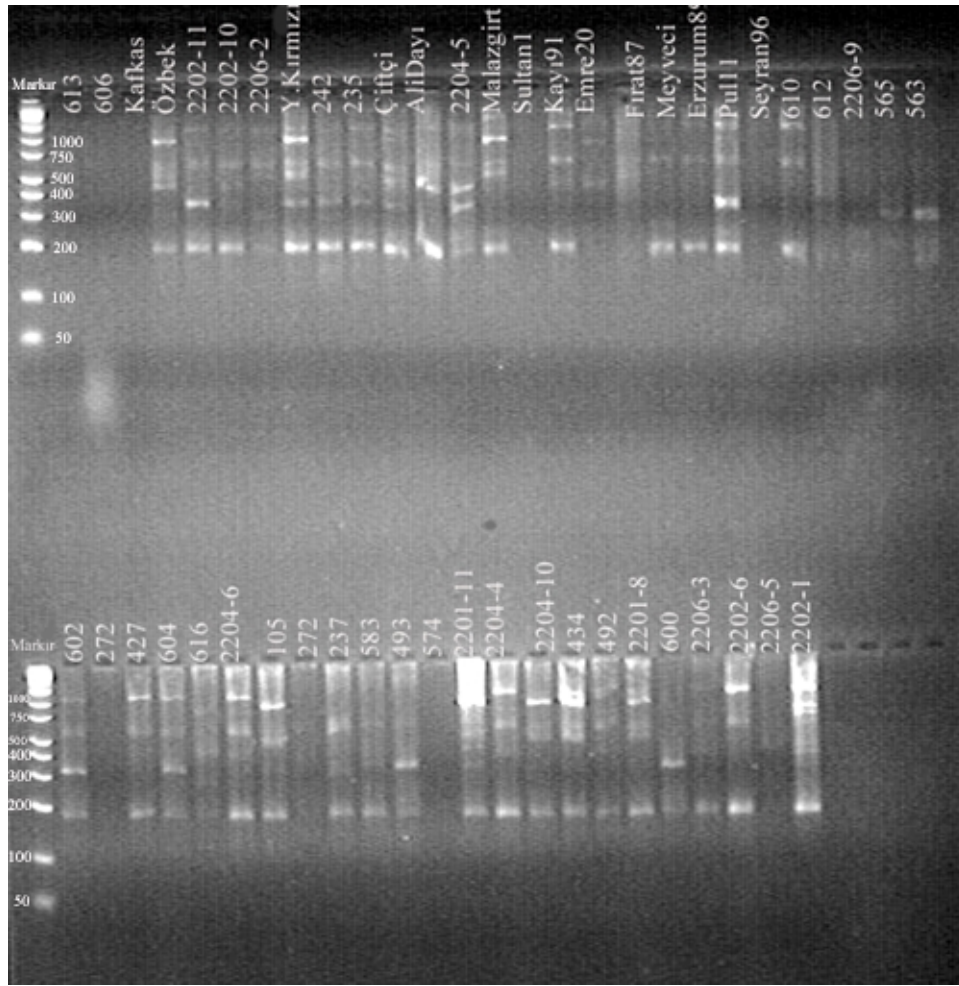
Primerlere düşen polimorfizm incelendiğinde en yüksek polimorfizm %100 ile OPB5 primerinde, en düşük polimorfizm ise %20 ile SC1079 primerinde görülmüştür. Primer başına ortalama olarak 0.63 polimorfizm görülmüştür (Çizelge 4.2). RAPD profillerinde oluşan hem monomorfik hem de polimorfik bantların okunması sonucunda ise OP04 primerinde 3, OP06 primerinde 5, OPU16 primerinde 4, SC1079 primerinde 5, OPC2 primerinde 5, OPB7 primerinde 4, SC1091 primerinde 7, OPB5 primerinde 5, OPB10 primerinde 5 ve OPA17 primerinde ise 8 olmak üzere toplam 51 bant kayıt edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.2. OP04 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.3. OP04 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması (Örneğin, 400 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

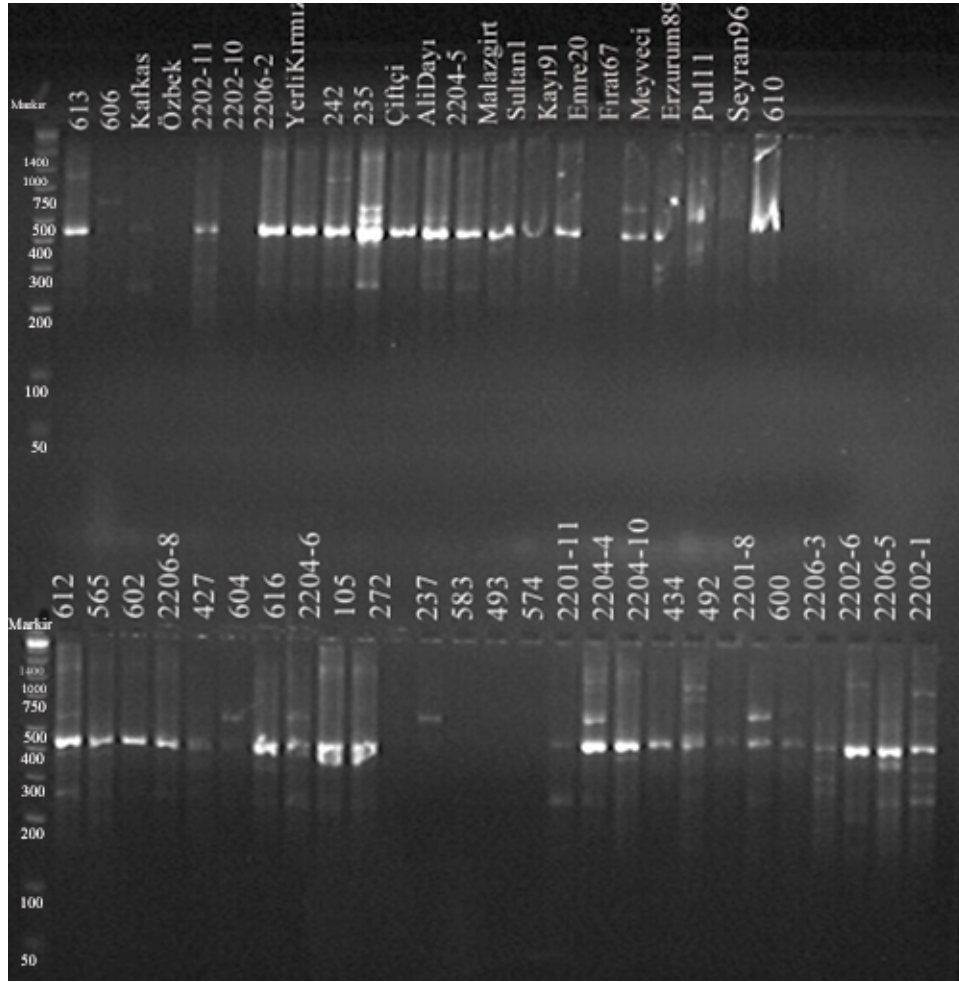
565	613	0	0
563	606	0	0
602	Kafkas	0	0
272	Ozbek	0	0
427	2202-11	0	0
604	2202-10	0	0
616	2206-2	0	0
2204-6	Yerli K.	0	0
105	242	0	0
272	235	0	0
237	Çiftçi	0	0
583	Ali D.	0	0
493	2204-5	0	0
574	Malazgirt	0	0
2201-11	Sultan-1	0	0
2204-4	Kayı 91	0	0
2204-10	Emre-20	0	0
434	Fırat-67	0	0
492	Meyveci	1	0
2201-8	Erzurum	0	0
600	Pul 11	0	0
2206-3	Seyran	0	0
2202-6	610	0	0
2206-5	612	0	0
2202-1	397	0	0
1			



Şekil 4.3. OP06 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.4. OP06 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması (Örneğin, 300 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

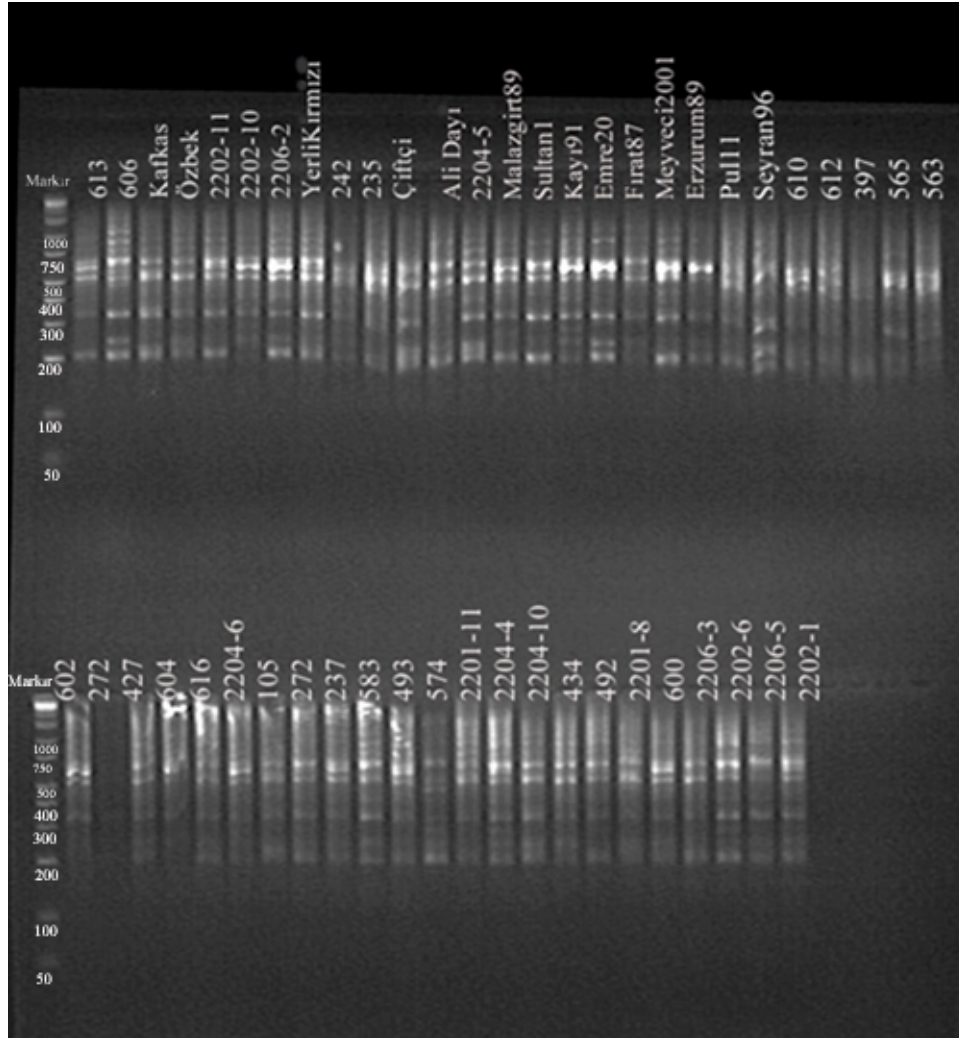
565	0	565	0	613
563	1	563	0	606
602	1	602	0	Kafkas
272	0	272	0	Özbek
427	0	427	1	2202-11
604	1	604	0	2202-10
616	0	616	0	2206-2
2204-6	0	2204-6	1	Yerli K.
105	0	105	1	242
272	0	272	1	235
237	0	237	1	Çiftçi
583	0	583	0	Ali D.
493	1	493	1	2204-5
574	0	574	0	Malazgirt
2201-11	0	2201-11	0	Sultan I
2204-4	0	2204-4	0	Kayı 91
2204-10	0	2204-10	0	Emre-20
434	0	434	0	Fırat-67
492	0	492	0	Meyveci
2201-8	0	2201-8	0	Erzurum
600	1	600	1	Pul 11
2206-3	0	2206-3	0	Seyran
2202-6	0	2202-6	0	610
2206-5	0	2206-5	0	612
2202-1	0	2202-1	0	397



Şekil 4.4. OPU16 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.5. OPU16 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması (Örneğin, 500 baz çiftinin hemen üstündeki bandın okunması)

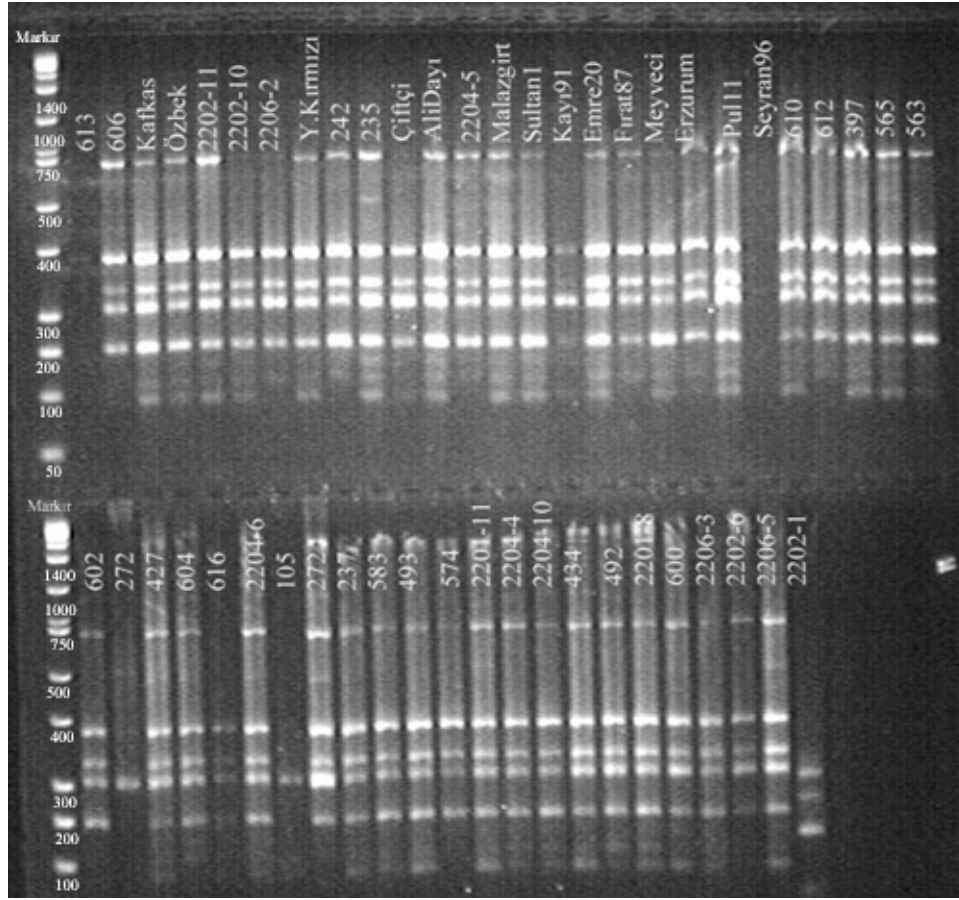
565	613
0	0
563	606
0	0
602	Kafkas
0	0
272	Özbek
1	0
427	2202-11
0	0
604	2202-10
0	0
616	2206-2
0	0
2204-6	Yerli K.
0	0
105	242
0	0
272	235
1	1
237	Çiftçi
0	0
583	Ali D.
0	0
493	2204-5
0	0
574	Malazgirt
0	0
2201-11	Sultan I
1	0
2204-4	Kayı 91
0	0
2204-10	Emre-20
0	0
434	Fırat-67
0	1
492	Meyveci
0	0
2201-8	Erzurum
1	0
600	Pul 11
0	0
2206-3	Seyran
0	0
2202-6	610
0	0
2206-5	612
0	1
2202-1	397
0	0



Şekil 4.5. SC1079 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.6. SC1079 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması (Örneğin, 200 baz çiftinin hemen üstündeki bandın okunması)

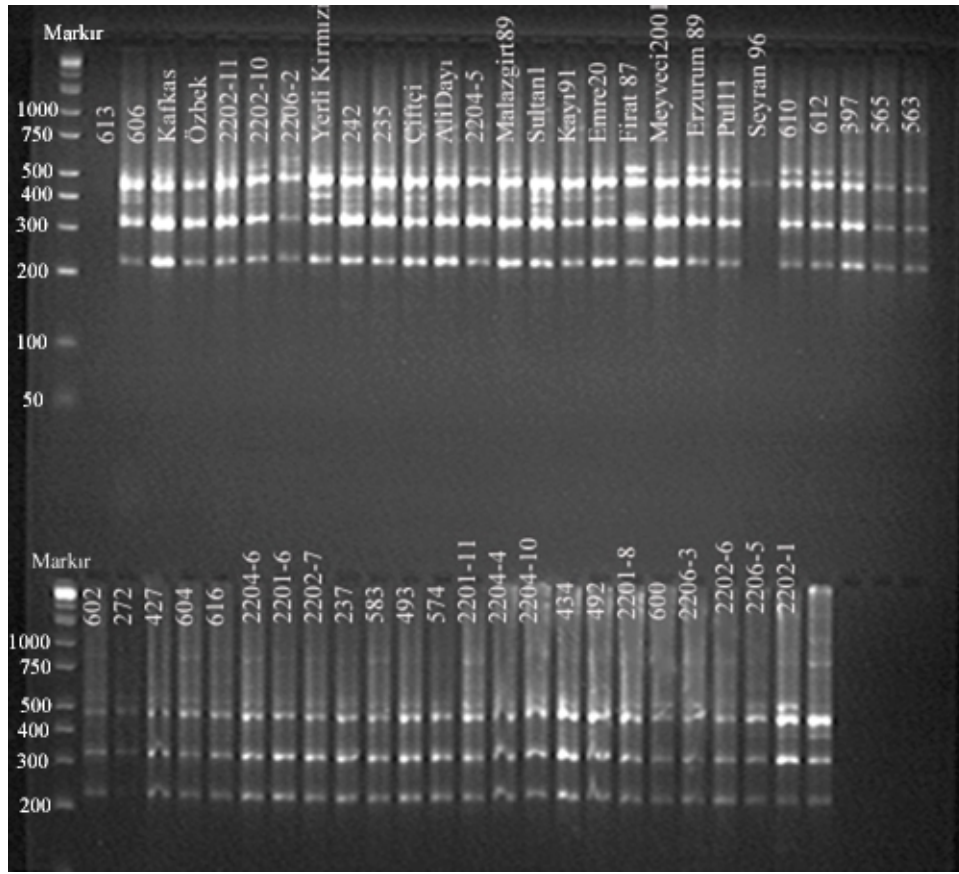
565	613	0	0
563	606	1	0
602	Kafkas	0	0
272	Özbek	0	0
427	2202-11	0	0
604	2202-10	0	0
616	2206-2	0	0
2204-6	Yerli K.	0	0
105	242	0	0
272	235	0	0
237	Çiftçi	0	0
583	Ali D.	0	0
493	2204-5	0	0
574	Malazgirt	0	0
2201-11	Sultan-1	0	0
2204-4	Kayı 91	0	0
2204-10	Emre-20	1	0
434	Fırat-67	0	0
492	Meyveci	0	0
2201-8	Erzurum	0	0
600	Pul 11	0	0
2206-3	Seyran	1	0
2202-6	610	0	0
2206-5	612	0	0
2202-1	397	0	0



Şekil 4.6. OPB5 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.7. OPB5 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması (Örneğin, 750 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

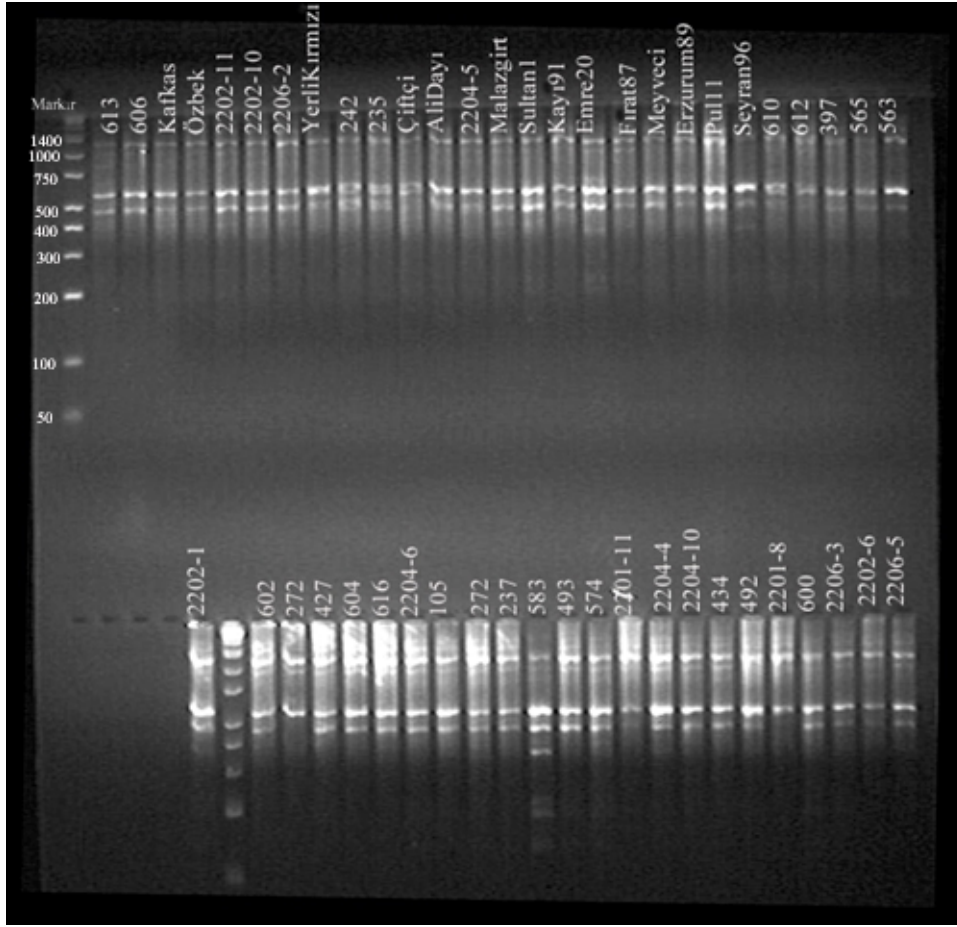
565	613	0
563	606	1
602	Kafkas	1
272	Özbek	1
427	2202-11	1
604	2202-10	0
616	2206-2	0
2204-6	Yerli K.	1
105	242	1
272	235	1
237	Çiftçi	0
583	Ali D.	1
493	2204-5	1
574	Malazgirt	1
2201-11	Sultan-1	1
2204-4	Kayı 91	0
2204-10	Emre-20	1
434	Fırat-67	1
492	Meyveci	0
2201-8	Erzurum	1
600	Pul 11	1
2206-3	Seyran	0
2202-6	610	0
2206-5	612	0
2202-1	397	1



Şekil 4.7. OPB10 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.8. OPB10 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması (Örneğin, 400 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

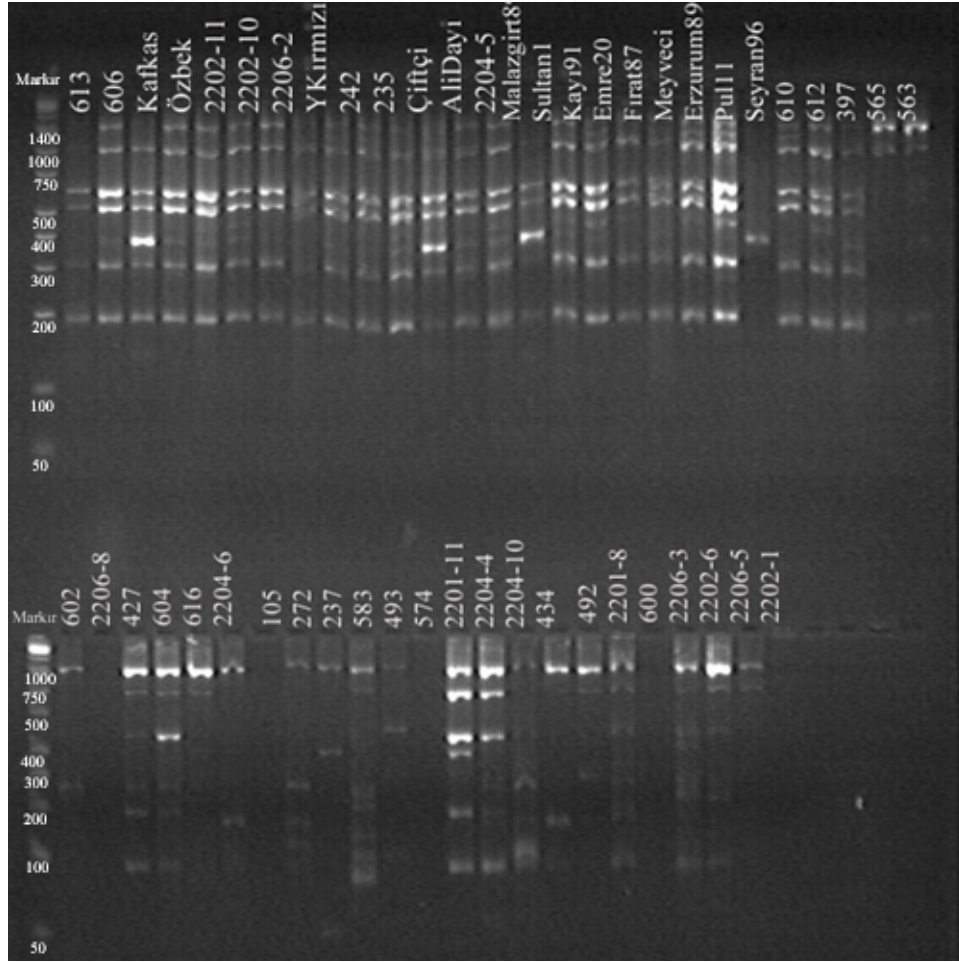
565	613		
0	0		
563	606		
0	0		
602	Kafkas		
0	0		
272	Özbek		
0	0		
427	2202-11		
0	0		
604	2202-10		
0	0		
616	2206-2		
0	0		
2204-6	Yerli K.		
0	1		
105	242		
0	1		
272	235		
0	1		
237	Çiftçi		
0	1		
583	Ali D.		
0	1		
493	2204-5		
0	0		
574	Malazgirt		
0	0		
2201-11	Sultan-1		
0	1		
2204-4	Kayı 91		
0	1		
2204-10	Emre-20		
0	1		
434	Fırat-67		
0	1		
492	Meyveci		
0	0		
2201-8	Erzurum		
0	1		
600	Pul 11		
0	1		
2206-3	Seyran		
0	1		
2202-6	610		
0	1		
2206-5	612		
1	1		
2202-1	397		
1	1		



Şekil 4.8. OPC2 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.9. OPC2 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması (Örneğin, 500 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

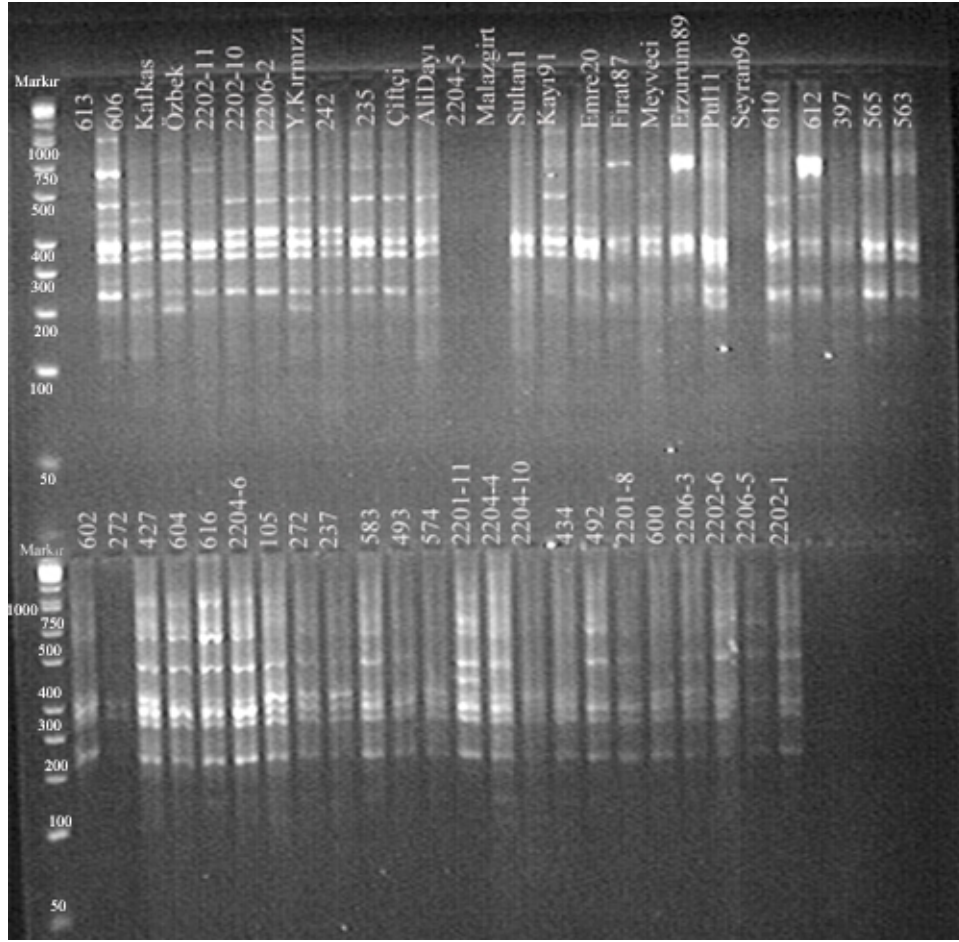
565	613
1	1
563	606
1	1
602	Kafkas
1	1
272	Özbek
0	1
427	2202-11
1	1
604	2202-10
1	1
616	2206-2
1	1
2204-6	Yerli K.
1	1
105	242
1	1
272	235
1	1
237	Çiftçi
1	0
583	Ali D.
1	1
493	2204-5
1	1
574	Malazgirt
1	1
2201-11	Sultan I
0	1
2204-4	Kayı 91
1	1
2204-10	Emre-20
1	1
434	Fırat-67
1	1
492	Meyveci
1	1
2201-8	Erzurum
0	1
600	Pul 11
1	1
2206-3	Seyran
1	1
2202-6	610
1	0
2206-5	612
1	0
2202-1	397
1	1



Şekil 4.9. SC1091 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.10. SC1091 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okuması (Örneğin, 400 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

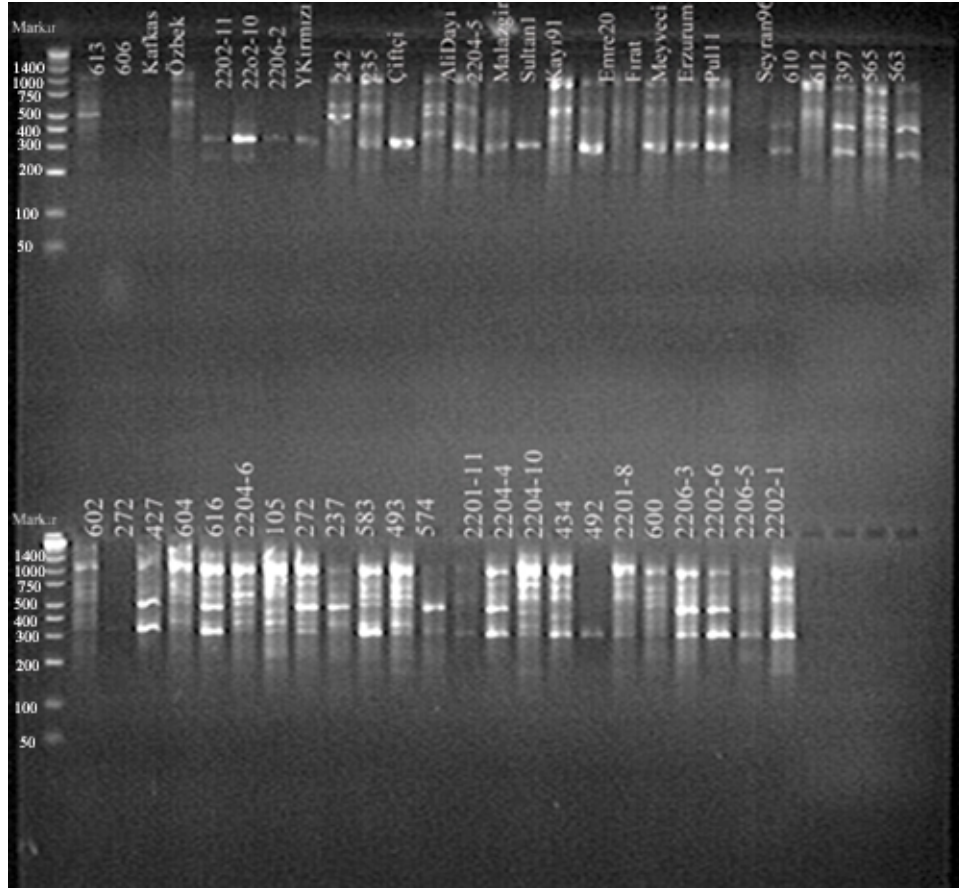
565	613		
0	0	0	0
563	606	0	0
0	Kafkas	1	0
0	Özbek	0	0
0	2202-11	0	0
1	2202-10	0	0
0	2206-2	0	0
0	Yerli K.	0	0
0	2204-6	0	0
0	105	0	0
0	272	0	0
0	237	0	0
0	Çiftçi	0	0
0	Ali D.	1	0
0	2204-5	0	0
0	Malazgirt	0	0
1	Sultan-1	1	0
1	Kayı 91	0	0
0	Emre-20	0	0
0	Firat-67	0	0
0	Meyveci	0	0
0	Erzurum	0	0
0	Pul 11	0	0
0	Seyran	1	0
0	610	0	0
0	612	0	0
0	397	0	0



Şekil 4.10. OPA17 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.11. OPA17 primeri ile hatlar ve çeşitlerin band profillerinin okunması (Örneğin, 200 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

565	613		
0	0		
563	606		
0	0		
602	Kafkas		
0	0		
272	Özbek	1	
0	0		
427	220211	0	
0	0		
604	220210	0	
0	0		
616	22062	0	
0	0		
2204-6	Yerli K.	1	
0	0		
105	242	0	
0	0		
272	235	0	
0	0		
237	Çiftçi	0	
0	0		
583	Ali D.	0	
0	0		
493	22045	0	
0	0		
574	Malazgirt	0	
0	0		
2201-11	Sultan-1	0	
0	0		
2204-4	Kayı 91	0	
0	0		
2204-10	Emre	0	
0	0		
434	Fırat	0	
0	0		
492	Meyveci	0	
0	0		
2201-8	Erzurum	0	
0	0		
600	Pul 11	1	
0	0		
2206-3	Seyran	0	
0	0		
2202-6	610	0	
0	0		
2206-5	612	0	
0	0		
2202-1	397	0	
0	0		



Şekil 4.11. OPB7 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profilleri

Çizelge 4.12. OPB7 primeri ile hatlar ve çeşitlerin RAPD-PCR band profillerinin okunması (Örneğin, 300 baz çiftine karşılık gelen bandın okunması)

1	565	1	613
0	563	0	606
1	602	0	Kafkas
0	272	0	Özbek
0	427	0	2202-11
1	604	0	2202-10
0	616	0	2206-2
1	2204-6	0	Yerli K.
0	105	0	242
0	272	1	235
1	237	0	Çiftçi
1	583	0	Ali D.
0	493	0	2204-5
1	574	0	Malazgirt
0	2201-11	0	Sultan-1
1	2204-4	0	Kavi 91
0	2204-10	0	Emre-20
0	434	0	Fırat-67
0	492	0	Mevveci
0	2201-8	0	Erzurum
0	600	0	Pul 11
1	2206-3	0	Seyran
1	2202-6	0	610
0	2206-5	0	612
0	2202-1	0	397

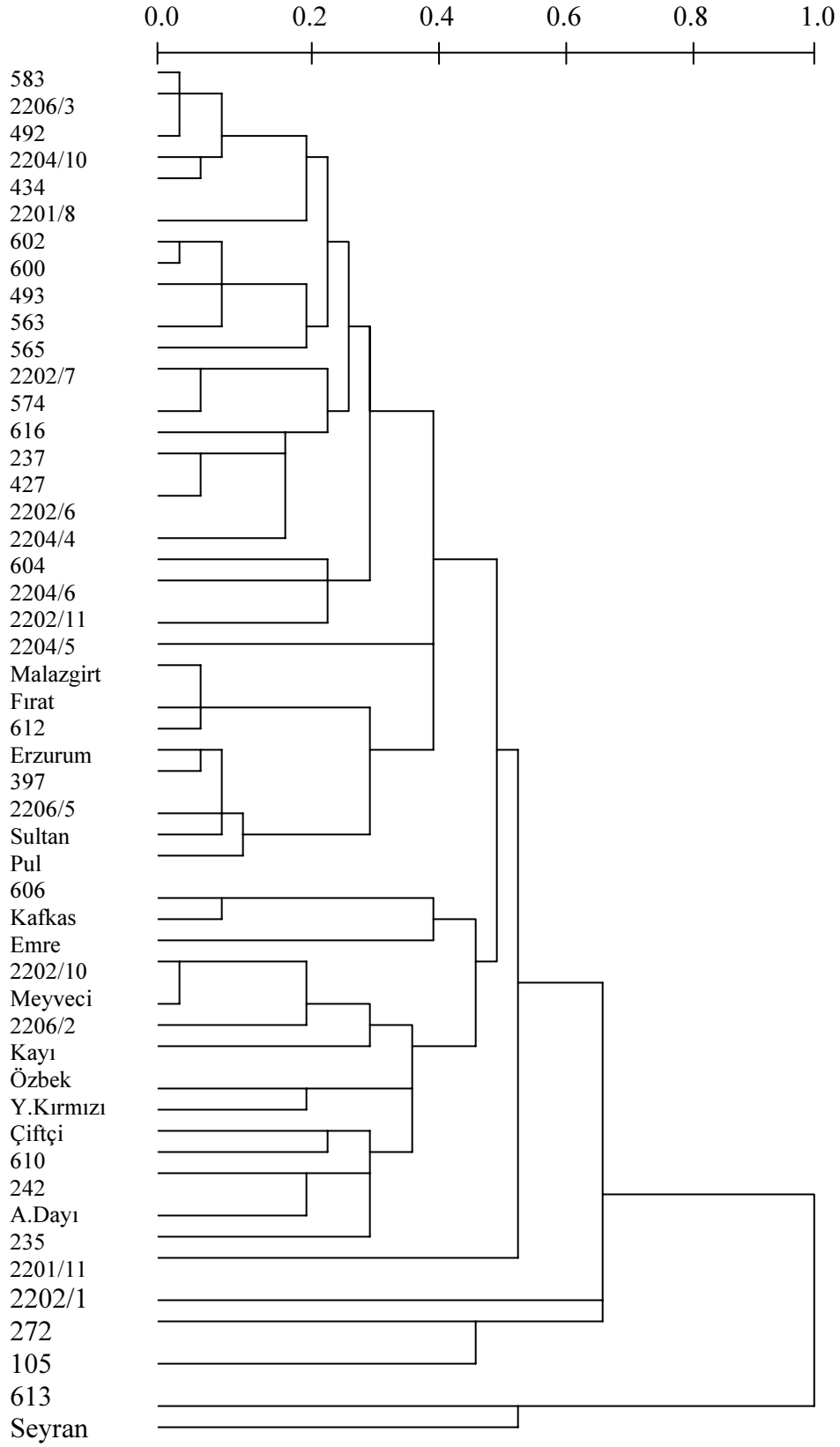
OPB5 primerinden 100 ile 1000; OPB10 primerinden 200 ile 750; OPA17 primerinden 200 ile 1400; OPC2 primerinden 300 ile 750; OPU16 primerinden 300 ile 1400; OPB7 primerinden 300 ile 1400; SC1091 primerinden 100 ile 1500, OP04 primerinden 300 ile 1000; SC1079 primerinden 200 ile 1400 ve OP06 primerinden 200 ile 1400 baz çifti arasındaki bandlar kayıt edilmiştir. Bandların büyüklükleri markırlar kullanılarak belirlenmiştir.

Öklid mesafesine bakıldığında ilk olarak aralarında genetik farklılık bulunmayan populasyonlar göze çarpmaktadır (Ek 1). Akm 2202-10 hattı ile Meyveci arasında; Akm 492 ile Akm 583 hatları arasında; Akm 600 ile Akm 602 hatları arasında ve Akm 2206-3 ile Akm 583 hatları arasında genetik olarak bir farklılık bulunmamıştır. Araştırma bulguları kültür mercimeğinin çeşitleri ve hatları arasındaki genetik farklılığın az olduğunu hatta yukarıda belirtildiği gibi bazı örnekler arasında hiçbir farklılık bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar Ferguson vd. (52), Abo-elwafa vd. (68), Ford vd. (54), tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ferguson vd., *Lens* cinsinin *Lens culinaris* ssp. *orientalis* (Boiss.) Hand.-Mazz., *Lens odemensis* (Ladizinsky), *Lens ervoides* (Brign.) Grande, *Lens nigricans* (Bieb.) Godr., *Lens lamottei* (Schreber) Alef. olmak üzere beş yabancı türünde 11 izoenzim lokusundan ve 3 RAPD primerinden oluşan genetik varyasyonu rapor etmişler. *Lens culinaris* ssp. *orientalis* ve *Lens lamottei*'nin populasyonları arasında önemli derecede bir genetik varyasyon görülmesine rağmen, genel olarak düşük varyasyon düzeyi tespit etmişlerdir (52). Yine Abo-elwafa vd., RAPD markırlarını kullanarak mercimek türleri arasındaki ve mercimek türleri içindeki varyasyonu araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında 40 tane 10 bazlık polimorfik primerler kullanmış olup, bu primerlerden 10 tanesinde 50 tane kayıt edilebilir band tespit etmişlerdir. Araştırma sonucu kültür mercimeğindeki genetik varyasyonun yabancı türlerine göre düşük olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar tür içi varyasyonun 0.000-0.316 ile en düşük kültür mercimeğinde olduğunu, kültür mercimeğinin *Lens ervoides* hariç yabancı türleri *Lens odemensis*, *Lens nigricans* ve *Lens orientalis*'te ise yüksek miktarda tür içi varyasyonun olduğunu belirtmişlerdir. Fakat *Lens ervoides*'te ise tür içi varyasyonun düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarından buldukları verilere göre kültür mercimeklerindeki

varyasyonun sınırlı olduğunu belirterek, tanımlamanın daha iyi yapılabilmesi için daha çok RAPD markırının kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (68). Ford vd. (54)'nin *Lens culinaris* ssp. *culinaris*'in 16 hat ve çeşitlerinde RAPD analizi ile yapılan genetik yakınlık analizinden elde ettiği sonuçlarla bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar aralarında genetik farklılık bulunmayan populasyonlar dikkate alındığında benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar populasyonlar arasındaki en fazla genetik uzaklığı 0.36 olarak bulmuşlar ve bununla sınırlı bir genetik varyasyon olduğunu kaydetmişlerdir. Buna karşın çalışmamızda en yüksek genetik mesafe 1 ile Seyran ve Yerli Kırmızı çeşidi arasında bulunmuş olup Ford vd. (54)'nin yapmış olduğu çalışmadan farklılık göstermektedir. Ford vd. (1997) nin araştırmalarında toplam 44 band kayıt edilmiş ve bunların 25'i polimorfizm (%57) göstermiştir. Herhangi iki çeşit veya hat arasındaki genetik varyasyonun düzeyi minimum %9 (ILL3640 ve ILX 87247) ve maksimum %46 (ILL3257 ve ILL 4532) arasında bulunmuş olup, ortalaması %23 olarak kaydedilmiştir. Her bir primer 4-9 arasında kayıt edilebilir band vermiş ve bunların büyüklükleri 300 – 3500 baz çifti arasında olduğu rapor edilmiştir. 64 bireyin her ikisinin arasında bulunan maksimum genetik uzaklık %48 olarak bulunmuştur. Dendrogram sonucunun varyeteler/hatlar arasında kısmen düşük bir genetik mesafe (0.36) sıkı bir gruplanma olduğunu kaydetmiştir.

Mercimek çeşitlerini ve hatlarını kümelemede kullanılan Öklid mesafesine (Ek1) bakıldığında aralarında en fazla genetik mesafe bulunan populasyonlar '1' ile Seyran ve Yerli Kırmızı çeşidi arasında olup, en küçük genetik mesafe ise '0' ile Akm 2202/10 ve Meyveci, Akm 600 ile Akm 602, Akm 492 ile Akm 237 ve Akm 2206/3 ile Akm 583 arasında bulunmuştur.

Monomorfik ve polimorfik olmak üzere toplam 51 bant (Ek 2) dikkate alınarak SPSS paket programı ile yapılan dendrogram Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. RAPD bandları kullanılarak mercimek örneklerinde yapılan kümeleme analizi sonucu oluşan dendrogram

Dendrogram (Şekil 4.12) sonucuna göre mercimek hat ve çeşitleri üç ana gruba ayrılmaktadır.

Birinci ana grup Akm 583, Akm 2206-3, Akm 492, Akm 2204-10, Akm 434, Akm 2201-8, Akm 602, Akm 600, Akm 493, Akm 563, Akm 565, Akm 613, Akm 574, Akm 616, Akm 237, Akm 427, Akm 2202-6, Akm 2204-4, Akm 604, Akm 2204-6, Akm 2202-11, Akm 2204-5, Malazgirt, Fırat, Akm 612, Erzurum, Akm 397, Akm 2206-5, Sultan, Pul 11, Akm 606, Kafkas, Emre, Akm 2202-10, Meyveci, Akm 2206-2, Kayı, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi, Akm 610, Akm 242, Ali Dayı ve Akm 235 populasyonlarından oluşmaktadır. Birinci ana grupta kendi içerisinde iki alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt grup Akm 583, Akm 2206-3, Akm 492, Akm 2204-10, Akm 434, Akm 2201-8, Akm 602, Akm 600, Akm 493, Akm 563, Akm 565, Akm 613, Akm 574, Akm 616, Akm 237, Akm 427, Akm 2202-6, Akm 2204-4, Akm 604, Akm 2204-6, Akm 2202-11, Akm 2204-5, Malazgirt, Fırat, Akm 612, Erzurum, Akm 397, Akm 2206-5, Sultan ve Pul 11 çeşidinden oluşmaktadır. İkinci alt grup ise Akm 606, Kafkas, Emre, Akm 2202-10, Meyveci, Akm 2206-2, Kayı, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi, Akm 610, Akm 242, Ali Dayı ve Akm 235 örneklerini kapsamaktadır. Birinci alt grup içerisinde yer alan Malazgirt, Fırat ve Pul çeşitleri kırmızı tohum rengine sahipken, Sultan ve Erzurum çeşitleri yeşil tohum rengine sahiptir. İkinci alt grup içerisinde yer alan Kafkas, Emre, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi ve Ali Dayı kırmızı kotiledon rengine sahiptir.

İkinci ana grubu ise Akm 2202-1, Akm 272 ve Akm 105 örnekleri oluşturmaktadır. Üçüncü grupta sadece Akm 610 ve Seyran çeşidi yer almaktadır. Denemede kullanılan çeşitler 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup Malazgirt, Fırat, Erzurum, Sultan ve Pul çeşitlerini kapsamaktadır. İkinci grup Kafkas, Emre, Meyveci, Kayı, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi ve Ali Dayı çeşitlerini içermektedir. Üçüncü grupta ise sadece Seyran çeşidi yer almaktadır. Sonuç olarak çeşitler üç ana grupta toplanmış olup bu gruplarda yer alan çeşitler kendi aralarında genetik farklılıklar göstermektedir. Kısaca, çeşitler genetik olarak birbirlerinden farklılık göstermişlerdir.

4.2. SDS-PAGE Yöntemiyle Mercimek Hatları ve Çeşitlerinin Aralarındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi

Bu çalışmada mercimek çeşitleri ve hatlarına ait tohumların toplam proteinlerinde SDS-PAGE yöntemiyle tohum depo protein polimorfizmine bakılmıştır. SDS-PAGE sonucunda elde edilen elektrophoregramlarda 35 ile 116 kDa arasında olan protein bandları aralığında polimorfizm gözlenmiştir (Şekil 4.13). SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen protein bandlarının okunması Çizelge 4.13'te verilmiştir.

35 ile 116 kDa arasındaki polimorfizm gösteren 5 protein bandlarında bandın varlığı '1' yokluğu da '0' olarak kayıt edilmiş (Çizelge 4.13) olup, SPSS programıyla (82) Öklid mesafesi hesaplanmıştır (Ek 2).

SDS-PAGE elektrophoregramlarından okunan polimorfik protein bandlarına göre hatlar ve çeşitler 3 farklı ana grupta toplanmışlardır (Şekil 4.14). Birinci ana grupta Ali Dayı, Akm 237, Seyran, Akm 242, Sultan, Fırat, Sazak, Çiftçi, Emre, Malazgirt ve Pul 11 çeşitleri yer almaktadır. Birinci ana grup içerisinde iki alt grup yer almıştır. Birinci alt grup Ali Dayı, Akm 237, Seyran ve Akm 242 örneklerinden, ikinci alt grup ise Sultan, Fırat, Sazak, Çiftçi, Emre, Malazgirt ve Pul 11 örneklerinden oluşmuştur. İkinci ana grup ise Yerli Kırmızı, Akm 434 ve Erzurum örneklerini kapsamaktadır. Üçüncü ana grupta ise Akm 235, Meyveci ve Kayı örnekleri yer almaktadır.

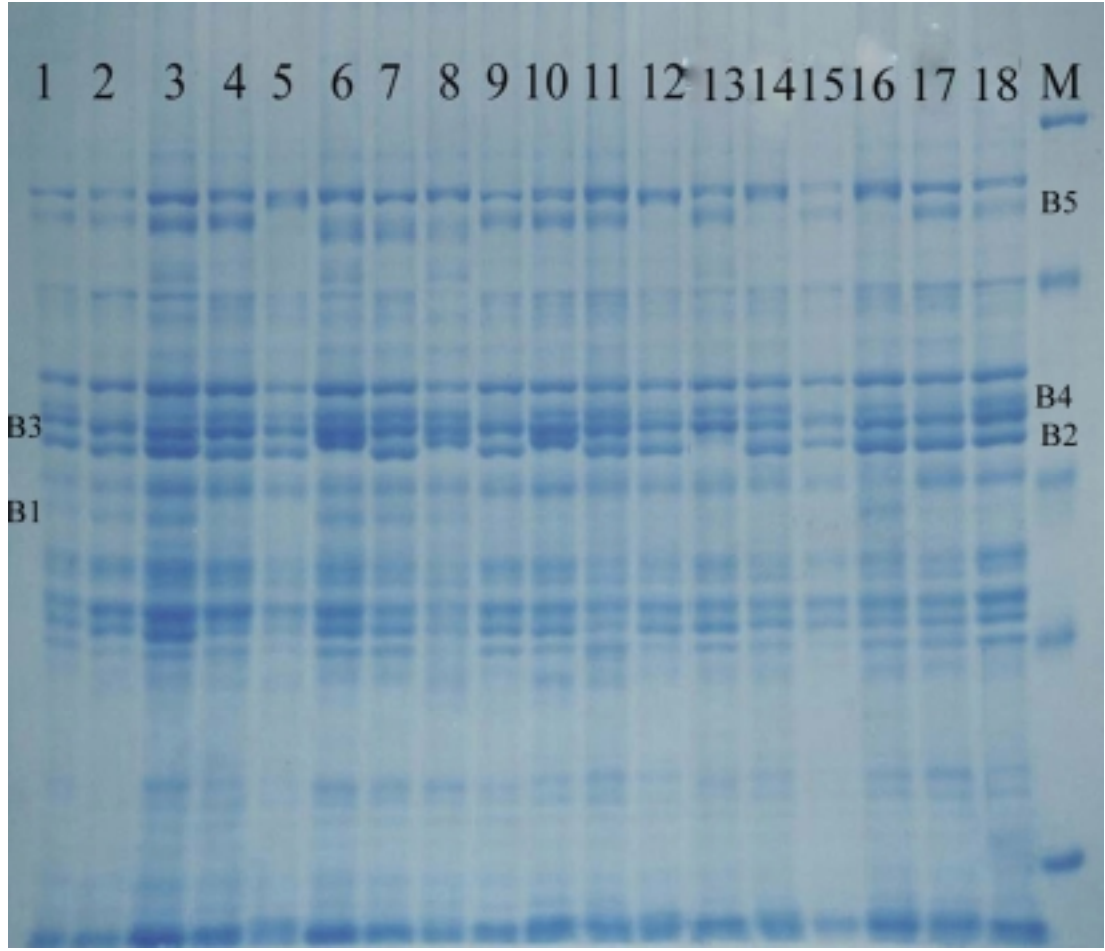
Hatların ve çeşitlerin üç ayrı ana grupta toplanmalarına rağmen, bu grupların içerisinde yer alan bazı örnekler arasında genetik bir farklılık gözlenmemiştir. Birinci ana grup içerisinde Ali Dayı, Akm 237, Seyran ve Akm 242 örnekleri arasında; Fırat ve Sazak çeşitleri arasında ve Çiftçi, Emre ve Malazgirt çeşitleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. İkinci grup içerisinde de Yerli Kırmızı, Akm 434 ve Erzurum örnekleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Üçüncü grupta ise Akm 235 ve Meyveci örnekleri arasında genetik bir farklılık gözlenmemiştir. SDS-PAGE yönteminde mercimek çeşitlerini ve hatlarını kümelemede kullanılan Öklid mesafesine göre en büyük genetik mesafe Özbek ile Kayı; Fırat ile Akm 235 ve

Meyveci; Akm 235 ile Erzurum, Sazak, Yerli Kırmızı ve Akm 434; Meyveci ile Erzurum, Sazak, Yerli Kırmızı, Akm 434 ve son olarak Kayı ile Pul 11 arasında olup, '1.00' olarak bulunmuştur. En küçük genetik mesafe ise sıfır olarak gözlenmiştir (Ek 3).

Dinelli vd., hem çift çeneklilerde hem de tek çeneklilerde bitki türlerini ve çeşitlerini tanımlamada ve ayırmada tohum proteinlerinin elektroforetik analizlerinin 1960'tan bu yana kullanıldığını belirtmişlerdir (84). SDS-PAGE yönteminden elde edilen tohum depo protein profili cinsler içerisindeki türlerin ayrılmasında ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmış olup, bir çok bitki türünde taksonomik ve filogenetik problemleri çözmede güçlü bir yöntem olduğu belirtilmiştir (84-87). Ayrıca, SDS-PAGE yönteminden elde edilen tohum depo protein profili çevresel şartlardan büyük oranda bağımsız olmaları nedeni ile de bir çok bitkide çeşitlerin ayrılmasında ve tanımlanmasında da yaygın olarak kullanılmıştır (84, 88-91). Dinelli ve Lucchese, SDS-PAGE yöntemi ile *Lolium* çeşitlerinde tohum protein profilini araştırmışlar ve çeşitler arasında 16.8 ve 96.8 kDa arasında değişen 27 adet protein alt ünitesi belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Lolium* çeşitlerinin hepsinin SDS-PAGE yöntemi ile net bir şekilde birbirinden ayrıldıklarını tesbit etmişlerdir (88). Barakat, altı soya fasulyesi çeşidinde (Clark, Crawford, Giza 83, Giza 21, Giza 35 ve Giza 111) SDS-PAGE yöntemi ile genetik ilişkiyi araştırmış ve 6.5 ile 149 kDa arasında değişen toplam 25 bant tesbit etmiştir. Araştırmacı denediği 6 çeşit arasında 116 kDa luk bir bandın Clark ve Giza 35 te bulunmadığını ve 89 kDa luk bir bandın da sadece Giza 111 de bulunduğunu belirtmiş olup, çeşitleri birbirleri ile ayırmada güçlük çekmiştir (92). Çalışmamızda ise SDS-PAGE elektrophoregramlarından okunan polimorfik protein bandlarına göre mercimek hatları ve çeşitleri 3 farklı ana grupta toplanmış (Şekil 4.14) olup, örnekler birbirlerinden ayrılmıştır. Ayrıca, çalışmamızda SDS-PAGE elektrophoregramından okunan üçüncü bant sadece Kayı ve Meyveci çeşitlerinde olup diğer çeşitlerden net bir şekilde ayırım göstermektedirler. Buna karşın birinci ana grupta Ali Dayı, Akm 237, Seyran ve Akm 242 örnekleri arasında; Fırat ve Sazak çeşitleri arasında; Çiftçi, Emre ve Malazgirt çeşitleri arasında; ikinci ana grupta Yerli Kırmızı, Akm 434 ve Erzurum örnekleri arasında ve üçüncü grupta ise Akm 235 ile Meyveci örnekleri arasında

genetik bir farklılık gözlenmemiştir. Hem SDS-PAGE hem de RAPD-PCR yöntemine göre çeşitler üç grup altında toplanmasına rağmen SDS-PAGE yönteminde grupların içindeki bazı çeşitler aralarında farklılık göstermezken RAPD yönteminde ise çeşitler birbirinden kesin olarak ayrılmıştır. Her iki yöntemde de en büyük genetik mesafe '1.00', en küçük genetik mesafe '0.00' olarak bulunmuştur. Fakat RAPD yönteminde en büyük genetik mesafe Seyran ve Yerli Kırmızı çeşidi arasında olup, en küçük genetik mesafe ise Akm 2202/10 ve Meyveci, Akm 600 ile Akm 602, Akm 492 ile Akm 237 ve Akm 2206/3 ile Akm 583 arasında bulunmuştur. Buna karşın SDS-PAGE yönteminde ise en büyük genetik mesafe Özbek ile Kayı; Fırat ile Akm 235 ve Meyveci; Akm 235 ile Erzurum, Sazak, Yerli Kırmızı ve Akm 434; Meyveci ile Erzurum, Sazak, Yerli Kırmızı, Akm 434 ve son olarak Kayı ile Pul 11 arasında olup, en küçük genetik mesafe ise Ali Dayı, Akm 237, Seyran, Akm 242 arasında; Fırat ve Sazak arasında; Çiftçi, Emre, Malazgirt arasında; Yerli Kırmızı, Akm 434, Erzurum arasında; Akm 235 ve Meyveci arasında genetik bir farklılık gözlenmemiştir.

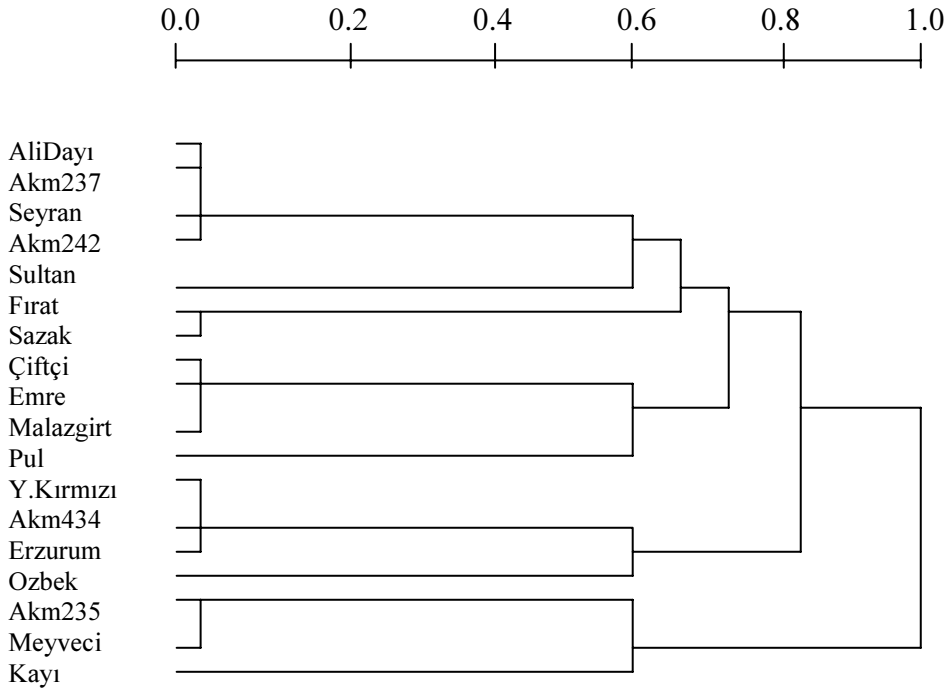
Sonuç olarak hem SDS-PAGE yöntemi hem de RAPD-PCR yöntemi denemede kullanılan hatlar ve çeşitler arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede yararlı olmuştur.



Şekil 4.13. SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen protein bandlarının elektroforegramı. M-Markır (Moleküler ağırlığı büyükten küçüğe doğru; β -galaktosidaz (116 kDa), Bovin Serum Albumin (66.2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Laktat dehidrogenaz (35kDa), REBsp 981(25 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa), Lizozim (14.4 kDa)), 1-Malazgirt, 2-Özbek, 3-Çiftçi, 4-Seyran, 5-Fırat, 6-Akm 235, 7-Emre, 8-Meyveci, 9-Erzurum, 10-Kayı, 11Akm 242, 12-AliDayı, 13-Sultan, 14-Sazak, 15-Yerli Kırmızı, 16-Pul 11, 17-Akm 434, 18-Akm 207

Çizelge 4.13. SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen protein bandlarının okunması

Bantlar	Malazgirt	Özbek	Çiftçi	Seyran	Fırat	Akm235	Emre	Meyveci	Erzurum	Kayı	Akm 242	Ali Dayı	Sultan-1	Sazak	Yerli K.	Pul 11	Akm 434	Akm 237
Bant1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Bant 2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Bant 3	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
Bant 4	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
Bant 5	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1



Şekil 4.14. SDS-PAGE bandları kullanılarak mercimek örneklerinde yapılan kümeleme analizi sonucu oluşan dendrogram

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitki ıslahı programında gen kaynaklarının etkin bir şekilde kullanılabilmesi için ilk şart gen kaynaklarındaki ve kültür hatlarındaki genetik çeşitliliğin tespit edilmesidir. Bu çalışmada kültür hatları ve çeşitlerindeki genetik çeşitlilik hem RAPD tekniği hem de SDS-PAGE ile tespit edilmiştir. RAPD yönteminden elde edilen araştırma sonucuna göre bazı hatlar ve çeşitler arasında genetik olarak hiçbir farklılık bulunamamıştır. Akm 2202-10 hattı ile Meyveci arasında; Akm 492 ile Akm 583 hatları arasında; Akm 600 ile Akm 602 hatları arasında ve Akm 2206-3 ile Akm 583 hatları arasında genetik olarak bir farklılık bulunmamıştır. Bu nedenle RAPD yöntemine göre aralarında farklılık bulunmayan populasyonlardan biri ıslah programında tutulurken diğerleri ıslah programından çıkartılmalıdır. Aralarında genetik farklılık gözükmeyen örneklerin ıslah programından çıkartılması popülasyondaki genetik çeşitliliği azaltmayacak ve ayrıca ıslahı daha ekonomik ve etkin kılacaktır.

RAPD yönteminden elde edilen araştırma sonucuna göre mercimek hat ve çeşitleri üç ana gruba ayrılmıştır.

Birinci ana grup Akm 583, Akm 2206-3, Akm 492, Akm 2204-10, Akm 434, Akm 2201-8, Akm 602, Akm 600, Akm 493, Akm 563, Akm 565, Akm 613, Akm 574, Akm 616, Akm 237, Akm 427, Akm 2202-6, Akm 2204-4, Akm 604, Akm 2204-6, Akm 2202-11, Akm 2204-5, Malazgirt, Fırat, Akm 612, Erzurum, Akm 397, Akm 2206-5, Sultan, Pul 11, Akm 606, Kafkas, Emre, Akm 2202-10, Meyveci, Akm 2206-2, Kayı, Özbek, Yerli Kırmızı, Çiftçi, Akm 610, Akm 242, Ali Dayı ve Akm 235 populasyonlarından oluşmaktadır.

İkinci ana grubu ise Akm 2202-1, Akm 272 ve Akm 105 örnekleri oluşturmaktadır.

Üçüncü grupta sadece Akm 610 ve Seyran çeşidi yer almıştır.

SDS-PAGE yöntemine görede mercimek çeşitleri üç grup altında toplanmıştır. Birinci ana grupta Ali Dayı, Akm 237, Seyran, Akm 242, Sultan, Fırat, Sazak, Çiftçi,

Emre, Malazgirt ve Pul 11 çeşitleri yer almaktadır. Birinci ana grup içerisinde iki alt grup yer almıştır. Birinci alt grup Ali Dayı, Akm 237, Seyran ve Akm 242 örneklerinden, ikinci alt grup ise Sultan, Fırat, Sazak, Çiftçi, Emre, Malazgirt ve Pul 11 örneklerinden oluşmuştur. İkinci ana grup ise Yerli Kırmızı, Akm 434 ve Erzurum örneklerini kapsamaktadır. Üçüncü ana grupta ise Akm 235, Meyveci ve Kayı örnekleri yer almaktadır.

SDS-PAGE yönteminde hatlar ve çeşitler üç ana grupta toplanmalarına rağmen, bu gruplar içerisinde yer alan bazı örnekler arasında genetik bir farklılık gözlenmemiştir. Birinci ana grupta Ali Dayı, Akm 237, Seyran ve Akm 242 örnekleri arasında; Fırat ve Sazak çeşitleri arasında; Çiftçi, Emre ve Malazgirt çeşitleri arasında; ikinci ana grupta Yerli Kırmızı, Akm 434 ve Erzurum örnekleri arasında ve üçüncü ana grupta ise Akm 235 ile Meyveci örnekleri arasında genetik bir farklılık gözlenmemiştir.

Ülkemiz mercimek hat ve çeşitleri arasındaki genetik mesafeler dikkate alındığında SDS-PAGE yönteminde aralarında genetik farklılık olmayan diğer bir ifadeyle genetik mesafe sıfır olan örnek sayısı RAPD-PCR yöntemine göre daha fazla sayıdadır. Bu nedenle SDS-PAGE yöntemi mercimek hat ve çeşitlerini karakterize etmede RAPD-PCR yöntemine göre biraz daha sınırlı kalmıştır. Fakat her iki yöntem de denemede kullanılan hatlar ve çeşitleri gruplandırmada yararlı olmuştur.

SDS-PAGE ve RAPD-PCR metodları mercimek çeşitlerini ayırım bakımından hem benzer hem de farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Her iki yöntemde de Meyveci ve Kayı çeşitleri aynı grup içerisinde yer almış ve birbirine çok yakın olarak gruplanmıştır. Aynı şekilde hem Yerli Kırmızı ve Erzurum çeşitleri hem de Pul, Sultan, Fırat ve Malazgirt çeşitleri her iki yöntemde aynı gruplar içerisinde yer almıştır. Fakat RAPD-PCR yönteminde bütün çeşitler arasında genetik farklılıklar gözlenmiş olup, RAPD-PCR yöntemi çeşitleri ayırmada SDS-PAGE yöntemine göre daha etkili bulunmuştur.

RAPD yönteminde polimorfizmin yüksek olmasına rağmen bu yöntemde bandların üretilirliği bir çok araştırmacı tarafından sorgulanmıştır ve bandların üretilirliğini etkileyen bir çok faktörün olduğu vurgulanmıştır. Bir çok araştırmacı AFLP, SSR gibi tekniklerin RAPD yöntemine göre daha polimorfik olduğunu ve daha net üretilir bandlar oluşturduklarını belirtmişlerdir. Bu nedenle mercimek hat ve çeşitlerindeki polimorfizmi daha iyi bir şekilde tespit edebilmek için ileride yapılacak olan çalışmalarda AFLP ve SSR gibi tekniklerin kullanılması önerilebilir. AFLP, SSR teknikleri de RAPD gibi DNA tabanlı ve dominant tekniklerdir. Bu tekniklerde radyoaktif madde kullanımı gerekliliği ve SSR yönteminin de dizi analizini gerektirmesi dezavantaj oluşturmaktadır.

RAPD yönteminde primerlerin bandların üretilirliğini önemli derecede etkilediği belirlenmiş olup, bandların üretilirliğini arttırmak amacıyla her bir primerin ayrı ayrı optimizasyonunun yapılması önerilebilir. Ayrıca daha fazla sayıda primer kullanılarak mercimek genomu daha detaylı incelenebilir.

Ülkemiz mercimek çeşitleri ve hatlarının genetik karakterizasyonunda RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemleri uygun bulunmuş olup, bu araştırmada RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemlerinden elde edilen bulgular ülkemiz çeşitlerinin korunmasına ve ayrıca bu çeşitleri ıslah eden kişilerin haklarının korunmasına da katkı sağlayabilir.

Özetle, SDS-PAGE ve RAPD-PCR yöntemleri mercimek çeşitleri ve hatları arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde uygun bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Ferguson, E.M., Robertson, L. D., Ford-Lloyd, B. V., Newbury, J. H. and Maxted. N., "Contrasting genetic variation amongst lentil landraces from different geographical origins", *Euphytica*, 102: 265-273 (1998).
2. Erskine, W., "Lessons for breeders from land races of lentil", *Euphytica*, 93: 107-112 (1997).
3. Summerfield, R. J. and Roberts, E. H., "Grain Legume Crops", *Collins*, London, 1-312 (1985).
4. Türkiye Cumhuriyeti Devlet İstatistik Enstitüsü, "Tarım İstatistikleri", *T.C. D.İ.E., Ankara*, 1-7 (1999).
5. Subaşı, B. ve Mustafaoğlu, M., "Türk tarımında mercimek ve pirincin yeri ve önemi", *İstanbul Ticaret Odası*, 32, *İstanbul*, 1-31 (1997).
6. Türkiye Ticaret Sanayi Deniz Ticaret Odaları ve Ticaret Borsaları Birliği, "Güneydoğu Anadolu Projesinin tarımsal boyutu, çözüm gerektiren öncelikli sorunlar ve öneriler", *TOBB Yayınları*, 258 (16) *Ankara*, 1-19 (1993).
7. Bretting, P. K. and Widrlechner, M. P., "Genetic markers and horticultural germplasm management", *Hort Sci.*, 30 (7): 1349-1356 (1995).
8. Weber, W.E. and Wricke, G., "Genetic Markers In Plant Breeding", *Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg*, 1-91 (1994).
9. Rafalski, J. A. and Tingey S. V., "Genetic Diagnostic in plant breeding: RAPDS, microsatellites and machines", *TIG*, 9: 275-279 (1993).
10. Yang, X. and Quiros, C., "Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers", *Theor. Appl. Genet.*, 86: 205-212 (1993).
11. Smith, O.S. and Smith, J.S.C., "The description and assesment of distance between inbred lines of maize: I, The use of morphological traits as descriptors", *Maydica*, 34: 141-150 (1989).
12. Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. and Bonierbale, M. W., "RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science", *Biotechnology*, 47: 257-264 (1989).
13. Tingey, S. V. and del Tufo, J. P., "Genetic analysis with random amplified polimorphic DNA markers", *Plant Physiol.*, 101: 349-352 (1993).

14. Staub, J., Bacher, J. and Poetter, K., "Sources of potential errors in the application of Random Amplified Polymorphic DNAs in cucumber", *Hortscience*, 31(2): 262-266 (1996).
15. Eujayl, I., Baum, M., Erskine, W., Pehu, E. and Muehlbauer, F. J., "The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F2 segregation", *Euphytica*, 96: 405-412 (1997).
16. Ahmad, M., Mc Neil, D.L. and Sedcole, R., "Phylogenetic relationships in *Lens* species and their interspecific hybrids as measured by morphological characters", *Euphytica*, 94: 101-111 (1997).
17. Crawford, D.J., "Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view", *Taxon*, 49: 479-501 (2000).
18. Bachmann, K., "Molecular markers in plant ecology", *Tansley Review*, 63: 403-414 (1993).
19. Tanksley, S. D., "Molecular markers in plant breeding", *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1(1): 3-8 (1983).
20. Tanksley, S.D. and Orton, T.J., "Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B", *Elsevier Science Publishers B. V.*, Amsterdam, 147-163 (1983).
21. Soller, M., and Beckmann, J. S., "Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement", *Theor. Appl. Genet.*, 67: 25-33 (1983).
22. Avise, J. C., "Molecular Markers, Natural History And Evolution", *Chapman & Hall, International Thomson Publishing*, New York, 3-359 (1994).
23. Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W., "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms", *Am. J. Of Human Genet.*, 32: 314-331 (1980).
24. Kumar, R., "The technique of polymerase chain reaction", *A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, 1: 133-152 (1989).
25. Steffan, R.J. and Atlas, R. M., "Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology", *Annu. Rev. Microbiol.*, 15: 137-161 (1991).
26. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M. and Zabeau, M., "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting", *Nucl. Acids Res.*, 23: 4407-4414 (1995).
27. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-6535 (1990).

28. Welsh, J. and McClelland, "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", *Nucl. Acids Res.*, 18: 7213-7218 (1990).
29. Skroch, P., Tivang, J. and Nienhuis, J., "Analysis of genetic relationships using RAPD marker data", *Crop Science Society of America*, Madison, Wisconsin, 26-30 (1992).
30. Penner, G.A., "RAPD analysis of plant genomes", Methods of genome analysis in plants, *CRC Press Inc*, Boca Raton Florida, 252-264 (1996).
31. Weising, K. H., Nybom, W. K. and Meyer, W., "DNA Fingerprints In Plants and Fungi", *CRC Press Inc.*, Boca Raton, Florida, 1-200 (1995).
32. Wilson, K., and Walker, J. M., "Principles and techniques of practical biochemistry", *Cambridge University Press*, New York, 17-125 (1994).
33. Doyle, J. J. and Doyle, J. L., "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, 12: 13-15 (1990).
34. Murray, M. G. and Thompson, W. F., "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA", *Nucl. Acids Res.*, 8: 4321-4325 (1980).
35. Fang, G., Hammer, S. and Grumet, R., "A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA", *BioTechniques*, 13: 52-55 (1992).
36. Kernodle, S. P., Cannon, R. E. and Scandalios, J., G., "Concentration of primer and template qualitatively affects products in Random Amplified Polymorphic DNA PCR", *Biotechniques*, 14: 362-364 (1993).
37. Yu, K., and Pauls, K.P., "Optimization of the PCR program for RAPD analysis", *Nucl. Acids Res.*, 20: 2606 (1992).
38. Fritsch, P., Hanson, M.A., Spore, C.D., Pack, P.E. and Rieseberg, L.H., "Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants", *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11(1): 10-20 (1993).
39. Schierwater, B. and Ender, A., "Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products", *Nucl. Acids Res.*, 21(19): 4647-4648 (1993).
40. Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B. E. and Lodhi, M.A., "Inheritance and reliability of RAPD markers", Applications of RAPD markers to plant breeding, *Crop Science Society of America*, Wisconsin, 12-17 (1992).

41. Skroch, P. and Nienhuis, J., "Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance", *Theor. Appl. Genet.*, 91: 1086-1091 (1995).
42. Paran, I. and Michelmore, R.W., "Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce", *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985-993 (1993).
43. Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J. and Fedak, G., "Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories", *PCR Meth. and Appl.*, 2: 341-345 (1993).
44. Lamboy, W. F., "Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: The effects of PCR artifacts", *PCR Meth. and Appl.*, 4: 31-37 (1994).
45. Lamboy, W. F., "Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: Correcting for the effects of PCR artifacts caused by variation in experimental conditions", *PCR Meth. and Appl.*, 4: 38-43 (1994).
46. Heun, M. and Helentjaris, T., "Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn", *Theor. Appl. Genet.*, 85: 961-968 (1993).
47. Ellsworth, D.L., Rittenhouse, D.K. and Honeycutt, R.L., "Artifactual variation in Randomly Amplified polymorphic DNA banding patterns", *BioTechniques*, 14: 214-217 (1993).
48. Davis, P. H. and Plitmann, U., "Lens Miller" Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, *Edinburg University Press*, 3, Edinburgh, 325-328 (1970).
49. Vural, M., "Lens Mill. ", Güner, A. et al. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, *Edinburgh University Press*. 11, Edinburgh, 92 (2000).
50. Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S.M. and Webb, D.A., "Lens Miller", Flora of Europaea, *Cambridge University Press*, 2, New York, 136 (1968).
51. Ferguson, M. E. and Robertson, L. D., "Genetic diversity and taxonomic relationships within the genus *Lens* as revealed by allozyme polymorphism", *Euphytica*, 91: 163-172 (1996).
52. Ferguson, M., Newbury H. J., Maxted, N., Ford-Lloyd, B. V. and Robertson, L. D., "Population genetic structure in lens taxa revealed by isozyme and RAPD analysis", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45: 549-559 (1998).

53. Bayaa, B., Ersikine, W. and Singh, M., “Screening lentil for resistance to fusarium wilt : methodology and sources of resistance”, *Euphytica*, 98: 69-74 (1997).
54. Ford, R., Pang, E. C. K. and Taylor, P. W. C., “Diversity analysis and species identification in *Lens* using PCR generated markers”, *Euphytica*, 96: 247-255 (1997).
55. Sharma, K., Dawson, I. K. and Waugh R., “Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis”, *TAG*, 91: 647-654 (1995).
56. Tivang, J., Skroch, P.W., Vos, N.D. and Nienhuis, J., “Randomly amplified polymorphic DNA variation among and within Artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations”, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121 (5): 783-788 (1996).
57. Aık, L., Samancı, B., Duman, H. and Ünal, F., “Polymorphism and phylogenetic relations among Turkish species in the genus *Stenbergia* as determined RAPD-PCR”, *Tr. J. of Botany*, 21: 265-268 (1997).
58. Ayta, Z., Ekici, M. and Aık, L., “A new species of *Astragalus* L (Leguminosae) from South Anatolia”, *J. of Linnean Society*, 136: 131-135 (2001).
59. Nienhuis, J., Slocum, M. K., De Vos, D. A. and Muren, R., “Genetic similarity among *Brassica oleraceae* L. genotypes as measured by restriction fragment length polymorphisms”, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118: 298-303 (1993).
60. Dos Santos, J. B., Nienhuis, J., Skroch, P., Tivang, J. and Slocum, M. K., “Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes”, *Theor. Appl. Genet.*, 87: 909-915 (1994).
61. Wilkie, S. E., Isaac, P. G. and Slater, R. J., “Random amplified polymorphic DNA markers for genetic analysis in *Allium*”, *Theor. Appl. Genet.*, 86: 497-504 (1993).
62. Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M. and Gessler, C., “Identification of apple cultivars using RAPD markers”, *Theor. Appl. Genet.*, 85: 901-904 (1993).
63. Havey, M. J. and Muehlbauer, F.J., “Variability for restriction fragment lengths and phylogenesis in lentil”, *Theor. Appl. Genet.*, 77: 839-843 (1989).
64. Song, K.M., Osborn, T.C. and Williams, P.H., “Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms(RFLPs), 1. Genome

- evaluation of diploid and amphidiploid species”, *Theor. Appl. Genet.*, 85: 697-701 (1988).
65. Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B., “Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean”, *Genetics*, 134: 1131-1139 (1992).
 66. Ahmad, M., McNeil, D. L., Fautrier, A. G., Armstrong, K. F. and Paterson, A. M., “Genetic relationships in *Lens* species and parentage determination of their interspecific hybrids using RAPD markers”, *Theor. Appl. Genet.*, 92: 1091-1098 (1996).
 67. Ahmad, M. and McNeil, D. L., “Comparison of crossability, RAPD, SDS-PAGE and morphological markers for revealing genetic relationships within and among *Lens* species”, *Theor. Appl. Genet.*, 93: 788-793 (1996).
 68. Abo-elwafa, A., Murai, K., and Shimada, T., “Intra-and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers”, *Theor. Appl. Genet.*, 90: 335-340 (1995).
 69. Sharma, S.K., Knox, M.R. and Ellis, T.H.N., “AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis”, *Theor. Appl. Genet.*, 93: 751-758 (1996).
 70. Mayer, M.S. and Soltis, P.S., “Chloroplast DNA phylogeny of *Lens* (Leguminosae): origin and diversity of the cultivated lentil”, *Theor. Appl. Genet.*, 87: 773-781 (1994).
 71. Sonnante, G. and Pignone, D., “Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools”, *Euphytica*, 120: 301-307 (2001).
 72. Van Oss, H., Aron, Y. and Ladizinsky, G., “Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens* Mill”, *Theor. Appl. Genet.*, 94: 452-457 (1997).
 73. Erskine, W., Chaudhry, S., Malik, I. A., Sarker, A., Sharma, B., Tufail, M. and Tyagi, M. C., “A bottleneck in lentil: widening its genetic base in South Asia”, *Euphytica*, 101: 207-211 (1998).
 74. Emami, M. K. and Sharma, B., “Inheritance of black testa colour in lentil (*Lens culinaris* Medik.) ”, *Euphytica*, 115: 43-47 (2000).
 75. Ye, G., McNeil, D.L. and Hill, G. D., “Two major genes confer *Ascochyta* blight resistance in *Lens orientalis*”, *New Zealand Plant Protection*, 53: 109-113 (2000).
 76. Zavodna, M., Kraic, J., Paglia, G., Gregova, E. and Morgante, M., “Differentiation between closely related lentil cultivars using DNA markers”, *Seed Sci. & Technol.*, 28: 217-219 (2000).

77. Tohumluk Tescil Ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, “Çeşit Katoloğu”, **T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müd., Ankara**, 67-71 (2001).
78. Jhingan, A. K., “A novel technology for DNA isolation”, **Methods In Molecular and Cellular Biology**, 3: 15-22 (1992).
79. Rogers, S. O. and Bendich, A. J., “Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues”, **Plant Mol. Biol.**, 5: 69-76 (1988).
80. Hillis, D.M. and Moritz, C., “Molecular systematics”, **Sinauer Associates, Inc. Publishers**, Sunderland, 217-220 (1990).
81. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., “Molecular cloning, A laboratory manual”, Second Edition, **Cold Spring Harbor Laboratory Manual**, 6-18 (1989).
82. SPSS Base 10.0 for Windows User’s Guide, **SPSS Inc.**, Chicago, Illinois, (1999).
83. Laemli, U.K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, **Nature**, 227: 680-685 (1970).
84. Dinelli, G., Bonetti, A., Lucchese, C., Catizone, B. and Bravin, F., “Taxonomic evolution of Italian populations of *Lolium* spp. Resistant and susceptible to diclofop-methyl”, **Weed Research**, 42: 156-165 (2001).
85. Ladizinsky, G. and Hymowitz, T., “Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies”, **Applied Genetics**, 54: 145-151 (1979).
86. Singh, AK, Santosh, G. and Jambunathan, R., “Phylogenetic relationships in the genus *Arachis* based on seed protein profiles”, **Euphytica**, 74: 219-225 (1994).
87. Açıık, L., Ekici, M. and Çelebi A., “Taxonomic relationships in *Astragalus* sections *Hololeuce* and *Synochreati* (Fabaceae): evidence from RAPD-PCR and SDS-PAGE of seed proteins”, **Ann. Bot. Fennici**, 41: 305-317 (2004).
88. Dinelli, G. and Lucchese, C., “Comparison between capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars”, **Electrophoresis**, 20: 2524-2532 (1999).
89. Igrejas, G., Pinto, H.G., Carnide, V. and Branlard, G., “Seed storage protein in triticale varieties commonly grown in Portugal”, **Plant Breeding**, 118: 303-306 (1999).

90. Labuschagne, M.T., DeSwardt, A.M. and Viljoen, C.D., “Genetic relationships between South African wheat cultivars as measured by gliadin banding patterns”, *Plant Breeding*, 119: 280-282 (2000).
91. Galova, Z., Michalik, I. and Knoblochova, H., “Variation in the subunit alleles in words wheat cultivars and in slovac wheat varieties”, *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 4: 269-271 (2001).
92. Barakat, H., “Genetic fingerprinting and relationships of six soybeans (*Glycine max* L.) cultivars based on protein and DNA polymorphism”, *International Journal of Agriculture and Biology*, 5: 877-883 (2004).

EKLER

Ek-1 RAPD-PCR yöntemine göre hatlar ve çeşitler arasındaki genetik mesafe
(Öklid Mesafesi)

	613	606	Kafkas	Özbek	2202/11	2202/10	2206/2	Yıkmızı	242	235	Çiftci	ADayı	2204/5	Malazgirt	Sultan	Kayı	Emre	Fırat	Meyveci	Erzurum
613	-																			
606	79	-																		
Kafkas	79	11	-																	
Özbek	85	38	38	-																
2202/11	76	33	33	33	-															
2202/10	76	43	43	33	26	-														
2206/2	65	38	38	38	33	19	-													
Yıkmızı	94	43	43	19	38	48	53	-												
242	82	43	43	33	26	38	43	26	-											
235	89	43	43	43	26	48	53	38	26	-										
Çiftci	85	48	48	48	33	33	48	43	33	33	-									
ADayı	79	38	26	38	33	43	48	43	19	33	38	-								
2204/5	69	53	53	53	26	38	53	57	48	48	43	53	-							
Malazgirt	69	53	53	43	38	38	53	57	57	57	53	53	11	-						
Sultan	79	38	26	48	43	43	48	53	43	43	38	26	43	43	-					
Kayı	72	48	48	38	43	33	38	43	33	43	38	38	61	61	48	-				
Emre	82	33	43	53	57	48	43	48	48	57	53	53	57	57	33	53	-			
Fırat	72	38	38	48	33	43	38	53	43	33	48	38	43	43	26	48	43	-		
Meyveci	72	48	48	38	33	00	26	53	43	53	38	48	33	33	38	38	43	38	-	
Erzurum	76	43	43	43	26	26	43	48	38	38	33	33	26	26	19	43	38	19	19	-
Pul	82	53	53	43	26	38	53	38	38	33	43	26	38	33	53	48	33	33	11	
Seyran	48	85	85	97	89	89	79	100	94	94	92	85	82	82	79	79	82	79	85	82
610	72	48	48	48	33	33	38	53	33	43	26	26	53	53	48	38	61	38	38	33
612	72	48	48	57	43	43	38	61	53	43	38	48	53	53	38	48	53	11	38	33
397	69	43	43	53	38	38	43	57	38	48	43	33	38	38	19	53	38	19	33	11
565	76	43	43	53	38	48	43	65	57	57	61	53	48	48	43	61	57	33	43	38
563	76	53	53	61	38	48	53	65	48	57	53	53	38	43	43	69	57	43	43	38
602	79	48	48	48	19	43	48	53	43	43	48	48	33	76	48	57	61	38	38	33
272	57	72	72	79	69	69	65	89	82	76	72	79	76	38	72	45	82	57	65	69
427	82	53	53	33	38	26	43	48	38	57	53	43	48	43	53	53	57	53	33	38
604	85	48	38	38	19	43	48	43	43	48	38	43	48	48	48	57	69	48	48	43
2202/2	69	43	43	33	26	33	65	48	57	43	43	48	38	43	53	57	43	33	33	38
2204/6	82	43	43	33	26	38	43	48	48	48	53	43	48	65	53	53	65	43	43	38
105	69	69	69	61	57	48	53	72	65	72	69	69	65	57	69	43	72	61	43	57
2202/7	76	53	53	53	48	48	43	65	48	57	69	53	57	53	53	61	57	33	43	48
237	79	48	48	38	33	33	38	53	33	53	57	38	53	38	57	48	61	48	38	43
583	76	53	53	53	38	38	53	65	48	57	53	43	38	53	43	61	57	43	33	26
493	79	57	57	57	33	53	57	61	43	53	57	48	43	57	57	65	69	48	48	43
574	69	43	43	53	38	38	33	65	48	57	53	43	57	61	53	53	65	43	43	48
2201/11	92	48	38	57	43	53	57	61	61	53	57	48	61	33	57	65	69	48	57	53
2204/4	79	57	48	48	43	43	57	61	53	61	57	38	43	43	38	65	61	48	38	33
2204/10	79	57	57	57	43	33	48	69	61	61	48	57	43	43	48	57	61	48	26	33
434	85	48	48	48	33	33	48	61	53	53	48	48	43	33	48	57	61	48	38	33
492	79	48	48	48	33	33	48	61	53	53	48	48	33	48	38	57	53	38	26	19
2201/8	89	61	61	61	48	48	61	72	65	57	53	61	48	48	53	69	65	43	43	38
600	76	43	43	53	26	48	43	57	48	48	53	53	38	43	43	61	57	33	43	38
2206/3	72	57	57	57	43	33	48	69	53	61	48	48	43	38	48	57	61	48	26	33
2202/6	82	53	53	43	38	38	53	57	48	57	53	43	48	43	53	61	65	53	43	38
2206/5	79	48	48	57	43	43	48	61	53	53	48	48	43	65	26	57	43	26	38	19
2202/1	82	53	53	61	65	57	61	57	65	65	53	61	72	65	53	53	57	61	61	57

Ek-1 (Devam) RAPD-PCR yöntemine göre hatlar ve çeşitler arasındaki genetik mesafe (Öklid Mesafesi)

	Pul	Seyran	610	612	397	565	563	602	272	427	604	2202/2	2204/6	105	2202/7	237	583	493
Pul	-																	
Seyran	89	-																
610	43	85	-															
612	43	79	26	-														
397	26	82	33	33	-													
565	48	69	53	43	38	-												
563	38	82	53	53	26	26	-											
602	33	79	48	48	43	19	19	-										
272	76	57	65	48	69	53	61	57	-									
427	48	94	43	61	38	48	38	43	76	-								
604	43	85	48	57	53	43	43	26	72	33	-							
2202/2	48	82	33	43	26	38	26	43	61	26	43	-						
2204/6	48	82	43	53	48	26	38	19	61	26	19	38	-					
105	65	69	61	61	65	48	57	43	43	57	61	57	48	-				
2202/7	57	82	53	43	38	26	26	33	53	38	53	38	38	48	-			
237	53	85	38	57	43	33	33	26	65	19	38	33	19	43	19	-		
583	38	82	43	53	26	26	11	19	61	26	43	26	26	48	26	19	-	
493	43	85	48	57	43	33	19	11	65	43	38	43	33	53	33	26	19	-
574	57	76	33	43	38	26	26	33	53	38	43	11	26	48	26	19	26	33
2201/11	61	92	48	48	61	53	61	48	65	53	38	53	43	61	53	48	23	57
2204/4	43	85	48	57	33	43	33	38	72	19	26	33	33	61	43	38	19	38
2204/10	43	79	48	48	43	33	33	26	57	43	48	33	33	33	43	38	19	38
434	43	85	48	57	43	33	33	26	65	33	38	33	19	43	43	26	19	38
492	33	79	48	48	33	19	19	11	57	33	38	33	19	43	33	26	00	26
2201/8	48	89	53	43	48	38	38	33	53	48	53	48	38	48	38	43	26	43
600	38	76	53	43	38	11	11	00	53	48	33	38	26	48	26	33	26	19
2206/3	43	79	38	48	33	33	19	26	57	33	48	19	33	43	33	26	00	26
2202/6	48	89	43	61	38	38	26	33	69	11	33	26	11	57	38	19	11	33
2206/5	33	72	48	38	19	19	19	26	57	43	48	33	33	53	33	38	19	38
2202/1	65	82	61	61	57	65	65	69	69	65	69	57	57	57	72	69	65	76

Ek-1 (Devam) RAPD-PCR yöntemine göre hatlar ve çeşitler arasındaki genetik mesafe (Öklid Mesafesi)

	574	2201/11	2204/4	2204/10	434	492	2201/8	600	2206/3	2202/6	2206/5	2202/1
574	-											
2201/11	53	-										
2204/4	43	48	-									
2204/10	33	48	38	-								
434	33	38	38	11	-							
492	33	48	26	11	11	-						
2201/8	48	33	43	19	19	19	-					
600	26	53	43	33	33	19	38	-				
2206/3	19	57	26	11	26	11	33	33	-			
2202/6	26	53	19	33	19	19	38	38	19	-		
2206/5	33	57	38	26	26	11	33	19	26	33	-	
2202/1	57	69	69	53	53	61	65	65	61	57	52	-

Ek-2 (Devam) Mercimek hatları ve çeşitlerine ait RAPD-PCR bandlarının okunması

Fırat	Meyveci	Erzurum	Pul	Syrian	610	612	397	565	563	602	272	427	604	2202/2	2204/6	105	2202/7	237	583
1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1										

Ek-3 SDS-PAGE yöntemine göre hatlar ve çeşitler arasındaki genetik mesafe
(Öklid Mesafesi)

	Malazgirt	Özbek	Çiftçi	Seyran	Fırat	Akm 235	Emre	Meyveci	Erzurum	Kayı	Akm 242	AliDayı	Sultan	Sazak	Y. Kırmızı	Pul11	Akm 434	Akm 237
Malazgirt	-																	
Özbek	.50	-																
Çiftçi	.00	.50	-															
Seyran	.50	.71	.50	-														
Fırat	.71	.87	.71	.50	-													
Akm 235	.71	.87	.71	.87	1.0	-												
Emre	.00	.50	.00	.50	.71	.71	-											
Meyveci	.71	.87	.71	.87	1.0	.00	.71	-										
Erzurum	.71	.50	.71	.50	.71	1.0	.71	1.0	-									
Kayı	.87	1.0	.87	.71	.87	.50	.87	.50	.87	-								
Akm 242	.50	.71	.50	.00	.50	.87	.50	.87	.50	.71	-							
AliDayı	.50	.71	.50	.00	.50	.87	.50	.87	.50	.71	.00	-						
Sultan	.71	.87	.71	.50	.71	.71	.71	.71	.71	.50	.50	.50	-					
Sazak	.71	.87	.71	.50	.00	1.0	.71	1.0	.71	.87	.50	.50	.71	-				
YKırmızı	.71	.50	.71	.50	.71	1.0	.71	1.0	.00	.87	.50	.50	.71	.71	-			
Pul11	.50	.71	.50	.71	.50	.87	.50	.87	.87	1.0	.71	.71	.87	.50	.87	-		
Akm 434	.71	.50	.71	.50	.71	1.0	.71	1.0	.00	.87	.50	.50	.71	.71	.00	.87	-	
Akm 237	.50	.71	.50	.00	.50	.87	.50	.87	.50	.71	.00	.00	.50	.50	.50	.71	.50	-

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Gülnar-Mersin’de doğdu. İlk orta ve lise eğitimini Gülnar’da tamamladıktan sonra, 1988 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde Lisans eğitimine başladı ve 1992 yılında Ziraat Mühendisi ünvanıyla lisans eğitimini tamamladı. 1994 yılında Bitki Islahı ve Genetiği dalında Milli Eğitim Bakanlığı adına Yurt Dışı master bursu kazandı. 1997 yılında Amerika’da Wisconsin Üniversitesi Bitki Islahı ve Genetiği Bölümünde Yüksek Lisansını tamamladı.