Mercimekte Kışa Dayanıklılığı Kontrol Eden Genlerin Haritalanması ve Dayanıklılıkla İlgili Moleküler Markırların Belirlenmesi

Proje No: 106O093

Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN
Yrd. Doç. Dr. Beybin BUCAK HACIKAMİLOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

HAZİRAN 2009
ŞANLIURFA

ÖNSÖZ

Mercimek, özellikle kırmızı mercimek, ülkemiz için bölgesel üretim özelliği ve dünya ticaretinde söz sahibi önemli ülke olmamızı sağlaması nedeniyle önemli bir üründür. Güneydoğu Anadolu Bölgesi (GDA) sulama projeleri nedeniyle kırmızı mercimek üretim alanlarında olası daralmaya karşı, kışa dayanıklı mercimek çeşitlerinin geliştirilmesiyle mercimek ekim alanlarının İç Anadolu bölgesinde kışlık ekimi mümkündür. Bunun yanında, kışlık ekim yapılan GDA bölgesinde sert geçen kışlarda mercimek kış soğuklarından zarar görmektedir. Bu nedenle kışa dayanıklı mercimek çeşitlerinin geliştirilmesi, alternatif ekim alanlarının oluşmasına ve de halihazırda kışlık mercimek ekimi yapılan GDA bölgesinde mercimeğin kış zararlarından korunmasında önem arz etmektedir.

Bu projeyle, mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden genlerin haritalanması ve kışa dayanıklılığı belirlemede kullanılabilecek moleküler markırların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu araştırmanın desteklenmesi TÜBİTAK tarafından gerçekleştirilmiş olup, verilen destekten dolayı TÜBİTAK' a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ II
İÇİNDEKİLER III
TABLO LİSTESİ IV
ŞEKİL LİSTESİ V
ÖZET VI
ABSTRACT VII
1. GİRİŞ 8
2. GENEL BİLGİLER 11
2.1. Kışa Dayanıklılıkla İlgili Çalışmalar 11
2.2. Moleküler Markırlar, Bağlantı (Linkage) ve QTL (Quantitative Trait Locus) Haritalarının Bitki Islahında Kullanımı 12
3.GEREÇ ve YÖNTEM 17
3.1. Bitki Genetik Materyali 17
3.2. Kışa Dayanıklılık Denemeleri ve Değerlendirilmesi 17
3.3. DNA İzolasyonu 18
3.4. DNA Saflık Analizi 19
3.5. PCR Analizlerinde Kullanılan Ebeveynler ve RIL Hatlarına Ait DNA Örnekleri 19
3.6. Markır Analizleri ve PCR Protokolleri 20
3.6.1. Morfolojik Markırlar 20
3.6.2. ISSR ve RAPD Markır Analizleri ve PCR Protokolü 20
3.6.3. Microsatellit Markır Analizleri ve PCR Protokolü 21
3.6.4. AFLP Metodu ve PCR Protokolü 23
3.7. DNA Markırlarinin Skorlanması ve Genetik Haritanın Oluşturulması 26
3.8. Kışa Dayanıklılık Genlerinin Haritalanması (Kantitatif Trait Lokus = QTL haritalama) 27
4. BULGULAR 28
4.1. Canlılık Oranları (Survival) ve Kışa Dayanıklılık Değerlendirmeleri 28
4.2. Markır Analizleri ve Genetik Bağlantı Haritası (Linkage map) 31
4.3. QTL Analizleri 38
5.TARTIŞMA ve SONUÇ 45
REFERANSLAR 48

TABLO LİSTESİ

Tablo 3. 1. PCR analizleri ve jel yüklemede ebeveynler ve RIL hatlarına ait sıralama.....19
Tablo 3. 2. PCR karışım hazırlama (Bir örnek için hazırlanan reaksiyon içeriği) 22
Tablo 3. 3.. Denemede kullanılan SSR primerlerine ait PCR protokolleri 22
Tablo 3. 4. Çalışmada kullanılan AFLP primer kombinasyonları ve polimorfik bant sayıları.....26
Tablo 4.1. Haymana 1997-98, Pullman 1998-99 ve Haymana 1999-00 lokasyonların ve 3 lokasyon ortalaması olarak mercimekte ebeveynler ve RIL hatlarına ait ortalama % canlılık (kışa dayanıklılık) değerleri.....28
Tablo 4.2. Mecimekte kışa dayanıklılık verilerine ait 3 yıllık ve birleştirilmiş varyans analiz sonuçları.30
Tablo 4.3. Mercimekte genetik bağlantı haritası geliştirmede kullanılan primerlere ve elde edilen sonuçlar 32
Tablo 4.4. Mercimek (*Lens culinaris* M.) genetik bağlantı haritasına ait özellikler 34
Tablo 4. 5. Mercimek için geliştirilen değişik genetik bağlantı haritalarında kullanılan ortak markırların bağlantı gruplarının karşılaştırılması.....34
Tablo 4.6.Tek markır analizleri sonucu kışa dayanıklılıkla ilişki gösteren markırlar, bağlı oldukları bağlantı grupları, fenotipik varyansı açıklama oranları (R^2), LOD skorları ve önemlilik dereceleri (P)..38
Tablo 4.7. Lokasyonlara göre mercimekte kışa dayanıklığı kontrol eden QTL bölgeleri ve özellikleri..40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3. 1. Elekroforez tankı ve DNA örneklerinin yürütülmesi 23
Şekil 4. 1. Lokasyonlara göre RIL populasyonuna ait % canlılık oranları (winter survival).....31
Şekil 4.2. Precoz x WA8649041 melezinden elde edilen RIL populasyonunda RAPD, SSR, ISSR, AFLP ve morfolojik markırlar kullanarak geliştirilen mercimek genetik bağlantı haritası.....37
Şekil 4.3. Haymana lokasyonu 1997-98 mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri.....42
Şekil 4.4. Pullma lokasyonu 1998-99, mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri.....43
Şekil 4.5. Haymana lokasyonu 1999-00, mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri....43
Şekil 4.6. Üç lokasyona ait birleştirilmiş veriler ve mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeler.....44

ÖZET

Mercimek nohuttan sonra ülkemizde en çok ekilen yemeklik tane baklagil bitkisidir. Bu projeyle, mercimek genom haritası oluşturulması, kışa dayanıklılığı kontrol eden genlerin mercimek genomunda haritalanması ve kışa dayanıklılıkla ilişki gösteren moleküler markırların belirlenerek markıra dayalı seleksiyon (MAS) çalışmalarında kullanılması olanakları amaçlanmıştır. Çalışmada Precoz/WA8649041 mercimek genotiplerinin melezlenmesinde elde edilen 93 rekombinant saf hat (RIL) kışa dayanıklılık için 3 lokasyonda şansa bağlı bloklar deneme desenine göre 3 tekrarlamalı olarak 3 yıl değerlendirilmiştir. RIL hatlarına ait ortalama kışa dayanıklılık oranı Pullman lokasyonunda % 27.66, 1997-98 sezonu Haymana lokasyonunda % 72.68 ve 1998-99 sezonu Haymana lokasyonunda % 92.15 olmuştur. Mercimek genetik bağlantı haritası 149 markır (59 RAPD, 57 AFLP ve 18 ISSR, 13 SSR ve 2 morfolojik) ve 11 bağlantı grubundan oluşmuştur. Genetik harita toplam uzunluğu 1340.0 cM olup, iki markır arası ortalama uzaklık 8.99 cM'dır. Kışa dayanıklılık için yapılan QTL analizleri sonucu toplam 8 QTL belirlenmiştir. Üç QTL (QTL1, QTL2 ve QTL3) bağlantı grubu 2'de 3 QTL (QTL4, QTL5 ve QTL6) bağlantı grubu 4'de, 1 QTL (QTL7) bağlantı grubu 7'de ve 1 QTL (QTL8) bağlantı grubu 10'da belirlenmiştir. Lokasyonlara göre, Haymana lokasyonu 1997-98 sezonu için 4 QTL, Pullman lokasyonunda 5 QTL ve Haymana lokasyonunda 1999-00 sezonu için 6 QTL belirlenmiştir. Kışa dayanıklılık için MAS çalışmalarında kullanılma ihtimali olabilecek aday markırlar olarak: U715_1, CS54_3 ve N19a QTL1 için; D07 ve AB08 QTL2 için; CS31_3 ve AB14b QTL3 için; B01a markırı QTL 4 için, UBC840_3, UBC807_3, UBC807_12 QTL5 için, UBC807_11 QTL6 için; B10b markırı QTL7 için ve UBC840_2 markırı QTL8 için belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mercimek, kışa dayanıklılık, genetik harita, QTL

ABSTRACT

Lentil is the second most planted food legume crop after chickpea in Turkey. With this project, it is aimed to develop a genetic linkage map of lentil, to detect and map genes for winter survival and to determine candidate genetic markers for use in marker assisted selection (MAS). A total of 93 recombinant inbred lines (RILs) from the cross of Precoz/WA8649041 were evaluated for winter survival in a randomized complete block design with three replications over three years. Mean survival of the RILs was 27.66, 72.68 and 92.15 % at Haymana in 1997-98, at Pullman in 1998-99, and at Haymana in 1999-00, respectively. A genetic linkage map of lentil was developed with 149 markers (59 RAPD, 57 AFLP ve 18 ISSR, 13 SSR and 2 morphologic). The map was comprised of 11 linkage groups covering 1340 cM with an average map distance of 8.99 cM between markers. A total of 8 QTL was determined for winter survival. Three QTL (QTL1, QTL2 ve QTL3) on linkage group 2, 3 QTL (QTL4, 5 and 6) on linkage group 4, 1 QTL (QTL7) on linkage group 7 and 1 QTL (QTL8) on linkage group 10 were detected. QTL detection based on locations was 4 QTL at Haymana in 1997-98, 5 QTL at Pullman in 1998-99 and 6 QTL at Haymana in 1999-00. Candidate molecular markers for use in MAS were determined as: U715_1, CS54_3 and N19a for QTL1; D07 and AB08 for QTL2; CS31_3 and AB14b for QTL3; B01a for QTL 4; UBC840_3, UBC807_3 and UBC807_12 for QTL5; UBC807_11 for QTL6; B10b for QTL7 and UBC840_2 for QTL8.

Key words: Lentil, winter survival, genetic map, QTL

1. GİRİŞ

Mercimek (*Lens culinaris* M.) tek yıllık, kendine döllenen, diploid (2n=2x=14) bir bitkidir. Özellikle Orta Doğu, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Avusturalya'da yetişebilen önemli bir üründür. Mercimek, özellikle insan beslenmesinde ve hayvan yemlerinde zengin bir protein kaynağı olması nedeniyle önem teşkil eden bir üründür (Rubeena ve ark., 2003; Hamwieh ve ark., 2005).

Mercimek nohuttan sonra ülkemizde en çok ekilen yemeklik tane baklagil bitkisidir. Dünyada 48 ülkede yetiştirilmekte 3.5 milyon ha ekim alanı ve 3 milyon ton üretim ile yemeklik baklagiller arasında beşinci sırada yer almaktadır. Ülkemiz 1990'lı yıllarda dünya mercimek üretiminde yaklaşık %20'lik bir paya sahipken, bugün bu oran %10'lara düşmüş ve Kanada %20'lik payla (FAO, 2006) dünya mercimek fiyat politikasını kontrol eder duruma gelmiştir. GAP projesinin devreye girmesiyle sulamaya geçilen alanlarda mercimek üretimi artık yapılmamaktadır. Diğer yandan ürün destekleme fiyatlarının olmayışı mercimek üretiminin bu bölgede azalmasına neden olmuştur. Ancak bu olumsuzluklara rağmen, bölgede sulanamayan alanlarda mercimek tahıllarla ekim nöbetindeki önemini korumakta ve ekimi devam etmektedir. Kırmızı mercimek üretiminin bölgedeki ekim alanı azalışına alternatif olarak kışa dayanıklı mercimek çeşitleri geliştirilmesiyle Orta Anadolu bölgesinde kışlık mercimek üretiminin yapılması mümkün gözükmektedir. Halihazırda ülkemizde iç bölgelerimizde kışlık ekim yapılmamaktadır. Bunun nedeni kışa ve hastalıklara dayanıklı, kaliteli ve yüksek verimli mercimek çeşitlerinin bulunmayışıdır.

Mercimek, tahıl ağırlıklı ekim sisteminin yaygın olduğu yerlerde önemli bir bitkidir. Bu sistemde mercimek tahıl hastalıklarının ve tahıllara arız yabancı otların kontrolünde, toprağa azot sağlanmasında yardımcı olmaktadır. Bunun yanında mercimek birçok ülke çiftçilik sistemlerinde insan ve hayvan beslenmesinde ve toprak verimliliğini artırmada kullanılan önemli bir baklagil bitkisidir. Fakat mercimeğin adaptasyonu ve üretimi soğuk, kuraklık ve tuzluluk gibi abiotic stres faktörlerince sınırlanmaktadır. Bu faktörler içinde kışa dayanıklılık yüksek alanlarda, örneğin Orta Anadolu'nun yüksek kesimlerinde, yetiştirilmesi için en önemli anahtar faktördür. Diğer yandan mercimek sadece yağışa dayalı bölgelerde yetiştirildiği için kuraklık stresi bitkinin yetiştirildiği tüm alanlarda verim azaltıcı etkiye sahiptir.

Mercimek verimi ekim zamanının değiştirilmesiyle mümkün olabilir. Yazlık ekim yerine kışlık ekim yaparak daha uzun bir gelişme dönemi sağlanmakta, bitki sonbahar ve ilkbahar yağışlarından daha iyi faydalanmaktadır. Kışa dayanıklı mercimek çeşitlerinin ekilmesiyle mercimek verimi % 50 oranında artırılabilir (Şakar ve ark., 1988).

İklime uyma herhangi bir çevresel strese adaptasyon özellikle düşük sıcaklığa toleransı ifade etmektedir (Lewitt, 1980). İklime uyma genelde sakınım mekanizmasından ziyade toleransı ifade eder. Kışa dayanıklılık ise bir bitkinin kış streslerine karşı dayanma veya tolere edebilme yeteneğini ifade etmektedir (Lewitt, 1980). Soğuğa dayanıklılık ise düşük dondurucu sıcaklıklara dayanıklılığı ifade etmektedir (Steponkus, 1978). Kışa dayanıklılık geniş bir terim olup bir çok faktörü ifade etmektedir; örneğin soğuğa dayanma, donma-çözülmeye dayanma, kar örtüsüne, toprak kabarmasına, kurutucu rüzgara, ve hastalıklara

dayanma gibi (Dexter, 1956). Bu faktörler ya doğrudan ya dolaylı olarak ya da beraber etkileşimlerde bulunarak bitkinin değişen oranlarda zarar görmesine veya ölümüne neden olmaktadır. Soğuğa dayanıklılık veya soğuğa tolerans kışa dayanıklılığa göre daha dar bir terim olup, kışa dayanıklılığın önemli bir komponenti olarak kabul edilmektedir (Lewitt, 1980; Hayes ve ark., 1993; Fowler ve ark., 1981).

Kışa dayanıklılığı değerlendirmede en önemli problemlerden birisi istenilen kış soğuklarının (bitkiyi öldürecek derecede soğuk oluşması) yıldan yıla değişiklik arz etmesidir. Sert kış oluşumu genelde 10 yılda bir oluşmakta, bu da kışlık testlerin arazide yapılmasını ve arzu edilen dayanıklılık derecesinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Arazi testlerine olan bağımlılığı azaltmak ve bu testlerde oluşan hataları en aza indirmek için ıslahçılar genelde kontrollü şartlarda soğuk testleri uygulamaktadır (Sutka ve ark., 1981; Pan ve ark., 1994). Ancak soğuk testleri kışa dayanıklılığın onemli bir komponenti olmasına rağmen buda yeterli olmamaktadır. Günümüz modern moleküler teknolojilerin ıslahta uygulanması kışa dayanıklı çeşit geliştirmede moleküler markırların kullanılması, klasik metotlarda karşılaşılan sorunları çözmede büyük ümitler arz etmektedir.

Kışa dayanıklılığı belirlemede kullanılan en yaygın metotlardan birisi de bitki fidelerinin kıştan önce ve kıştan çıkıştan sonra sayılarak yaşamını sürdüren bitkilerin toplam bitki sayısına oranlanmasıyla % de olarak belirlenmesidir. Yine toprak üstü aksamının zararlanma derecesini bir skala ile değerlendirilmesiyle de kışa dayanıklılık tespiti yapılmaktadır (Murray ve ark., 1988; Kusmenoğlu ve ark., 1995). Kışa dayanıklılık kontrollü şartlarda yapılan soğuk testleri ile de belirlenebilmektedir. Bu metodda bitkiler belli bir sure soğuğa maruz bırakıldıktan sonra tekrar bitki gelişimi normal şartlarda gözlenmekte ve bitkilerin doku kararması (Quamme, 1978 and Lewitt, 1980), dokuların su içeriği (Fowler ve ark., 1979), triphenyl tetrazolium chloride (TTC), leachate (Dexter et al. (1932), and plasmolysis (Olien, 1967) testleriyle belirlenmektedir. Soğuğa dayanıklılığı belirlemede en yaygın kullanılan yöntem öldürücü soğuk derecesinin tesbitidir. Bitkilerin % 50 sinin öldüğü sıcaklık derecesi LT_{50} (Lethal temperature) veya öldürücü sıcaklık derecesi olarak nitelendirilmektedir (Lewitt, 1980, Steponkus, 1978 ve Quamme, 1978).

Kışa dayanıklılık bir çok bitkide çalışılmış olup, elde edilen bilgiler kışa dayanıklı çeşit geliştirmede basarıyla kullanılmıştır. Dayanıklı genotip belirleme yani kışa dayanıklılığı sağlayan gen kaynaklarının tespiti genelde ıslah çalışmalarında ilk adımı oluşturmaktadır. İkinci adım olarak kışa dayanıklılığın kalıtımını sağlayan genetik mekanizmaların belirlenmesi gelmektedir. Bu adımın belirlenmesi kışa dayanıklı çeşit geliştirmede etkin ve başarılı ıslah programları geliştirmek için önemlidir.

Mercimekte kışa dayanıklılık çalışmaları genelde mercimek germplazmında dayanıklı genotipleri seçmek için yapılmış (Erskine ve ark., 1981, Spaeth and Muehlbauer, 1991) ancak dayanıklılıkla ilgili genetik çalışmaların sınırlı olduğu gözükmektedir. Kışa dayanıklılıkla ilgili literatür bilgileri az da olsa mevcut olup kışa dayanıklılığın kalıtımı, genetiği ve moleküler markırların tespiti F2 populasyonları veya rekombinant kendilenmiş hatlar kullanılarak belirlenmiştir (Ali ve ark., 2000; Kahraman ve ark. 2004a,b). Kışa dayanıklılığın kalıtımı üzerine yapılan gerek klasik ve gerekse moleküler çalışmalar, karakterin

kantitatif kalıtım gösterdiğini, 1 major ve 4 kücük QTL (kantitatif karakter lokus) in kışa dayanıklılığı kontrol ettiğini göstermektedir. Ancak bu çalışmalardaki bilgilerin desteklenmesi ve doğrulanması için yeni bilgilere gereksinim duyulmaktadır. Kışa dayanıklılığı sağlayan mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve ıslah programlarında klasik ve modern tekniklerin beraber kullanılması kışa dayanıklı mercimek çeşitlerinin geliştirilmesinde temel bir öncelik teşkil etmektedir.

Bu proje ile AFLP (Amplified Fragment- Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic) ve ISSR (İnter Simple Seguence Repeats) DNA markırları kullanarak mercimek genom haritası oluşturmak, kışa dayanıklılığı kontrol eden genlerin veya kantitatif karakter lokusların (QTL) mercimek genomunda haritalanması ve kışa dayanıklılıkla ilişki (link) gösteren moleküler markırların belirlenerek ileriki ıslah çalışmalarında gen transferi ve dayanıklı hatları seçmede kullanılması olanakları amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kışa Dayanıklılıkla İlgili Çalışmalar

Kışa dayanıklılık birçok bitkide çalışılmış olup elde edilen bilgiler kışa dayanıklı çeşit geliştirmede başarıyla kullanılmıştır. Yemeklik tane baklagiller grubu içinde bakla kışa en dayanıklı olarak kabul edilmekte ve bunu sırasıyla mercimek bezelye nohut takip etmektedir (Murray ve ark., 1988).

Mercimekte kışa dayanıklılığın kalıtımı, genetiği ve moleküler markırların tespiti F2 popülasyonları veya rekombinant kendilenmiş hatlar kullanılarak belirlenmiştir (Ali ve ark., 2000; Kahraman ve ark. 2004a,b). Kışa dayanıklılığın kalıtımı üzerine yapılan gerek klasik ve gerekse moleküler çalışmalar, karakterin kantitatif kalıtım gösterdiğini, 1 major ve 4 küçük QTL in kışa dayanıklılığı kontrol ettiğini göstermektedir. Ancak bu çalışmalardaki bilgilerin desteklenmesi ve doğrulanması için yeni bilgilere gereksinim duyulmaktadır. Kışa dayanıklılığı sağlayan mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve ıslah programlarında klasik ve modern tekniklerin beraber kullanılması kışa dayanıklı mercimek çeşitlerinin geliştirilmesinde temel bir öncelik teşkil etmektedir.

Bezelyede kışa dayanıklılık, dominant (Cousin ve ark., 1985) ve aditif (Auld ve ark., 1983a) genlerle kontrol edildiği ve kantitatif kalıtım gösterdiği, 3 yada 4 genin kışa dayanıklılığı kontrol ettiği bildirilmiştir (Liesenfield ve ark., 1986). Nohutta soğuğa dayanıklılık en az 5 gen tarafından kontrol edilmekte ve dayanıklılık dominant genlerce sağlanmaktadır (Malhotra and Singh (1990). Arpada moleküler markırlar kullanılarak yapılan çalışmada gerek tarla gerekse kontrollü şartlarda yapılan testler sonucu 1 major QTL' in soğuğa dayanıklılığı kontrol ettiği tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmalarda, kışa dayanıklılığın genel olarak kantitatif bir kalıtım gösterdiği göze çarpmaktadır. Bunun yanında kullanılan bitki materyali ve çevresel faktörler kalıtım çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Thomashow (1990) buğdayda soğuğa dayanıklılığı hangi kromozomdaki genlerin kontrol ettiğini belirlemek üzere yapılan çok sayıdaki araştırma sonuçlarını derleyerek yaptığı çalışmada, 21 kromozoma sahip buğdayda 11 kromozomun soğuğa dayanıklılık üzerine etkisi olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçlar soğuğa dayanıklılık çalışmalarının ne kadar kompleks ve zor olduğunu belirtmek için en güzel örneklerdendir. Çalışmalardaki bu kadar farklı sonuçların rapor edilmesi, denemelerde uygulanan soğuk test prosedürleri, farklı ebeveynlerin kullanılması ve hardening şartlarının farklı olmasına dayandırılmaktadır.

Kışa dayanıklılık ve diğer karakterler arasındaki ilişkilerin incelenmesi karakterler arasındaki doğal ilişkiler hakkında ipuçları verebilir. Bitki ıslahçılarının uzun zamandan beri en büyük arzularından birisi de

kışa dayanıklılığı belirlemede kolay ve güvenilir seleksiyon kriteri aramak olmuştur. Örneğin bakla bitkisinde soğuğa dayanıklılık ile büyüme miktarı, metabolik aktivite ve doku farklılaşması ilişkilendirilmiştir (Herzog, 1988). Genelde yazlık bakla tipleri daha hızlı büyüme göstermekte ve soğuğa hassas olmakta, buna karşın kışlık bakla tiplerinde büyüme ve metabolik aktivite yavaş olmakta ve dolayısıyla soğuğa dayanıklılık daha fazla olmaktadır (Herzog, 1980).

Nohutta büyüme şekli, yaprakçık alanı, ilk çiçeklenme tarihi, bitki boyu ve 100-tohum ağırlığı ile soğuğa dayanıklılık arasındaki ilişkiler önemli bulunmamış ve seleksiyon kriteri olarak kullanımı uygun görülmemiştir. Diğer yandan çimlenme ve çıkışın soğuğa dayanıklı hatlarda daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir (Singh ve ark., 1989). Mercimekte küçük tohumlulukla kışa dayanıklılık arasında önemli ilişki olduğu ve kışa dayanıklı hatlarda genelde yayvan büyüme olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalardan görüleceği üzere kışa dayanıklılık ile yukarda bahsedilen karakterler arasında ilişkiler olduğu tespit edilmesine rağmen, seleksiyon kriteri olarak hiçbiri kullanılmamaktadır. Moleküler DNA teknolojisi kışa dayanıklılığın değerlendirilmesinde kullanılabilecek seleksiyon kriterlerinin bulunmasında sınırsız imkanlar sunmaktadır.

2.2. Moleküler Markırlar, Bağlantı (Linkage) ve QTL (Quantitative Trait Locus) Haritalarının Bitki Islahında Kullanımı

Moleküler markırlar, genetik bağlantı (linkage) haritalarının oluşturulmasında çok önemli araçlardır. Genetik bağlantı haritaları, moleküler markırların kalıtımı temeline dayanır. Genom haritalarının amacı, ilgilenilen genin markırlarını tespit etmek ve bu markırları klonlamaktır. Bu metotlar, kültürü yapılan birçok bitki türünün genetiğinin anlaşılmasına değerli katkılar sağlamıştır (Tanksley ve Hewitt, 1988). Haritası yapılan genlerin çoğunda kullanılan DNA markırları; Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment- Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeats (SSR) ve Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) gibi markırlardır (Mohan ve ark., 1997; Gülşen ve ark., 2005; Collard ve ark., 2005). Markır, ilgilenilen bir karakteri kontrol eden gene ne kadar yakınsa, rekombinasyonla markır ve genin birbirinden ayrılma ihtimali de o kadar düşük olacaktır. Bu yüzden bir türe ait genetik haritadaki markır sayısının yüksek olması arzu edilmektedir (Jones ve ark., 1997; Collard ve ark., 2005).

Günümüzde geleneksel ıslah metotlarına alternatif olarak belirlenen ve büyük ölçüde ivme kazanan markır teknikleri, hibridizasyona ve PCR'a dayalı olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir. (Mohan ve ark., 1997; Gülşen ve ark., 2005). Markır teknikleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, PCR ile yapılabilmeleri, polimorfizm gösterme kaliteleri, dominant veya ko-dominant özellikleri, verimlilik, otomasyon ve maliyet açısından farklılıklar göstermektedirler.

Seçilen populasyon tipi ve lokus sayısı, çalışmanın kolaylığı, analiz maliyeti ve altyapı markır sistemlerini etkileyen faktörleri oluşturmaktadır. Her moleküler markır yöntemi avantaj ve dezavantajlara sahiptir.

Bir bitki türünün genetik haritasını yapmak için ilk aşama, uygun ebeveynlerin seçimini ve açılım popülasyonlarının hazırlanmasını gerektirmektedir. Moleküler markır teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda F2 dölleri, geriye melez popülasyonları, yakın isogenik hatlar (near-isogenik lines), doubled haploidler ve rekombinant saf hatlar (recombinant inbred lines, RILs) kullanılmaktadır (Yıldırım ve Kademir, 2001). Bunlardan RIL popülasyonları ile yapılan çalışmalardan iyi sonuçlar elde edilmektedir (Mohan ve ark., 1997).

Paterson (1996), genetik haritayı bir yol haritası olarak tanımlamaktadır. Genetik haritalar sadece ekonomik öneme sahip karakterlerle ilgili gen etkilerinin belirlenmesi, genomda haritalanması ve bunların saptanmasında değil, ayrıca bitki genomunun fonksiyonu, evrimi ve yapısı konularında da bazı bilgiler sunmaktadır. Özellikle yoğun olarak haritalanmış DNA markörlerinden oluşan genom haritaları birçok bitkide geliştirilmiştir (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Gülşen ve Mutlu, 2005).

Genetik haritaların üretim hızı ve bu bilginin bitki ıslahı programlarında kullanılma oranı oldukça artmıştır. Basit ve karmaşık kalıtıma sahip olan tek genlerin her ikisi de DNA markörleri tarafından kolayca belirlenebilmektedir. Tek gen tarafından idare edilen birçok karakter (bazı hastalıklara dayanıklılık gibi) genetik haritalar ve DNA markörleri sayesinde çok kısa sürede farklı genotiplere transfer edilmiştir (Jones ve ark., 1997).

Çeşitlere ait önem teşkil eden özelliklerle ilgili markırlarla oluşturulmuş detaylı bir genom haritası, ıslah çalışmalarında verimliliğin arttırılması bakımından önemli bir kaynaktır. Günümüzde, tarımsal öneme sahip ve birçok ürüne ait genetik haritalar oluşturulmuş durumdadır.

Mercimek genomuna ait ilk haritalama çalışmaları izoenzimler, morfolojik ve sitolojik markırlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki haritalama çalışmalarında DNA markır tekniklerinden yararlanılmıştır. DNA markörlerinin morfolojik ve izoenzim markırlarına göre avantajı, yüksek miktarda polimorfizim elde edilebilmesidir. Örneğin, PCR'e dayalı RAPD markır tekniği birçok baklagil türünün genom haritasının oluşturulmasında kullanılmıştır (Eujayl ve ark., 1997; Rubeena ve ark., 2003)..

Islah çalışmaları başlangıç aşamasından sonuç kademesine kadar seleksiyon uygulanmasını gerekmektedir. Bu nedenle seleksiyon ne kadar sağlıklı yapılabilirse çalışmanın başarısı da o derece artacaktır. Geleneksel seleksiyon, genel olarak görsel yeteneklere dayanan fenotipik gözlemler bazında gerçekleşmektedir. Ancak fenotip her zaman genotipi yansıtmamaktadır. Birçok bitkisel özellik önemli ölçüde çevre koşulları tarafından modifiye edilmekte ve markır olarak kesin sonuçlar veremeyebilmektedir (Yüce, 2005). Bu nedenle, seleksiyonda daha duyarlı sonuçlar veren moleküler markırlar kullanılmaktadır.

Araştırması yapılan bir karekterle bağlantılı markırların yer aldığı detaylı bir genetik haritanın geliştirilmesi ıslah çalışmalarında başarının arttırılmasında önemli bir araçtır. Tarımsal öneme sahip birçok ürünün genom haritası oluşturulmuştur (O'Brien, 1993). Mercimeğe ait harita oluşturulurken polimorfizimin arttırılabilmesi için öncelikle interspesifik haritalama populasyonları kullanılmıştır (Muehlbauer ve ark., 1993).

Detaylı bir genetik bağlantı haritası ve araştırılan önemli karakterleri kontrol eden genlerin genomda yerlerinin aydınlatılması, ıslah çalışmalarında oldukça önem taşımaktadır. Haritalama çalışmalarında iyi bir bağlantı haritasının oluşturulmasında rekombinant saf hatlar iyi bir kaynaktır. Bu haritalama popülasyonları, çok yıllık tarla denemelerinde kullanılmaları ve kantitatif karakterlerin haritalanmasında yeterli tohumu sağlamaları nedeniyle kantitatif karakterlerin haritalanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Eujayl ve ark., 1998).

Üzerinde çalışılan bitkiye ait DNA markörlerinin tanımlanması ve o bitkiye ait genomik haritaların oluşturulması, yeni çeşitlerin kısa sürede geliştirilmesini kolaylaştırarak ve ıslah süresini kısaltarak zamandan kazanç sağlanmasına ve seleksiyonda güvenilirlik ve kolaylık elde edilmesine yardımcı olmuştur. Bu amaçla, bir çok moleküler markır tekniği geliştirilerek bunlardan yararlanılmaya başlanmıştır (Michelmore ve ark., 2006). Son yıllarda, moleküler markır teknikleri ile iki veya daha fazla birey arasındaki spesifik sekans farklılıkları dahi tespit edilebilmektedir.

Moleküler markırların en etkili kullanıldığı alanlardan biriside, birden çok gen tarafından idare edilen kantitatif karakterlerin ıslahı alanında yapılan çalışmalardır. Bitki boyu, çiçeklenme zamanı, kardeşlenme, verim ve verim unsurları, kalite, bazı hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık gibi birçok karakter kantitatif olarak idare edilmektedir ve bitki ıslahı çalışmaları açısından oldukça büyük öneme sahiptirler. Kantitatif karakterlerin birden fazla lokustaki genler (QTL) tarafından idare edilmeleri, her bir lokusun etki derecesinin farklı olması ve çevre şartlarından fazla etkilenmeleri nedeniyle klasik metotlarla ıslah çalışmalarında belirlenmeleri ve aktarılmaları oldukça zor ve uzun yıllar gerektirmektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

2.3. Mercimek Bitkisi ile Yapılan Genetik Haritalama Çalışmaları

Mercimekte ilk genetik haritalar 90'lı yıllarda oluşturulmaya başlanmış olup, genelde izozimler, RFLP ve morfolojik markırlar kullanılmış, fakat az sayıda markörden oluşan ve mercimek genomunun az bir kısmını kapsayan haritalar yapılmıştır (Havey ve Muehlbauer, 1989; Weeden ve ark., 1992; Tahir ve ark., 1994). Daha sonra, fazla sayıda markırı içeren yeni genetik haritalar geliştirilmiştir (Eujayl ve ark., 1998; Duran ve ark., 2004; Kahraman ve ark., 2004b; Hamwieh ve ark., 2005, Tullu ve ark., 2008).

Weeden ve ark. (1996), interspesifik melezleme *(Lens ervoides x L. culinaris)* ile oluşturdukları F_2 populasyonu ile 64 markırı içeren morfolojik, izoenzim ve DNA markırı kullanmışlar ve 560 cM uzunluğunda bağlantı haritası elde etmişlerdir. DNA markırı olarak RFLP tekniğinden yararlanmışlardır.

Eujayl ve ark. (1997), morfolojik, izoenzim, RFLP, oligonükleotid ve RAPD markırları kullanarak yaptıkları çalışmada, 28 adet RAPD, 1 adet RFLP, 1 adet morfolojik ve 3 adet oligonükleotid markırı ile 9 adet bağlantı grubundan oluşan genetik harita oluşturmuşlardır. Başka bir çalışmada intraspesifik

melezlemeden elde edilen RIL popülasyonu ile 177 markırdan oluşan (89 RAPD, 79 AFLP, 6 RFLP ve 3 Morfolojik markır) genetik harita geliştirmişlerdir.

Eujayl ve ark. (1998), 86 RIL hattı ile 171 markörden oluşan (86 RAPD, 79 AFLP ve 6 RFLP) 1073 cM uzunluğunda mercimek genom haritası oluşturmuşlardır. Morfolojik markır olarak, kabuk açılması, tohum kabuk paterni ve çiçek rengi bölgeleri haritalanmıştır. Çalışmada, AFLP markırlarının RAPD markırlarına göre daha fazla sapma gösterdiği gözlenmiştir.

Emami ve Sharma (1999), mercimek bitkisi ile yaptıkları çalışmada, 13 tane morfolojik markır incelemişler ve bunlardan 3 tanesinin birbiriyle bağlılık (linkage) gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu markırlar, Ert (yayılma ve büyüme yeteneği), Gs (kahverengi ve yeşil gövde) ve B1 (kahverengi-yeşil yaprak)'dir. B1 ve Gs arasında %14, B1 ve Ert arasında % 34, Gs ve Ert arasında ise % 38 rekombinasyon frekansı bulunduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta, B1 geninin Ert ve Gs arasında yer aldığını tespit edilmiştir.

Rubeena ve ark. (2003) F_2 popülasyonu kullanarak 114 markırdan oluşan (100 RAPD, 11 ISSR ve 3 RGA) ilk intraspesifik mercimek bağlantı haritasını geliştirmişlerdir. Harita 9 bağlantı grubundan oluşup, toplam uzunluğu 784.1 cM olarak belirlenmiştir.

Duran ve ark. (2004), *L. culinaris. ssp. culinaris* ve *L. culinaris. ssp. orientalis* melezi ile 113 F2 bitkisi üzerinde 200 markır (71 RAPD, 39 ISSR, 83 AFLP, 2 SSR ve 5 morfolojik) kullanarak yaptıkları çalışmanın sonucunda, en fazla polimorfizmi AFLP markörleri ile elde etmişlerdir. Genetik harita 161 markır (62 RAPD, 29 ISSR, 65 AFLP, 4 morfolojik ve 1 SSR) ve 10 bağlantı grubundan oluşup, harita uzunluğu 2172.4 cM ve iki markır arasındaki ortalama uzaklık ise 15.87 cM olarak tespit edilmiştir.

Kahraman ve ark. (2004b) kışa dayanıklılığı kontrol eden genlerin haritalanması amacıyla WA8649090 X Precoz melezinden elde edilen 96 bireyli kendilenmiş saf hat popülasyonu kullanarak, 130 markır (27 RAPD, 55 ISSR ve 48 AFLP) ve 9 bağlantı grubundan oluşan 1192 cM uzunluğunda genetik harita geliştirmişlerdir.

Mercimekte ilk defa mikrosatellit markırları kullanarak yapılan genetik haritalama Hamwieh ve ark. (2005), tarafından geliştirilmiştir. ILL 5588 ve ILL 692-16-1(s) melezlemesinden elde edilen 86 bireyli RIL populasyonu ile 41 mikrosatellit ve 45 AFLP markırı kullanarak haritalama yapmışlardır. Çalışmada, daha önceki haritadan elde edilen RAPD markırları ile birlikte toplam 283 markır haritalanmış ve 751 cM uzunluğunda harita elde edilmiştir.

Mercimeğe ait en güncel genetik bağlantı haritası, çiçeklenme ve bitki boyu genlerini haritalamak amacıyla Eston X PI320937 melezinden elde edilen 105 bireyli RIL populasyonu kullanılarak geliştirilmiştir (Tullu ve ark., 2008). Genetik harita 207 markır (144 AFLP, 54 RAPD ve 9 SSR) ve 12 bağlantı grubundan oluşup 1868 cM uzunluğundadır. İki markır arası ortalama uzaklık 8.9 cM dir. AFLP markörlerinin genomda

normal dağılım gösterdikleri belirlenirken, RAPD ve SSR markırlarının belli bağlantı gruplarında toplandığı rapor edilmiştir.

Mercimek genom haritalama çalışmaları ve geliştirilen yeni markır çeşitlerinin genetik haritalarda kullanımı gerek diğer baklagil bitkileri (bezelye, nohut, fasulye vb) ve gerekse buğdaygil bitkilerinde (buğday, arpa vb) geliştirilen genetik haritalarla karşılaştırıldığında, markır sayısı, kullanılan markır çeşidi ve geliştirilen harita sayısının oldukça az olduğu gözükmektedir. Bunun nedeni de mercimek bitkisinde çalışan araştırmacı sayısının az olmasından kaynaklanmaktadır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bitki Genetik Materyali

Çalışmanın bitki genetik materyalini iki mercimek ebeveyni ve bu ebeveynlerden geliştirilen RIL (Recombinant Inbred Lines / Kendilenmiş Saf Hatlar) popülasyonu oluşturmuştur. Ebeveynler kışa dayanıklılık ve diğer bazı karakterler bakımından genetik olarak farklılık göstermektedir. Kışa dayanıklı WA8649041 mercimek genotipi ile kışa dayanıksız Precoz çeşidinin sera koşullarında melezlenmesiyle elde edilen F1 tohumundan F_2 populasyonu geliştirilmiş ve bu popülasyonu oluşturan bireyler tek tohuma dayalı (single seed descent) metotla 6 generasyon kendileme yapılarak F_6 kademesinde 93 tane rekombinant saf hat elde edilmiştir.

DNA izolasyonu için yaprak örnekleri almak ve tohum çoğaltmak amacıyla RIL hatları ve ebeveynler 23.11.2006 tarihinde Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama arazisine ekilmişlerdir. Her hat 2 m uzunluğundaki sıralara tek sıra halinde ekilmiştir. Sıra arası mesafe 30 cm olarak ayarlanmıştır. RIL hatlarına ait fazla tohum olmadığından her sıraya yaklaşık 30 ila 50 adet tohum ekilmiştir.

3.2. Kışa Dayanıklılık Denemeleri ve Değerlendirilmesi

Ebeveynlerle birlikte RIL popülasyonu kışa dayanıklılık için 3 farklı lokasyonda (Ankara, Sivas, Türkiye ve Pullman, Washington, ABD) 3 yıl (1998-1999 ve 2000) test edilerek, kışa dayanıklılık verileri elde edilmiştir. Denemeler 1997-1998 yetiştirme sezonunda iki lokasyonda (Pullman ve Haymana), 1998-1999 sezonunda Pullman, Haymana ve Sivas olmak üzere 3 lokasyonda ve 1999-2000 sezonunda iki lokasyonda (Pullman ve Haymana) yürütülmüştür.

Farklı lokasyonlarda denemenin kurulması, kış şartlarının önceden nasıl oluşacağı bilinemeyeceği için yıl kaybını önlemek ve materyalin kışa dayanıklılık için arzu edilen ortamda test edilmesi amacıyla yapılmıştır. Kışa dayanıklılık değerlendirmesi kış öncesi bitki çimlenme ve çıkışları tamamlandıktan sonra ve kıştan çıkışta yeniden gelişmenin başladığı devrede yapılan bitki sayımlarının oranlanmasıyla belirlenmiş ve % canlılık oranı (survival) olarak ifade edilmiştir.

Popülasyonu oluşturan 93 RIL hattı ebeveynlerle birlikte Tesadüf Blokları Deneme desenine göre 3 tekrarlamalı olarak ekilmiştir. Denemelerde her bir parsel tek sıradan oluşmuş, sıralar arası mesafe 30 cm ve sıra uzunluğu 1 m olarak ayarlanmış olup, her bir sıraya yaklaşık 30 tohum ekilmiştir. Ayrıca RIL hatlarını değerlendirmede her 20 parsel veya sıradan sonra kontrol olarak kışa dayanıksız Brewer çeşidi ile kışa dayanıklı olarak WA86490 genotipi ekilmiştir. Pullman lokasyonunda ekim geleneksel sürüm yapılan ve arpa anızı olan arazide ilk yıl 15 Ocak 1997, ikinci yıl 5 Ekim 1998 ve üçüncü yıl 10 Ekim 1999' da yapılmıştır. Haymana ve Sivas lokasyonlarında ekim geleneksel sürüm yapılan arazide yapılmış olup ilk yıl 25 Ekim 1997, ikinci yıl 18 Ekim 1998 ve üçüncü yıl 10 Ekim 1999' da yapılmıştır. Sivas lokasyonunda kışa dayanıklılık denemeleri sadece 1997-1998 sezonunda yürütülmüş olup 25 Ekim 1998' de ekim yapılmıştır.

Deneme alanlarının toprak yapısı Pullman lokasyonunda ince-tınlı ve Haymana lokasyonunda tınlı-killi yapıya sahiptir.

Yetiştirme sezonu boyunca günlük hava ve toprak sıcaklıkları data logger (Hobo) kullanarak kaydedilmiştir. Hobo cihazları hava sıcaklığı ölçümlerinde yerden 25 cm yükseklikte ve toprak sıcaklığı ölçümlerinde 5 cm toprak altına yerleştirilmiştir. Ancak Haymana lokasyonunda data loggerlar arızalandığı için sıcaklık değerleri kaydedilememiştir. Bunun yerine Haymana Araştırma ve Deneme istasyonu tarafından kaydedilen aylık iklim verilerinden faydalanılmıştır.

Kışa dayanıklılık verileri SAS istatistik programı (versiyon 9.0) kullanılarak, Proc glm ve Proc mixed modelleri ile analiz edilmiştir. RIL hatlarının kışa dayanıklılık sınıflandırmasında aritmetik ortalamalar yerine ayarlanmış en küçük kareler ortalamaları (adjusted least square mean, yani RIL ortalama değerlerinin blok etkilerine göre ayarlanması) kullanılmıştır. Kışa dayanıklılık verileri % olarak belirlendiğinden, ANOVA analizleri için veriler arcsine ya da karekök transformasyonuna tabii tutulmuştur. Transforme edilen veriler ile normal okuma değerleri ANOVA analizlerinde farklılık göstermediğinde, analizlerde normal veriler değerlendirilmiştir.

3.3. DNA İzolasyonu

Bitki genomik DNA izolasyonu için, çiçeklenme öncesi her bitkiden yaklaşık 1.5-2 g yaprak örnekleri alınıp sıvı azot içinde korunarak laboratuara getirilip -80 ^{0}C de muhafaza edilmiştir. Toplam genomik DNA izolasyonu Doyle and Doyle (1987)' un uyguladığı yönteme göre bazı modifikasyonlarla yapılmıştır. DNA izolasyonu için takip edilen protokol aşağıda belirtilmiştir.

1. -80 °C' de muhafaza edilen yaprak örneklerinden yaklaşık 1 g yaprak alınarak sıvı azot ilave edilmiş havan içinde havan tokmağı yardımıyla toz şekline gelinceye kadar ezilmiştir.
2. Ezilen yaprak örnekleri 50 ml' lik tüplere konularak üzerine 7.5 ml buzda bekletilen soğuk DNA ekstraksiyon tampon ilave edilerek, tüplerin ağzı kapatılıp yavaşça kısa bir süre elde çalkalanmıştır.
3. 7.5 ml lysis buffer ve 3 ml % 5' lik sarkosyl ilave edilerek tüpler tekrar hızlı bir şekilde elde çalkalanmıştır.
4. Tüpler 65 °C' de su banyosunda 20-30 dakika bekletilmiştir.
5. Su banyosundan alınan tüpler çeker ocak içinde bir kaç dakika soğutulduktan sonra Chloroform/Isoamyl Alkol (24:1) karışımından 18 ml ilave edilmiştir.
6. Chloroform/Isoamyl Alkol ilave edildikten sonra, tüpler santrifüje yerleştirilerek 2200 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüjden sonra tüp içinde üstte kalan kısım pipetle alınarak yeni 50 ml' lik falcon tüplere aktarılmış ve üzerine tekrar 15 ml Chloroform/Isoamyl Alkol karışımı ilave edilerek kısa bir süreliğine elde sallanarak karışımın homojen olması sağlanmıştır.
8. Tüpler 10 dakika santrifüje (2200 rpm) tabii tutulmuş ve tekrar üst kısımdaki karışım pipetle alınarak yeni 50 ml' lik tüplere aktarılmıştır.
9. Steril kabin de tüp içinde bulunan karışımın hacminin 2 katı kadar (yaklaşık 15-18 ml) soğuk etanol

ilave edilerek tüpler aşağı yukarı olacak şekilde yavaşça döndürülerek DNA' nın tüpün alt kısmında çökeltilmesi sağlanmıştır.

10. Tüp içinde çökelti oluşturan DNA, ucu eğik steril ince bir cam çubuk yardımıyla (glass hook) alınarak yeni tüplere konulmuştur ve tüp içinde kalan etanolun uçması için tüpler belli bir süre ağzı açık bırakılmıştır.
11. Kuruyan DNA üzerine 6 ml etanol eklenerek yaklaşık 10-60 dk muamele edilen DNA örneklerine 2 ml ultra saf su eklenerek yine 10 dk ile 1 saat bekletilmiştir. Örnekler santrifüjde 5 dk spin edildikten sonra 1 gece kurumaya bırakılmıştır.
12. DNA örnekleri üzerine 1 ml steril TE çözeltisi eklenmiştir. Sonra örnekler 1.5 ml lik tüplere aktarılarak saflık analizleri ve diğer analizlerde kullanmak üzere buzdolabında muhafaza edilmiştir. RNA ihtimali olmasına karşın her bir tüpe 5µl Rnase ilave edilmiştir.

3.4. DNA Saflık Analizi

Her bir RIL hattı için izole edilen DNA' nın PCR çalışmalarına uygun (15-25 ng/µl) hale getirilmesi için DNA miktarları %1 lik Agarose jel (2,5 g agaroz, 250 ml TBE) elektroforezi ile belirlenmiştir ve jeldeki standart markır baz alınarak ne kadar seyreltilmesi gerektiği hesaplanmıştır. Seyreltme denemeleri sonucunda DNA miktarına göre 1:40 - 1:50 arası seyreltme oranları kullanılmıştır. DNA örnekleri AFLP, RAPD, SSR ve ISSR markır sistemleri için hazır kullanılabilir durumda +4 °C de buzdolabında muhafazaya alınmıştır.

3.5. PCR Analizlerinde Kullanılan Ebeveynler ve RIL Hatlarına Ait DNA Örnekleri

PCR düzeneğinde 96 kuyucuk bulunduğu için bir seferde ancak 96 örnek analiz etme imkanı vardır. Elimizde 93 RIL hattı ve 2 ebeveynle birlikte 103 örnek vardır. Kalan 7 örnek için (103-96=7) ayrı bir PCR kullanmak ekonomik olmadığı için ve analiz edilecek örnek sayısı QTL analizleri için yeterli görüldüğünden çalışmamızda 2 ebeveyn + 93 birey + 1 tane kontrol olmak üzere toplam 96 örnek kullanılmıştır. Örneklerin PCR ve agaroz jel yüklemelerinde sıralaması Tablo 3.1' de gösterilmiştir.

Tablo 3. 1. PCR analizleri ve jel yüklemede ebeveynler ve RIL hatlarına ait sıralama.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P2	RIL 639	RIL 640	RIL 641	RIL 642	RIL 643	RIL 644	RIL 645	RIL 646	RIL 647	RIL 648
B	RIL649	RIL 650	RIL 651	RIL 652	RIL 653	RIL 654	RIL 655	RIL 656	RIL 657	RIL 658	RIL 660	RIL 661
C	RIL 662	RIL 663	RIL 664	RIL 665	RIL 666	RIL 667	RIL 668	RIL 669	RIL 670	RIL 671	RIL 672	RIL 673
D	RIL 674	RIL 675	RIL 676	RIL 677	RIL 678	RIL 679	RIL 680	RIL 681	RIL 682	RIL 683	RIL 684	RIL 685
E	RIL 686	RIL 687	RIL 688	RIL 689	RIL 690	RIL 691	RIL 692	RIL 693	RIL 694	RIL 695	RIL 696	RIL 697
F	RIL 698	RIL 699	RIL 700	RIL 701	RIL 702	RIL 703	RIL 705	RIL 706	RIL 707	RIL 708	RIL 709	RIL 710
G	RIL 711	RIL 712	RIL 713	RIL 714	RIL 715	RIL 716	RIL 717	RIL 718	RIL 719	RIL 720	RIL 721	RIL 722
H	RIL 723	RIL 724	RIL 726	RIL 727	RIL 728	RIL 729	RIL 730	RIL 731	RIL 732	RIL 738	RIL 739	Kontrol

3.6. Markır Analizleri ve PCR Protokolleri

Genom haritası oluşturmada kullanılan primerlerden elde edilen markırların gösterdikleri polimorfizmler harf sistemi kullanarak (A,B,H ve -) skorlanmıştır. RIL hatlarında anne ebeveyne ait DNA bandları A olarak ve baba ebeveyne ait DNA bandları B olarak, ve skorlanamayan hatlara ait bandlar – (eksi) işaretiyle skorlanmıştır. Veriler Microsoft Excel programına aktarılarak gerekli düzenlemeler yapılıp Mapmaker programında bağlantı haritası analizleri için kullanılmıştır. Genom haritası oluşturmada kullanılan markır sistemlerine ait metodoloji ve PCR protokolleri aşağıda açıklanmıştır.

3.6.1. Morfolojik Markırlar

Populasyonu oluşturan ebeveynler morfolojik olarak tohum kabuğu rengi (seed coat), kotiledon (iç tane) rengi ve tohum kabuğunda beneklenme (spotting) karekterleri için polimorfizm göstermektedir. Anne ebeveyn (Precoz) yeşil tohum kabuğu, sarı kotiledon ve beneksiz tohum kabuğuna sahipken, baba ebeveyn (WA8649041) kahverengi tohum kabuğu, kırmızı kotiledon ve benekli tohum kabuğuna sahiptir. Her bir RIL hattı önce tohum kabuğu ve beneklilik için sonra her bir RIL hattına ait 1-2 tohum kabuğu keskin bir bıçakla hafifçe soyularak kotiledon rengi için skorlanmıştır. Böylelikle bu karekterler morfolojik markır olarak diğer DNA markörleriyle beraber genetik bağlantı haritası oluşturmada kullanılmıştır.

3.6.2. ISSR ve RAPD Markır Analizleri ve PCR Protokolü

ISSR ve RAPD markır tekniklerine ait protokoller mercimek için Kahraman ve ark., (2004b) tarafından kullanılan prosedüre göre yapılmıştır. RAPD için 10-merlik UBC, Operon ve CS (özel geliştirilmiş) primerler ve ISSR için 17-merlik UBC primerleri (University of British Columbia) kullanılmıştır.

RAPD reaksiyonları için 25-30 ng DNA 1 U Taq polimerase enzimi, 100 mM dNTP karışımı, 0.24 µM RAPD primer ve 1 X PCR tampon (50 mM KCL,10 mM Tris-HCL pH 8.3, 2.5 mM MgCl2, and 0.1% (v/v) Triton) kullanılmıştır. Bir örnek için reaksiyon toplam hacmi 25 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Amplifikasyon için Thermal Cycler (PCR) cihazı (Biorad Mycycler, US) şu şekilde programlanmıştır.

1. 94 °C 20 sn (denaturasyon)
2. 36 °C 1 dk (primer bağlanma aşaması)
3. 72 °C de 1 dk (Primerlerin taq polimeraz enzimi ile uzama aşaması)
4. 2,3 ve 4 adımlar 40 kez tekrarlanmıştır
5. 72 °C de 8 dk (ek uzama aşaması)
6. 4 °C ∞ (PCR ürünlerinin kısa süreli muhafazası için)

Amplifikasyon ürünleri % 2' lik standart agaroz jelde 200 voltta 3-3.5 saat yürütülerek bandların moleküler ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanmıştır. Örneklerin jelde yürüme işlemi tamamlandıktan sonra

etidium bromit (EtBr) çözeltisinde (5 µl/100ml) boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra fazla boyanın uzaklaştırılması için jeller saf su ile 5-10 dk yıkanmıştır. Boyanan jeller Kodak MI Gel Logic 200 ultraviyole jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarılmış veya Sony dijital grafik yazıcı (up-d895) dan çıktıları alınmıştır.

ISSR analizleri için PCR reaksiyon karışımı RAPD analizlerinde kullanılan miktarlarla aynı olup sadece dNTP miktarı iki katına çıkartılmıştır (100mM yerine 200 mM kullanılmıştır). PCR programı ise:

1. 96 °C 2 dk (başlangıç denaturasyon)
2. 94 °C 1 dk (denaturasyon)
3. 50 °C 1 dk (primer bağlanma aşaması)
4. 72 °C de 2 dk (Primerlerin taq polimeraz enzimi ile uzama aşaması)
5. 2,3 ve 4 adımlar 35 kez tekrarlanmıştır)
6. 72 °C de 8 dk (ek uzama)
7. 4 °C ∞ (PCR ürünlerinin kısa süreli muhafazası için)

ISSR amplifikasyon ürünleri % 4.5' luk poliakrilamide (% 40' lık Acrilamid/bisakrilamid 19:1 karışım) dikey jel elektroforez (PAGE) kullanarak ayrımlanmıştır. Her örnek için 7.5 µl formamide blue boyası ilave edildikten sonra, örnekler önce 3 dk 94 °C' de denature edilmiştir. Denature yapılan örnekler buz üzerine konularak her örnekten yaklaşık 5µl kuyucuklara yüklenerek 1800- 2000 voltta yaklaşık olarak 2.5 saat sürede ayrışması sağlanmıştır.

Jellerin boyanması gümüş boyama (silver stain) ile yapılarak jel görüntüleri tarayıcı veya GEL LOGİC jel görüntüleme sistemi ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır. PAGE jel hazırlama ve gümüş boyama protokolleri Tinnemore (1999) tarafından belirtilen prosedüre göre yapılmıştır.

3.6.3. Microsatellit Markır Analizleri ve PCR Protokolü

Mercimek için çeşitli araştırıcılar tarafından 175 mikrosatellit (SSR) primeri geliştirilmiştir (Duran ve ark., 2004; Hamwieh ve ark., 2005; Rajesh ve ark., 2008). Bu primerlerden 124 SSR primeri Rajesh ve ark. (2008), 46 SSR primeri Hamwieh ve ark. 2005 ve 5 SSR primeri de Duran ve ark. (2004), tarafından geliştirilmiştir. 175 SSR primerinden 35 adedi halihazırda farklı mercimek genetik haritalama çalışmalarında kullanılmıştır (Duran ve ark., 2004; Hamwieh ve ark., 2005). Bu çalışmada ilk önce 35 SSR primeri ve daha sonra da diğer SSR primerleri kullanarak ebeveynler arasındaki genetik farklılıkları belirlenmiş ve ebeveynler arasında polimorfik bulunan markırlar ile RIL hatları skorlanarak genetik haritalamada kullanılmıştır.

SSR markır analizlerinde PCR reaksiyon karışımı i için 20 µl' lik bir karışım hazırlanmış ve bu karışım 15 ng DNA, 10 pmol ileri ve geri primerler, 1X PCR tampon ve 1 U Tag DNA polimeraz enziminden oluşmuştur. SSR primerleri için PCR' da kullanılan kimyasallar ve PCR protokolleri Tablo 3.2 ve 3.3' te verilmiştir.

Tablo 3. 2. PCR karışım hazırlama (Bir örnek için hazırlanan reaksiyon içeriği)

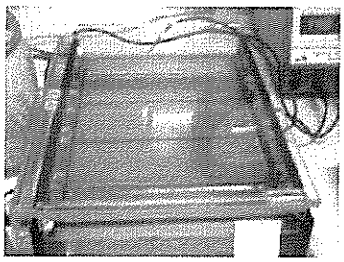
Kullanılan kimyasallar	Çalışma çözeltilerinin konsantrasyonları	Reaksiyon Konsantrasyonu	Reaksiyon hacmi
DNA	5 ng/µl	1,25ng/ µl	5 µl
Primer (ilerive geri)	10 pmol	10 pmol	1 µl +1 µl
dNTP (Adenin/100mM, Guanin/100mM, Sitozin/100mM, Timin/100mM, 4X25 µl	2 mM	0,2 µM	2 µl
10X PCR tamponu + 25mM $MgCl_2$	10x	1x	2 + 2 µl
Taq DNA polimeraz enzim	5 u/ µl	0,05 u/µl	0.2 µl
Ultra saf su			6.8 µl
Toplam			20 µl

Tablo 3. 3.. Denemede kullanılan SSR primerlerine ait PCR protokolleri

	Sıcaklık	Hamwieh ve ark. (2005)*	Rajesh ve ark. (2008)**	Duran ve ark. (2004)***	
1	94 °C başlangıç denaturasyonu (çift sarmal DNA' nın birbirinden ayrılması) 1 tekrar	3 dk	5 dk	1 dk	
2	94 °C (denaturasyon aşaması)	30 s	20 s	15 s	2, 3 ve 4. adımlar 35 kez tekrarlanmıştır
3	(49-57 °C) (primer bağlanma aşaması)	35 s	1 dk	15 s	
4	72 °C (Primerlerin Taq polimeraz enzimi ile uzama Aşaması)	60 s	2 dk	1 dk	
5	72 °C (ek uzama)	5 dk	8 dk	5 dk	
6	4 °C (PCR ürünlerinin muhafaza edildiği sıcaklık)	∞	∞	∞	

* ICARDA dan temin edilen SSR primerleri (Hamwieh ve ark., 2005)
** WSU dan temin edilen SSR primerleri (Rajesh ve ark., 2008)
*** Duran ve ark. (2004)

Mikrosatellit primerleri için yüksek çözünürlük sağlayan Metafor agaroz kullanılmıştır. Bu tip agarozun hazırlanışı ve kullanımı standart agaroza göre oldukça farklılık göstermektedir. Metaphor agaroz, iki örnek arasında 4 baz çiftine kadar ki farklılıkların tespitine olanak sağlamakta olup, poliakrilamid jelde elde tespit edilen farklılıklara yakın hassas sonuçlar sağlamaktadır. Metafor agaroza önce soğuk 1X TBE eklenerek karıştırıcıda 15 dk çok iyi bir şekilde çözülmesi sağlandıktan sonra mikrodalga ısıtıcıda 15 dk kadar kaynatılıp, buharlaşma nedeniyle eksilmeleri önlemek için tekrar TBE eklenmiştir. Kaynatılan jelin soğuması sağlandıktan sonra elektroforez kasasına (Şekil 3.1) dökülerek jel oluşum için 1 saat kadar bekletilmiştir.



Şekil 3. 1. Elekroforez tankı ve DNA örneklerinin yürütülmesi

3.6.4. AFLP Metodu ve PCR Protokolü

AFLP analizleri Li-Cor 4300S DNA Analiz cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu cihazla yapılan AFLP analizlerinde ilgili firma tarafından geliştirilen hazır AFLP kiti ve bu kit için belirtilen AFLP protokolü uygulanmıştır. Bu protokole göre AFLP metodu aşağıda kısaca özetlenmiştir.

DNA örneklerinin seyreltilmesi

Reaksiyon ortamına konulacak DNA örnek miktarının 9 µl içerisinde maksimum 100 ng veya 100 ng dan daha az miktarda olması gerektiği için ebeveyn ve RIL hatlarına ait DNA örnekleri istenilen miktarda seyreltilmiştir.

Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi edilmesi

Her bir bitkiye ait DNA örnekleri Ecor1/Mse1 enzimleri kullanarak kesme işlemine tabi tutulmuştur. Aşağıda belirtilen miktarlarda hazırlanan karışımda DNA' ların kesilme işlemi 37 °C' de 2 saat ve kesme işlemini sonlandırmak için 70 °C' de 15 dk reaksiyona tabi tutulmuştur

Reaksiyon karışımı	Hacim
5X Reaksiyon Tamponu	2.5 µl
DNA	9 µl
EcoR1/Mse1 Enzim Karışımı	1 µl
Toplam hacim	12,5 µl

Adaptörlerin ligasyonu

DNA' lar kesildikten sonra Ecor1 ve Mse1 adaptörleri eklenerek 20 °C de 2 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda bu örneklerden 10 µl alınarak üzerlerine 90 µl TE tamponu ilave edilerek 1:10 oranında seyreltilmişlerdir.

Digest edilmiş genomik DNA	12.5 µl
Adaptör karışımı	12.0 µl
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
Toplam hacim	25.0 µl

Ön çoğaltım (pre-amplifikasyon)

DNA' nın ön çoğaltımı için gerekli karışım aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmış ve thermal cycler cihazında reaksiyona tabi tutulmuştur.

Ön çoğaltma	Hacim
AFLP 1:10 preamplifikasyon karışımı	20.0 µl
1:10 ligated DNA	2.5 µl
PCR reaksiyon tamponu	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 unit/ µl)	0.5 µl
Toplam hacim	25.5 µl

PCR cihazında preamplifikasyon için belirlenen protokol aşağıda belirtilen şekilde programlanmıştır.

94 ^{0}C 30 s (denaturasyon)

56 ^{0}C 1 dk (primer bağlanma aşaması)

72 ^{0}C 1 dk (uzama aşaması)

4 ^{0}C ∞ (muhafaza sıcaklığı)

Toplam 20 döngü

Ön çoğaltım ürünlerinin seyreltilmesi

Ön çoğaltım sonrası mevcut karışım 1:40 oranında seyreltilerek seçici çoğaltım (selektif amplification) aşaması için kullanıma hazır hale getirilmiş ve reaksiyon tüplerinde kalan ön çoğaltım ürünleri -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Seçici AFLP çoğaltımı (Selective AFLP amplification)

Seçici çoğaltım aşamasında 1:40 oranında seyreltilmiş ön çoğaltılmış DNA ile Ecor1 ve Mse1 +3 seçici primer kombinasyonları ile ebeveynler arasında polimorfizm testleri yapılmıştır. Primerlerden EcoR1 primerleri IRDye 700 ve IRDye 800 floresan boyaları ile işaretlenmiştir. Floresan işaretleme ile DNA' ların poliakrilamide jelde yürütülmesinden sonra- etidium bromide veya gümüş boyama ile görüntüleme işlemlerine gerek kalmadan infrared işaretli boyama (IRDye 700 ve IRDye 800) ile otomatik görüntüleme sağlanmaktadır. Seçici PCR çoğaltım protokolü aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir:

Taq DNA polimeraz	6.0 µl
Seyreltilmiş pre amp DNA	2.0 µl
Mse1 enzimi	2.0 µl
IRDye 700	0.5 µl
IRDye 800	0.5 µl
Toplam hacim	11.0 µl

AFLP Ecor1/Mse1 primer kombinasyonları

AFLP metodunda en yaygın kullanılan primer kombinasyonları ya Ecor1/Mse1 yada Mse1/Pst1' dır. Licor AFLP kiti Ecor1/Mse1 için hazırlandığından ve genelde en yaygın kullanılan kombinasyon olduğundan çalışmada bu kombinasyon kullanılmıştır. Aşağıda belirtilen 8 farklı Ecor1 ve Mse1 kombinasyonu ile toplam 64 primer kombinasyonu ebeveynler arasında polimorfizm testlerinde kullanılmıştır.

AFLP Ecor1/Mse1 primer kombinasyonları

Ecor1 +3 primerleri	Mse1 +3 primerleri
E-AAC	M-CAA
E-AAG	M-CAC
E-ACA	M-CAG
E-ACC	M-CAT
E-ACG	M-CTA
E-ACT	M-CTC
E-AGC	M-CTG
E-AGG	M-CTT

Seçici çoğaltma aşamasında PCR için thermal cycler cihazı aşağıdaki gibi programlanarak çoğaltım yapılmıştır.

1. 94 ^{0}C 2 dk
2. 94 ^{0}C 30 sn
3. 65 ^{0}C 30 sn (2,3 ve 4 nolu aşama 13 döngü ve her döngüde sıcaklık 0.7 ^{0}C azalmıştır.)
4. 72 ^{0}C 1 dk
5. 94 ^{0}C 30 sn
6. 56 ^{0}C 30 sn (5,6 ve 7 nolu aşama 23 döngü)
7. 72 ^{0}C 1 dk
8. 94 ^{0}C 30 sn

Seçici PCR çoğaltımı tamamlandıktan sonra, örneklere 5 µl blue stop çözeltisi ilave edilerek 94 ^{0}C' de 3 dk denatürasyona tabii tutulmuştur. Denaturasyon sonrasında DNA örnekleri jele yüklenene kadar buz içerisinde tutularak, DNA' nın denatüre halden çift sarmal hale geçmesi önlenmiştir.

Yukarıdaki bütün basamaklar tamamlandıktan sonra örnekler %8' lik denatüre poliakrilamid jel elektroforezine hazır hale gelmiştir. Floresan boya ile işaretli örneklerin ışıktan zarar görmemeleri için yüklenene kadar karanlıkta ve buzda bekletilmişlerdir. Jel elektroforezi sonrasında elde edilen bantlar Licor cihazından bilgisayara tiff formatında aktarılmış ve skorlama yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan 64 adet AFLP primer kombinasyonu ile ebeveynler arasında yapılan polimorfizm testleri sonucunda 20 primer kombinasyonu polimorfik bulunmuştur (Tablo 3.4). Polimorfik band sayısı 3 ile 16 arasında değişim göstermiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan AFLP primer kombinasyonları ve elde edilen polimorfik bant sayıları.

Primerler	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	-	5	-	10	-	-	9	-
E-AAG	-	-	-	-	10	-	16	-
E-ACA	-	13	-	12	-	-	12	-
E-ACC	-	-	14	-	-	-		3
E-ACG	-	-	-	-	-	-	13	-
E-ACT	-	12	-	3	7	-	10	-
E-AGC	-	9	-	7	-	-	11	-
E-AGG	-	-	11	-	-	-		5

3.7. DNA Markörlerinin Skorlanması ve Genetik Haritanın Oluşturulması

Kullanılan primerlerin gösterdikleri polimorfizmler A ve B olarak skorlanmıştır. RIL hatları 6 generasyon kendileme ile homozigot olduğu varsayıldığından ve buna rağmen heterezigot hatlar varsa H yerine eksik data (-) olarak işaretlenmiştir. Herhangi bir hattın DNA' sına ait jelde bant oluşmamışsa yine eksik data (-) olarak skorlanmıştır.

Mercimek genetik bağlantı haritasının oluşturulmasında MAPMAKER V.3 (Lander ve ark,1987) yazılımı kullanılmıştır. Herhangi iki markır arasındaki genetik bağlılığı (linkage) belirlemede LOD = 3 (lower limit of detection, düşük tespit sınırı) skoru (yani herhangi iki markörün bir kromozom üzerinde birlikte bağlantı oluşturması ancak binde 1 olasılıkla yanlış olabilir) alınarak birbirleriyle bağlantılı olan markırların oluşturdukları gruplar ya da kromozomlar belirlenmiştir. Bağlantı haritasında markırların genom boyunca kapladıkları alan ve birbirine olan uzaklıkları sentimorgan (cM) olarak belirlenmiştir.

3.8. Kışa Dayanıklılık Genlerinin Haritalanması (Kantitatif Trait Lokus = QTL haritalama)

QTL haritalama için tek markır analizi (Single Marker Analyse) ve interval markır analizleri yapılmıştır. QTL analizi için QGENE V.3.07 (Nelson, 1997) ve MapManager QT 2.8 (Manly, 1998) programları kullanılmıştır. Qgene programı single markır, interval mapping ve çoklu regresyon analizleri için ve Mapmanager programı da data kalitesini değerlendirme ve Qgene ile elde edilen analiz sonuçlarını doğrulama amacıyla kullanılmıştır. Kışa dayanıklılık ile ilgili aday QTL' leri belirlemede treshold değeri olarak LOD= 2 skoru kullanılmıştır. QTL pozisyonları QTL bölgesindeki LOD skorlarının pik noktası alınarak belirlenmiştir. QTL bölgesinde 30 cM mesafede birden fazla pik oluştuğunda, tek bir QTL olarak değerlendirilmiş, 30 cM' yi geçen mesafelerde bulunan pikler ayrı QTL olarak değerlendirilmiştir (Kearsey and Pooni, 1996). Belirlenen QTL' lerin % fenotipik varyasyonu (kışa dayanıklılık) açıklama oranları QTL pik noktalarındaki markır değerlerinin çoklu regresyon (R^2) analizleri ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Canlılık Oranları (Survival) ve Kışa Dayanıklılık Değerlendirmeleri

Üç yıl sürdürülen tarla denemelerinde RIL hatlarına ait canlılık oranları (survival) Tablo 4,1'de verilmiştir. 1997-98 sezonu Pulman lokasyonu, 1998-99 sezonu Haymana ve Sivas lokasyonlarında ılıman kış şartları ve dolayısıyla kış ölümlerinin olmaması, diğer yandan 1999-00 sezonu Sivas lokasyonunda sert kış şarları nedeniyle tüm bitkilerin ölmesinden dolayı RIL hatlarının kışa dayanıklılıklarının değerlendirilmesinde yeterli sonuçlar elde edilemediğinden veriler değerlendirilmemiştir. Yeterli kış şartlarının oluştuğu ve dayanıklı ile dayanıksız hatları belirlemenin etkin olduğu 1997-98 sezonu Haymana lokasyonu, 1998-99 sezonu Pullman lokasyonu ve 1999-00 sezonu Haymana lokasyonundan elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Tablo 4.1. Haymana 1997-98, Pullman 1998-99 ve Haymana 1999-00 lokasyonların ve 3 lokasyon ortalaması olarak mercimekte ebeveynler ve RIL hatlarına ait ortalama % canlılık (kışa dayanıklılık) değerleri.

Ebeveyn ve RIL	Haymana 1997-98		Pullman 1998-99		Haymana 1999-00		Birleştirilmiş 3 Yıllık	
	Ortalama	Range	Ortalama	Range	Ortalama	Range	Ortalama	Range
PRECOZ	26,35	18,75-35,29	0,00	0-0	30,92	23,08-36,36	19,09	18,75-36,36
WA9041	95,83	87,5-100	85,61	74,47-100	100,00	100-100	93,81	74,47-100
RIL	72,68	10,89-100	27,66	0,0-95,09	92,15	9,93-100	64,16	13,36-98,24

Pullman lokasyonu için aylık ortalama hava ve toprak sıcaklıkları (Ekim 1997- Mayıs 1998 arası) sırasıyla -1.7 ile 10.9°C ve –0.9 ile 13.1°C arasında değişim göstermiş olup, 0°C altında sıcaklıklar gözlemlenmiştir. Pullman lokasyonunda en düşük ortalama günlük hava ve toprak sıcaklıkları sırasıyla -19.5°C ve -11.8°C olarak 1998-99 sezonu Aralık ayında ölçülmüştür. 1997-98 sezonu Haymana lokasyonunda aylık ortalama hava sıcaklıkları (Ekim 1998- Kasım 1999 arası) -0.5 ile 14.6°C arasında ve en düşük sıcaklık -12.5 °C olarak kaydedilmiştir.

Pullman lokasyonunda bitkiler kar örtüsü olmadan düşük sıcaklıklara maruz kalırken, Haymana lokasyonunda bitkiler yaklaşık 20 cm kar örtüsü altında düşük sıcaklara maruz kalmıştır.

Kışa dayanıklı ebeveyn WA8649041'e ait ortalama canlılık oranı 1997-98 sezonu Haymana lokasyonunda % 95.83, 1998-99 sezonu Pullman lokasyonunda %85.61 ve 1999-00 sezonu Haymana lokasyonunda % 100 olarak belirlenmiştir. Bun karşın, kışa dayanıksız ebeveyn Precoz çeşidine ait canlılık oranı 1997-98 sezonu Haymana lokasyonunda % 26.35, 1998-99 sezonu Pullman lokasyonunda % 0.0 ve 1999-00 sezonu Haymana lokasyonunda % 30.92 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Ebeveynlerin canlılık

oranı farklı kış şartları nedeniyle lokasyonlar arasında farklılık göstermiştir. Kışa dayanıklı ebeveynin canlılık oranının Pullman lokasyonunda oluşan sert kış şartlarına rağmen oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

RIL hatlarına ait ortalama canlılık oranı sert kış şartlarının oluştuğu Pullman lokasyonunda çok düşük (% 27.66) olurken, orta derecede kış şartlarının hüküm sürdüğü 1997-98 sezonu Haymana lokasyonunda yüksek (% 72.68) ve kışı ılıman geçen 1998-99 sezonu Haymana lokasyonunda daha yüksek (% 92.15) olmuştur (Tablo 4.1).

RIL hatlarına ait canlılık oranlarına ait frekans dağılımları (histogram) incelendiğinde her üç lokasyonda da canlılık oranları değerleri sürekli frekans dağılımı göstermiştir (Şekil 4.1). Orta derece kış şartlarına sahip Haymana lokasyonunda her iki deneme yılına (1997-98 ve 1999-00) ait canlılık oranları frekans dağılımı kışa dayanıklı ebeveyn tarafına doğru eğilim gösterirken, sert kış şartlarının yaşandığı Pullman lokasyonunda canlılık oranları frekans dağılımı kışa dayanıksız ebeveyn tarafına doğru eğilim göstermiştir. Frekans dağılımlarının süreklilik arz etmesi ve bimodal dağılım göstermeyişi, kışa dayanıklılığının muhtemelen birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini göstermektedir.

Üç lokasyona ait RIL popülasyonu ortalama canlılık oranları frekans dağılım grafiği kışa dayanıklı ebeveyn tarafına doğru sapma gösterip, normal dağılım gözlemlenmemiştir. Verileri normal dağılışa döndürmek için yapılan transformasyonlar (karekök, arcsin, ln) yeterli olmadığından varyans analizlerinde normal veriler kullanılmıştır.

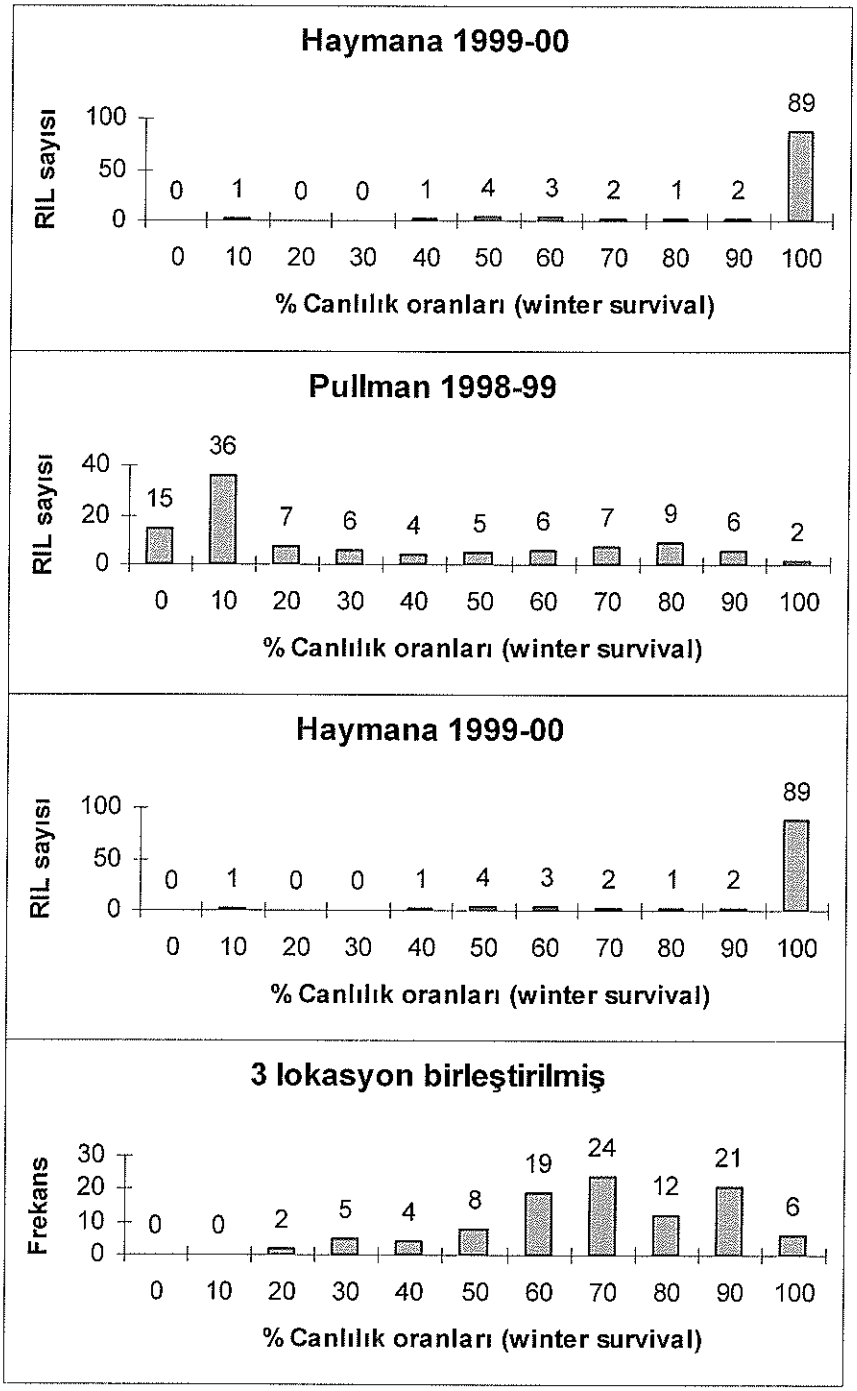
Canlılık oranı bakımından lokasyonlar arası önemli farklılıkların gözlemlenmesi yıl ve lokasyona bağlı olarak çok farklı kış şartlarının oluşumunu göstermektedir. Kış şartlarının Haymana lokasyonunda yumuşak olması nedeniyle kışa dayanıklı ve dayanıksız hatların belirlenmesini zorlaştırırken, sert kış şartlarının oluştuğu Pullman lokasyonunda dayanıklı ve dayanıksız hatları belirlemek daha kolay olmuştur.

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde, varyans komponentlerinin her bir lokasyon ve lokasyonlar ortalaması olarak çok önemli derecede ($P<0.01$) farklılık gösterdiği görülmektedir. (Tablo 4.2) Lokasyon etkisine ait kareler ortalaması (K.O) değeri en yüksek olup bunu sırasıyla RIL hatlarına ait K.O ile genotip x çevre interaksiyonuna ait K.O değerleri izlemiştir.

Tablo 4.2. Mercimekte kışa dayanıklılık verilerine ait 3 yıllık ve birleştirilmiş varyans analiz sonuçları.

Faktör	SD	K.O	F	P
		Haymana 1997-98		
Tekerrür	2	503,57	1,55	0,2157
RIL	97	2151,80	6,61**	<.0001
Hata	194	325,66		
		Pulman 1998-99		
Tekerrür	2	146,68	1,47	0,2321
RIL	100	2958,003	29,67**	<.0001
Hata	200	99,7059		
		Haymana 1999-00		
Tekerrür	2	34,78	0,66	0,5162
RIL	100	770,49	14,70**	<.0001
Hata	200	52,42		
		Birleştirilmiş		
Tekerrür	2	350,61	2,22	0,1091
RIL	100	3243,30	20,57**	<.0001
Lokasyon	2	340387,80	2159,11**	<.0001
Lok*RIL	197	1302,74	8,26**	<.0001
Hata	598	157,65		

*,** sırası ile %5 (P<0.05) ve %1 (P<0.01) seviyelerinde önemlidir.



Şekil 4.1. Lokasyonlara göre RIL popülasyonuna ait % canlılık oranları (winter survival)

4.2. Markır Analizleri ve Genetik Bağlantı Haritası (Linkage map)

Genetik bağlantı haritalaması için RAPD, AFLP, SSR, ISSR ve morfolojik markır çeşitleri kullanılmıştır (Tablo 4.3).

RAPD markır tekniğinde 55 RAPD primeri (30 operon firması tarafından geliştirilmiş, 20 UBC firması tarafından geliştirilmiş ve 5 özel geliştirilmiş CS primer) kullanılmıştır. 55 RAPD primerinin 41 tanesi

ebeveynler arasında polimorfik olup bu 41 polimorfik primerden 80 band/markır elde edilmiştir. 80 RAPD marköründen 59'u genetik haritada yer almış olup, 21 tanesi hiçbir bağlantı grubunda yer almamıştır.

AFLP markır tekniği ile 64 AFLP primer kombinasyonu uygulanmış, bunlardan 20 primer kombinasyonu ebeveynler arasında polimorfik bulunmuş ve bu 20 polimorfik primer den 192 band/markır elde edilmiştir. 192 AFLP markörünün 102 tanesi ile RIL hatları net olarak skorlanmış ve 57 AFLP markırı genetik haritada yer alırken, 45 tanesi hiçbir bağlantı grubunda yer almamıştır.

ISSR markır tekniğinde, 10 ISSR primeri kullanılmış olup, 3 ISSR ebeveynler arasında polimorfik bulunmuş ve bu 3 ISSR primerinden 28 polimorfik band elde edilmiştir. 28 polimorfik bandın 16 tanesi genetik haritada yer alırken, 12 tanesi hiçbir bağlantı grubunda yer almamıştır.

SSR markır tekniğinde 175 SSR primeri kullanılmış olup, 23 SSR primeri ebeveynler arasında polimorfik bulunmuş ve her primer başına 1 polimorfik band elde edilmiştir. 28 polimorfik SSR marköründen 13 SSR markır genetik haritada yer alırken, 10 SSR markırı hiçbir bağlantı grubunda yer almamıştır.

Morfolojik markörlerden 3 tanesi ebeveynler arasında polimorfik bulunmuş, 2 morfolojik markır genetik harita yer alırken, 1 tanesi hiçbir grupta yer almamıştır.

Tablo 4.3. Mercimekte genetik bağlantı haritası geliştirmede kullanılan primerler ve elde edilen sonuçlar

	Test edilen Primer	Polimorfik primer (adet)	Polimorfik markır sayısı	Monomorfik primer (adet)	Bağlantı gösteren (adet)	Bağlantı göstermeyen (adet)
RAPD	55	41	80	14	59	22
ISSR	10	3	28	7	18	10
SSR	175	23	23	109	13	10
AFLP	64	20	102	44	57	45
Morfolojik	3	3	3	-	2	1
Toplam	307	90	236	174	149	88

Genetik bağlantı haritası 149 markır (59 RAPD, 57 AFLP ve 18 ISSR, 13 SSR, ve 2 morfolojik markır) ve 11 bağlantı grubundan (linkage grup) oluşmuştur. Genetik haritaya ait özellikler Tablo 4.4' te ve mercimek genetik bağlantı haritası Şekil 4.2' de verilmiştir. Genetik harita toplam uzunluğu 1340.0 cM olup, iki markır arası ortalama uzaklık 8.99 cM ve ortalama kromozom uzunluğu (linkage grubu= bağlantı grubu) 121.8 cM'dır. Haritada yer alan bağlantı gruplarında markır sayıları 5 ile 39 arasında değişmiştir. AFLP markörleri genellikle kluster oluşturup belli linkaj gruplarında kümelenirken, RAPD, ISSR ve SSR markörleri

linkaj gruplarında genel bir dağılım göstermişlerdir. Genetik haritada yer alan bağlantı gruplarına ait detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

Bağlantı Grubu 1 (LG1 = Linkage Grup) 422.5 cM uzunluğunda olup bu bağlantı gurubu üzerinde 39 markır (36 AFLP, 2 RAPD ve 1 morfolojik markır) haritalanmış ve genomun % 31.52'sini oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 10.83 cM olarak hesaplanmıştır. Grupta yer alan markırlar: MCTGEACG-10, MCTGEACG-11, MCTGEAAC-7, MCTGEACG-12, MCTGEAAC-8, MCATEAAG-8, MCATEAGC-2, MCTGEACT-3, MCTGEAGC-11, MCAGEAGG-5, MCTAEAAG-7, MCTAEACT-2, spotting, MCATEAAG-7, MCATEAAG-9, MCTGEAAG-2, MCACEAGC-5, MCACEAAC-4, MCTTEAGG-2, MCTGEAGC-8, D01b, MCATEAAG-6, MCACEACA-10, MCACEACT-1, MCTGEACA-10, MCATEAGC-4, MCTGEAGC-9, MCATEAAG-5, D01a, MCTGEAAG-7, MCTGEAAG-4, MCTGEAAG-5, MCTGEAAG-3, MCTGEAAG-6, MCTGEAAG-13, MCTGEAAG-14, MCTGEAAG-10, MCTGEAAG-8 ve MCTGEAAG-1

LG 2 grubu 138.1 cM uzunluğunda olup 24 markır (2 SSR, 1 ISSR ve 21 RAPD) haritalanmış ve genomun % 10.30'unu oluşturmuştur. İki markır arası ortalama mesafe 5.75 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: SSR66, UBC840-1, I08c, CS31-3, AB14a, AB14b, SSR33, D20b, D06, D07, Q02a, U771-2, D20e, AB08, CS31-1, U715-1, AB12b, O17b, b19, N19a, UBC318-1, CS54-3, U502-2, UBC79-1, UBC721, UBC79-2, UBC98 ve UBC431.

LG 3 grubu 118.9 cM uzunluğunda olup 12 markır (12 AFLP) haritalanmış ve genomun % 8.87'sini oluşturmuştur. Bu grupta sadece AFLP markörleri yer almakta olup iki markır arasındaki ortalama mesafe 9.90 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: MCACEACA-9, MCTGEACA-9, MCTGEAGC-3, MCTTEAGG-1, MCTAEAAG-9, MCAGEACC-2, MCTGEACA-11, MCTGEAGC-5, MCTAEAAG-2, MCTGEACT-9, MCATEAGC-1 ve MCATEAGC-3.

LG 4 grubu 85.2 cM uzunluğunda olup 15 markır (3 SSR, 4 ISSR ve 8 RAPD) haritalanmış ve genomun % 6.43'ünü oluşturmuştur. Bu gruptaki iki markır arasındaki ortalama mesafe 5.74 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: U715-2, SSR567, AB18a, UBC807-11, P10, O02, UBC840-3, UBC807-3, UBC807-12, A19, U771-1, SSR317-2, SSR336, B01a ve M18a.

LG 5 grubu 45.7 cM uzunluğunda olup 7 markır (1 SSR,1 ISSR ve 5 RAPD) haritalanmış ve genomun % 3.41'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 6.52 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: UBC807-2, C06, C07, U715-4, B02, SSR565 ve B14.

LG 6 grubu 104.5 cM uzunluğunda olup 11 markır (1 SSR, 1 ISSR ve 9 RAPD) haritalanmış ve genomun % 7.79'unu oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 9.5 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: UBC220, UBC318-2, SSR212-1, M09a, M09, B08a, B01, AD11a, UBC440, UBC807-4 ve AD11b.

Tablo 4.4. Mercimek (*Lens culinaris* M.) genetik bağlantı haritasına ait özellikler

Bağlantı Grup	Uzunluk (cM)	Genomda oranı (%)	Markır Sayısı	İki Markır Arası Ortalama Uzaklık (cM)	Markır tipi
LG 1	422.5	31.52	39	10.83	36 AFLP 1 morfolojik 2 RAPD
LG 2	138.1	10.30	24	5.75	2 SSR 1 ISSR 21 RAPD
LG 3	118.9	8.87	12	9.90	12 AFLP
LG 4	86.2	6.43	15	5.74	3 SSR 4 ISSR 8 RAPD
LG 5	45.7	3.41	7	6.52	1 SSR 1 ISSR 5 RAPD
LG 6	104.5	7.79	11	9.5	1 SSR 1 ISSR 9 RAPD
LG 7	90.1	6.72	10	9.01	6 ISSR 4 RAPD
LG 8	34.3	2.55	7	4.9	1 SSR 6 RAPD
LG 9	165.4	1.23	9	18.37	9 AFLP
LG 10	49.6	3.70	7	7.08	1 SSR 3 ISSR 3 RAPD
LG 11	88.7	6.61	8	11.08	4 SSR 3 RAPD 1 morfolojik
Toplam	1340 cM		149	8.99	

LG 7 grubu bu grup 90.1 cM uzunluğunda olup 10 markır (6 ISSR ve 4 RAPD) haritalanmış ve genomun % 6.72'sini oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 9.01 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: AB14c, AD01a, UBC807-6, B10b, UBC807-8, B19a, UBC807-5, UBC808-2, UBC807-13 ve UBC807-9.

LG 8 grubu 34.3 cM uzunluğunda olup 7 markır (1 SSR ve 6 RAPD) haritalanmış ve genomun % 2.55'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 4.9 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: UBC90, CS54-1, SSR138, N19, CS31-2, U763-1 ve CS54-2.

LG 9 grubu 165.4 cM uzunluğunda olup 9 markır (9 AFLP) haritalanmış ve genomun % 12.34'ünü oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 18.37 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: MCTTEACC-1, MCAGEAGG-6, MCAGEAGG-7, MCAGEAGG-4, MCAGEAGG-10, MCTGEAAC-6, MCACEAAC-2, MCTAEAAG-8 ve MCTAEAAG-4.

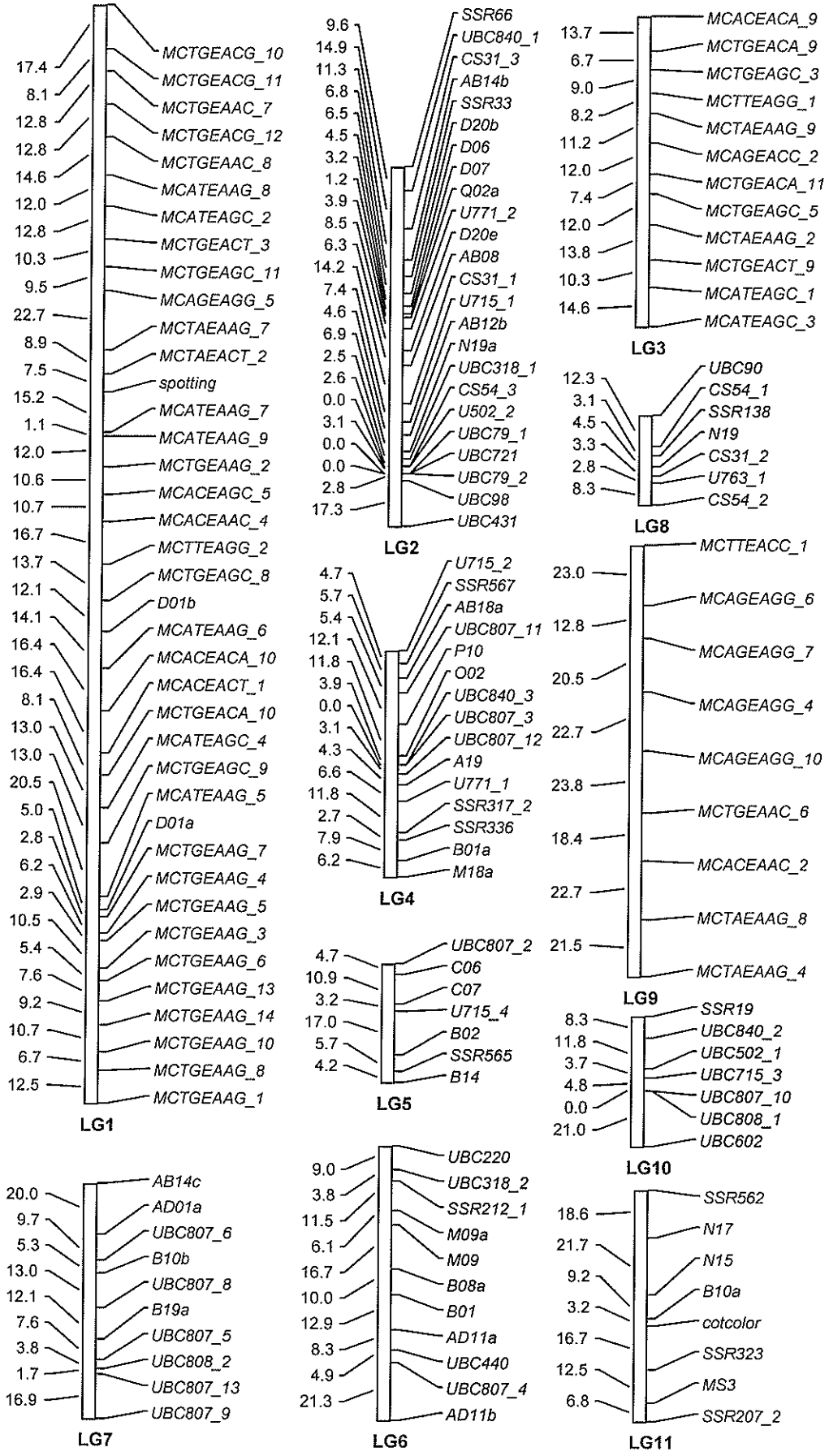
LG 10 grubu 49.6 cM uzunluğunda olup 7 markır (2 ISSR ve 5 RAPD) haritalanmış ve genomun % 3.70'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 7.08 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: SSR19, UBC840-2, UBC502-1, UBC715-3, UBC807-10, UBC808-1 ve UBC602.

LG 11 grubu bu grup 88.7 cM uzunluğunda olup 8 markır (4 SSR, 3 RAPD ve 1 morfolojik markır) haritalanmış ve genomun % 6.61'ini oluşturmuştur. Bu grupta iki markır arasındaki ortalama mesafe 11.08 cM' dır. Bu grupta yer alan markırlar: SSR562, N17, N15, B10a, cotcolor, Q10a, SSR323, MS3 ve SSR207_2.

Bu çalışmada geliştirilen mercimek genetik bağlantı haritası değişik araştırıcılar (Eujayl ve ark., 1997, 1998; Ford ve Taylor, 2003; Duran et al. 2004; Hamwieh ve ark., 2005, Kahraman ve ark 2004b; Tullu ve ark., 2008) tarafından geliştirilen mercimek genetik haritaları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.5). Çeşitli araştırıcılar tarafından değişik populasyonlarda geliştirilen bu genetik haritalar kodominant markırların fazla olmayışı ve kullanılan markırların farklı oluşu nedeniyle haritaların karşılaştırmalı analizleri mümkün gözükmemektedir. Tabloda görüleceği üzere ortak markörlerden bazıları aynı bağlantı grubu üzerinde yer alırken, diğer markırlar farklı bağlantı gruplarında yer almışlardır. Diğer yandan mercimek kromozomları üzerinde her hangi bir kodominant markır tam olarak anchor edilemediğinden, hangi kromozomda hangi markörün olacağı tam olarak bilinememektedir.

Tablo 4.5. Mercimek için geliştirilen değişik genetik bağlantı haritalarında kullanılan ortak markırların bağlantı gruplarının karşılaştırılması.

	Linkage grupları						
Ortak markırlar	Bu çalışma	Kahraman ve ark., 2004b	Hamwieh ve ark., 2005	Tullu ve ark., 2008	Eujayl ve ark., 1998	Duran ve ark., 2004	Rubena ve ark., 2003
UBC840_1	LG2	LG2					
UBC840_3	LG4	LG1					
UBC807_2	LG5	LG2					
UBC807_8	LG7	LG2					
UBC807_5	LG8	LG4					
UBC771	LG4	LG1					
UBC715_2	LG4	LG1					
UBC502_1	LG10	LG9					
UBC502_2	LG2	LG6					
UBC715_3	LG10	LG3					
CS31_1	LG2	LG7					
CS31_3	LG2	LG7					
UBC715_1	LG2	LG4					
UBC763_1	LG8	LG4					
CS54_2	LG8	LG8					
UBC440	LG6	LG4					
SSR302	unlink		LG1	LG1			
SSR13	unlink		LG1	LG1			
SSR233	unlink		LG14	LG2			
SSR184	unlink		LG2	LG2			
SSR48	unlink		LG3	LG7			
SSR113	unlink			LG4			
opeB8a	LG6						LG6
SSR66	LG2		Unlink				
SSR33	LG2		LG3				
SSR317_2	LG3		Unlink				
SSR336	LG4		LG1				
SSR212_1	LG6		LG6				
SSR138	LG8		Unlink				
SSR19	LG10		LG6				
SSR323	LG11		LG5	LG1			
SSR207_2	LG11		Unlink				
MS3	LG11					unlink	
opeD06	LG2		LG6				
opeN19b	LG2		LG6				
opeC6	LG5	LG3					
opeC7	LG5	LG6					
opeN19a	LG8				LG4		



Şekil 4.2. Precoz x WA8649041 melezinden elde edilen RIL popülasyonunda RAPD, SSR, ISSR, AFLP ve morfolojik markırlar kullanarak geliştirilen mercimek genetik bağlantı haritası.

4.3. QTL Analizleri

Tek markır (single marker) QTL analizleri

Mevcut markırların tek tek kışa dayanıklılıkla ilişkilerini belirlemek için regresyon analizi ile tek markıra dayalı QTL analizleri yapılmıştır. Tek markır analizleri ön aşama olarak bir markörün QTL ile ilişkisi olduğu hakkında bilgi verirken, QTL bölgelerinin belirlenmesinde bilgi vermemektedir. Tek markır analizleri sonucu bağlantı grupları 2, 4, 7 ve 10'da çok sayıda markörün mercimekte kışa dayanıklılıkla ilişki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.6). Her üç lokasyonda kışa dayanıklılıkla ilişki gösteren ISSR markırı olarak UBC807_11 belirlenmiştir. Bu markır Haymana 1997-98 lokasyonu için LOD değeri 2' nin altında olmasına rağmen R^2 değeri % 10 unun üstünde olup ilişki derecesi önemlidir. Diğer yandan lokasyon ve yıla spesifik markırlar yanında, sadece iki lokasyonda (Haymana 98 ve Haymana 00; Haymana 98 ve Pullman 99; Haymana 00 ve Pullman 99) kışa dayanıklılıkla önemli derecede ilişki gösteren markırlar tespit edilmiştir. Örneğin bağlantı grubu 2 üzerinde D07 ve U715_1 gibi RAPD markırları hem Haymana 98 hem Pullman 99 lokasyonunda kışa dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur. Bağlantı grubu 10 üzerinde UBC840_2 markırı sadece Haymana lokasyonunda 1997-98 sezonunda kışa dayanıklılıkla ilişki göstermektedir.

Tablo 4.6.Tek markır analizleri sonucu kışa dayanıklılıkla ilişki gösteren markırlar, bağlı oldukları bağlantı grupları, fenotipik varyansı açıklama oranları (R^2), LOD skorları ve önemlilik dereceleri (P)

Markır	Bağlantı grubu	Markır yeri (cM)	R^2	LOD	P	Lokasyon
AB08	LG2	61,4	0,11	2,41	0,0001	Haymana 00
AB12b	LG2	35,2	0,10	1,64	0,0007	Haymana 98
AB12b	LG2	35,2	0,15	2,4	0,0011	Birleştirilmiş
AB12b	LG2	35,2	0,13	2,07	0,0024	Pullman 99
AB14b	LG2	102,3	0,14	2,31	0,0014	Birleştirilmiş
AB14b	LG2	102,3	0,12	2	0,0029	Pullman 99
B01a	LG4	6,2	0,11	2,04	0,0026	Haymana 00
CS31_1	LG2	47,2	0,10	2,06	0,0024	Birleştirilmiş
CS31_3	LG2	113,6	0,12	2,28	0,0014	Pullman 99
CS54_3	LG2	23,2	0,18	3,62	0,0001	Birleştirilmiş
CS54_3	LG2	23,2	0,17	3,54	0,0001	Pullman 99
D07	LG2	81,3	0,11	2,15	0,002	Haymana 98
D07	LG2	81,3	0,18	3,63	0,0001	Birleştirilmiş
D07	LG2	81,3	0,14	2,87	0,0003	Pullman 99
D20b	LG2	89	0,13	2,12	0,0022	Birleştirilmiş
D20b	LG2	89	0,15	2,69	0,0005	Pullman 99
D20e	LG2	67,7	0,11	2,2	0,0017	Haymana 00
D20e	LG2	67,7	0,11	2,12	0,0021	Birleştirilmiş
M18a	LG4	0	0,15	3,06	0,0002	Haymana 00
M18a	LG4	0	0,10	2,03	0,0026	Birleştirilmiş
N19a	LG2	28,3	0,10	2,26	0,0015	Haymana 00
N19a	LG2	28,3	0,14	3,05	0,0002	Birleştirilmiş
N19a	LG2	28,3	0,12	2,66	0,0006	Pullman 99
O02	LG4	46,5	0,10	2,02	0,0027	Haymana 00
O02	LG4	46,5	0,08	1,69	0,006	Haymana 98

O02	LG4	46,5	0,13	2,7	0,0005	Birleştirilmiş
Q02a	LG2	80,1	0,09	2,01	0,0027	Haymana 00
Q02a	LG2	80,1	0,15	3,18	0,0002	Birleştirilmiş
Q02a	LG2	80,1	0,12	2,68	0,0005	Pullman 99
SSR33	LG2	95,5	0,13	2,65	0,0006	Birleştirilmiş
SSR33	LG2	95,5	0,14	2,87	0,0003	Pullman 99
U502_2	LG2	23,2	0,18	3,28	0,0001	Birleştirilmiş
U502_2	LG2	23,2	0,15	2,89	0,0003	Pullman 99
U715_1	LG2	39,8	0,11	2,06	0,0024	Haymana 98
U715_1	LG2	39,8	0,19	3,59	0,0001	Birleştirilmiş
U715_1	LG2	39,8	0,15	2,89	0,0003	Pullman 99
U771_2	LG2	76,2	0,14	2,33	0,0013	Birleştirilmiş
U771_2	LG2	76,2	0,11	1,82	0,0045	Pullman 99
UBC318_1	LG2	25,8	0,16	3,45	0,0001	Birleştirilmiş
UBC318_1	LG2	25,8	0,13	2,63	0,0006	Pullman 99
UBC721	LG2	20,1	0,19	2,39	0,0012	Birleştirilmiş
UBC721	LG2	20,1	0,17	2,15	0,0021	Pullman 99
UBC79_2	LG2	20,1	0,16	2,17	0,002	Birleştirilmiş
UBC79_2	LG2	20,1	0,21	2,96	0,0003	Pullman 99
UBC807_11	LG4	70,4	0,19	3,53	0,0001	Haymana 00
UBC807_11	LG4	70,4	0,11	1,88	0,0038	Haymana 98
UBC807_11	LG4	70,4	0,24	4,41	0	Birleştirilmiş
UBC807_11	LG4	70,4	0,13	2,38	0,0011	Pullman 99
UBC807_12	LG4	39,5	0,15	3,32	0,0001	Haymana 00
UBC807_12	LG4	39,5	0,16	3,54	0,0001	Birleştirilmiş
UBC807_12	LG4	39,5	0,09	2,02	0,0026	Pullman 99
UBC807_3	LG4	42,6	0,18	3,74	0	Haymana 00
UBC807_3	LG4	42,6	0,09	1,88	0,0038	Haymana 98
UBC807_3	LG4	42,6	0,17	3,47	0,0001	Birleştirilmiş
UBC807_5	LG7	22,4	0,11	2,31	0,0013	Birleştirilmiş
UBC840_2	LG10	41,3	0,10	2,09	0,0022	Haymana 98
UBC840_3	LG4	42,6	0,19	2,08	0,0026	Haymana 00
UBC840_3	LG4	42,6	0,24	2,68	0,0006	Haymana 98
UBC840_3	LG4	42,6	0,27	3,07	0,0003	Birleştirilmiş

İnterval QTL analizleri (interval QTL mapping)

Mercimekte kışa dayanıklılığın (% canlılık oranı) lokasyonlara göre ayrı ayrı ve birleştirilmiş verilerinin interval QTL analizleri sonucu kışa dayanıklılığı kontrol eden toplam 8 QTL bölgesi belirlenmiştir (Tablo 4.7). Üç QTL (QTL1, QTL2 ve QTL3) bağlantı grubu 2'de, 3 QTL (QTL4, QTL5 ve QTL6) bağlantı grubu 4'de, 1 QTL (QTL7) bağlantı grubu 7'de ve 1 QTL (QTL8) bağlantı grubu 10'da belirlenmiştir. Diğer yandan lokasyonlara göre belirlenen QTL sayıları farklı olmuştur. Pullman lokasyonunda 5 QTL belirlenirken, Haymana lokasyonu 1997-98' de 4 QTL ve yine aynı lokasyonda 1999-00 verilerinin değerlendirmesinde 6 QTL belirlenmiştir. Bu durum QTL belirlemede yıl ve çevre şartlarının (genotip x çevre interaksiyonları) etkisini ortaya koymaktadır. Kışa dayanıklılıkla ilgili belirlenen QTL bölgeleri için detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

QTL1: Tüm lokasyonlarda ve birleştirilmiş analizlerde belirlenmiş olup, QTL pik noktası lokasyonlara göre farklılık göstermektedir. Bu QTL Pullman lokasyonunda en etkin olup, LOD skor 4.66 ve fenotipik varyansın % 20.6' sını açıklamaktadır.

Tablo 4.7. Lokasyonlara göre mercimekte kışa dayanaklılığı kontrol eden QTL bölgeleri ve özellikleri.

Lokasyon	Bağlantı Grubu	QTL pik noktası ve Bölgesi (cM)	Pik Markır	LOD	R^2 (%)	P	QTL tanımlaması
Haymana 1997-98	2	38 (36-40)	U715_1	2,12	10,3	0,0021	QTL1
	4	44 (42-46)	UBC840_3	2,19	10,6	0,0017	QTL5
	7	58 (58-60)	UBC807_6	2,09	10,1	0,0022	QTL7
	10	40 (36-44)	UBC840_2	2,33	11,2	0,0012	QTL8
					Toplam R2 = 12.5		
Pulman 1998-98	2	20 (20-40)	CS54_3	4,66	20,6	0	QTL1
	2	78 (72-102)	D07	3,13	14,4	0,0002	QTL2
	2	110 (106-126)	CS31_3	3,49	15,9	0,0001	QTL3
	4	8 (8-10)	B01a	2,24	20,9	0,0018	QTL4
	4	70 (66-72)	UBC807_11	2,41	14,3	0,0011	QTL6
					Toplam R2 = 14.7		
Haymana 1999-00	2	30 (22-44)	N19a	2,34	10,9	0,0015	QTL1
	2	70 (50-80)	AB08	3,19	14,6	0,0002	QTL2
	2	102 (102-106)	AB14b	2,19	10,2	0,0017	QTL3
	4	2 (0-12)	B01a	3,09	14,2	0,0002	QTL4
	4	42 (22-54)	UBC807_3	3,74	18,1	0	QTL5
	4	68 (60-74)	UBC807_11	3,61	16,9	0,0001	QTL6
					Toplam R2 = 29.9		
Birleştirilmiş	2	24 (20-44)	CS54_3	3,95	18,3	0	QTL1
	2	74 (70-80)	D07	3,69	17,2	0	QTL2
	2	106 (100-110)	AB14b	3,47	16,3	0,0001	QTL3
	4	42 (38-56)	UBC807_12	3,89	18,1	0	QTL5
	4	68 (64-70)	UBC807_11	3,61	16,9	0,0001	QTL6
	7	56 (54-62)	B10b	2,61	10	0,0007	QTL7
					Toplam R2 = 35.0		

QTL2: Pullman 1998-99 ve Haymana 1999-00 lokasyonunda belirlenmiş olup birleştirilmiş analizlerde fenotipik varyansın % 17.2' sini açıklamaktadır.

QTL3: Pullman 1998-99 ve Haymana 1999-00 lokasyonunda etkin olup, birleştirilmiş analizlerde fenotipik varyansın % 16.3' ünü açıklamaktadır.

QTL4: Pullman 1998-99 ve Haymana 1999-00 lokasyonunda belirlenmiş olup, birleştirilmiş analizlerde belirlenememiştir.

QTL5: Sadece Haymana lokasyonuna spesifik QTL olup, Pullman lokasyonunda etkin değildir. Birleştirilmiş analizlerde fenotipik varyansın % 18.1' ini açıklamaktadır.

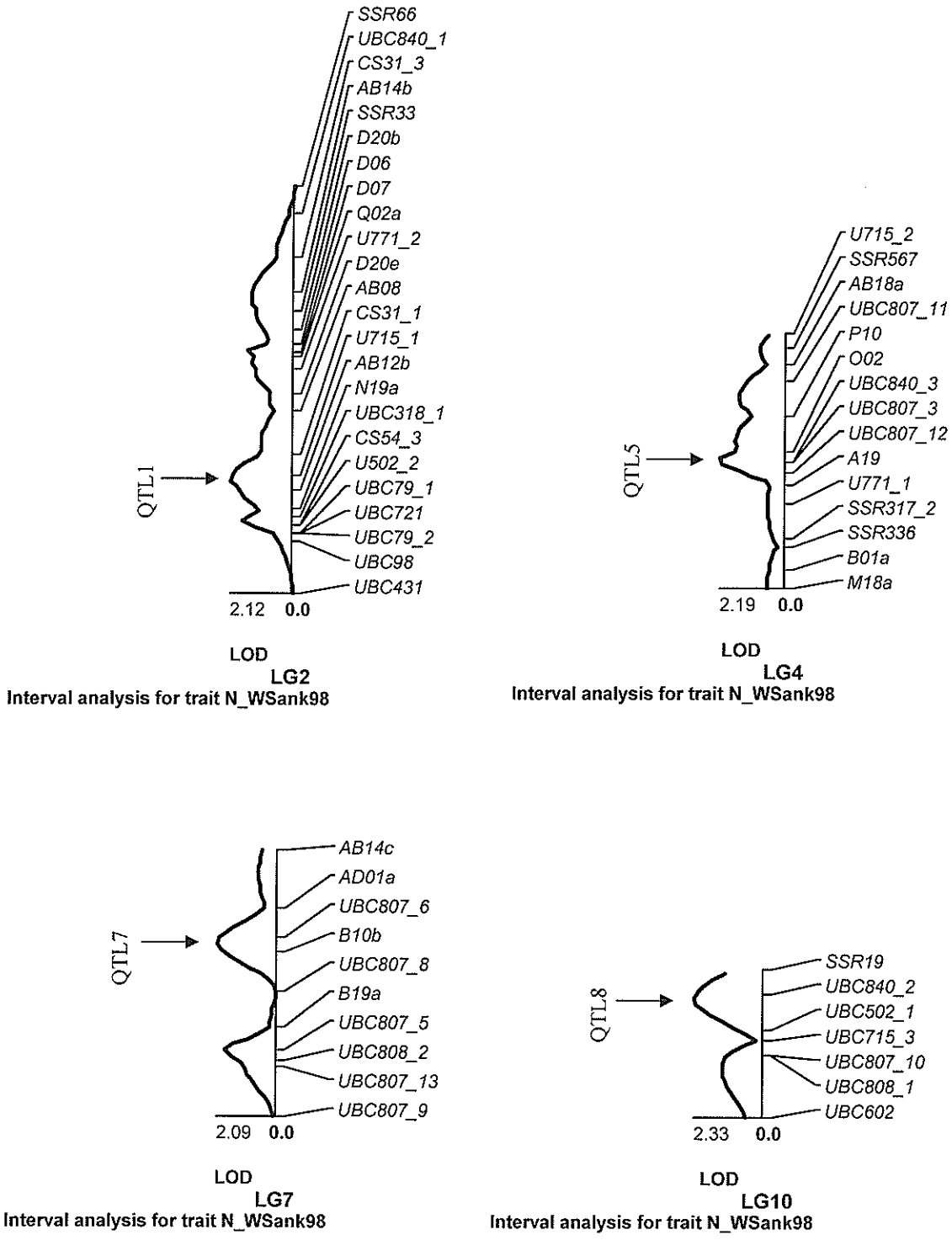
QTL6: Pullman 1998-99 ve Haymana 1999-00 lokasyonlarında etkin olup, birleştrilmiş analizlerde fenotipik varyansın % 16.9' unu açıklamaktadır.

QTL7: Haymana 1997-98 lokasyonuna özel QTL olup, fenotipik varyansın % 10'unu açıklamaktadır.

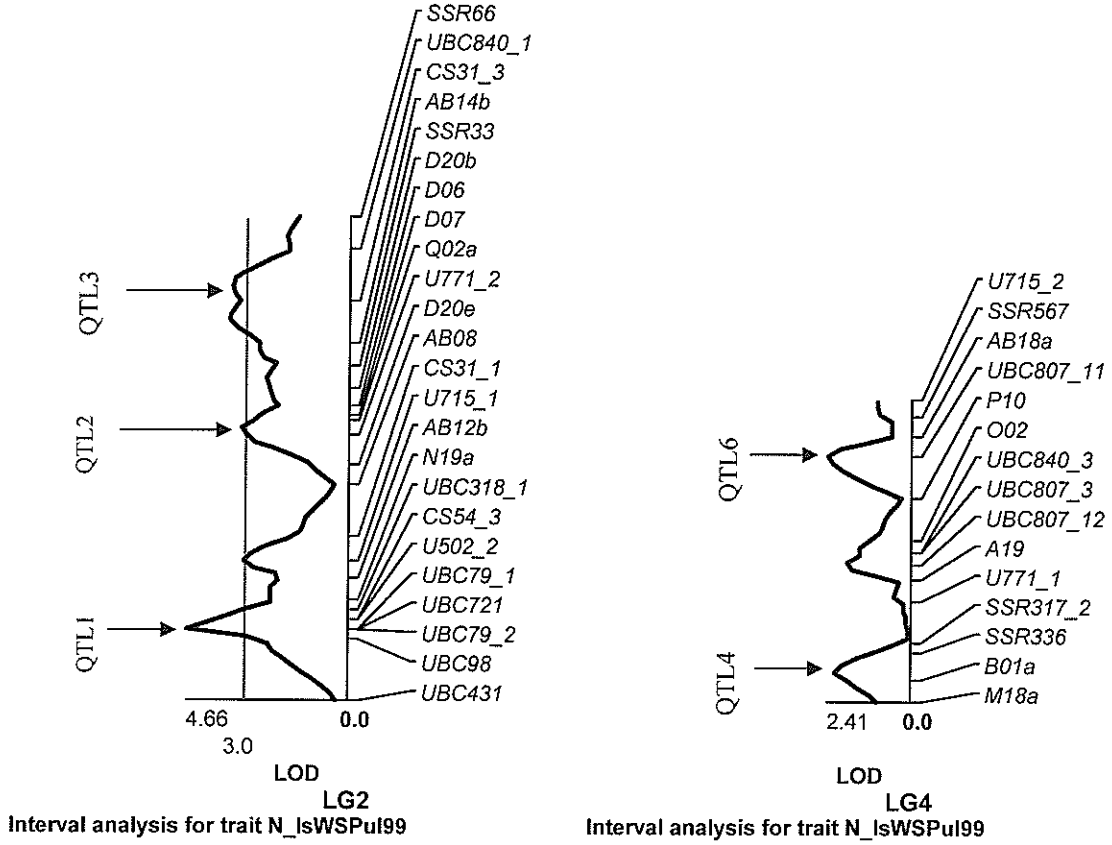
QTL8: Haymana 1997-98 lokasyonunda etkin bir QTL olup fenotipik varyansın % 11.2' sini açıklamaktadır.

Lokasyonlara göre belirlenen QTL' ler değerlendirildiğinde, Haymana lokasyonu 1997-98 sezonu için kışa dayanıklılıkla ilgili toplam 4 QTL (QTL1, 5, 7 ve 8) belirlenmiş olup, QTL7 ve QTL8 sadece bu lokasyon ve yıla özel bulunmuştur. Dört QTL toplam fenotipik varyansın % 12.5' ini açıklamaktadır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.3). Pullman lokasyonunda toplam 5 QTL (QTL1, 2, 3, 5 ve 6) kışa dayanıklılığı belirlemede etkin gözükmekte ve bu 5 QTL toplam fenotipik varyansın % 14.7' sini açıklamaktadır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.4). Haymana lokasyonu 1999-00 sezonu için kışa dayanıklılıkla ilgili toplam 6 QTL (QTL1, 2, 3, 4, 5 ve 6) belirlenmiş ve bu 6 QTL toplam fenotipik varyansın % 29.9' unu açıklamaktadır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.5). Kışa dayanıklılıkla ilgili 3 yıllık verilerin birleştirilmiş analizlerinde toplam 6 QTL (QTL1, QTL2, QTL3, QTL5 ve QTL6) belirlenmiş olup, bu 6 QTL toplam fenotipik varyansın % 35'ini açıklamaktadır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.6).

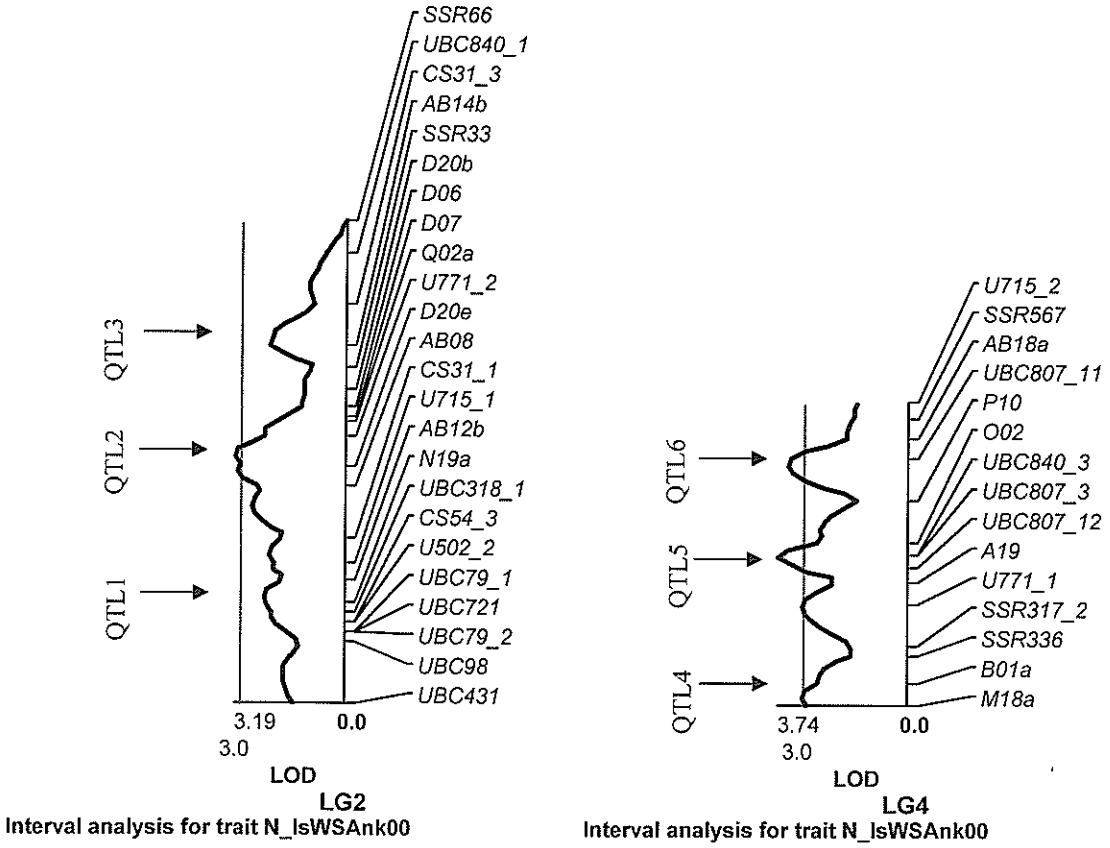
Sekiz QTL hepsi beraber hiçbir lokasyonda ve birleştirilmiş analizlerde belirlenememiştir. QTL bölgelerinin belirlenmesi lokasyondan lokasyona farklılık gösterirken, aynı lokasyonda (Haymana) yıllar arasında da farklı QTL lerin etkin olduğu gözlemlenmiştir.



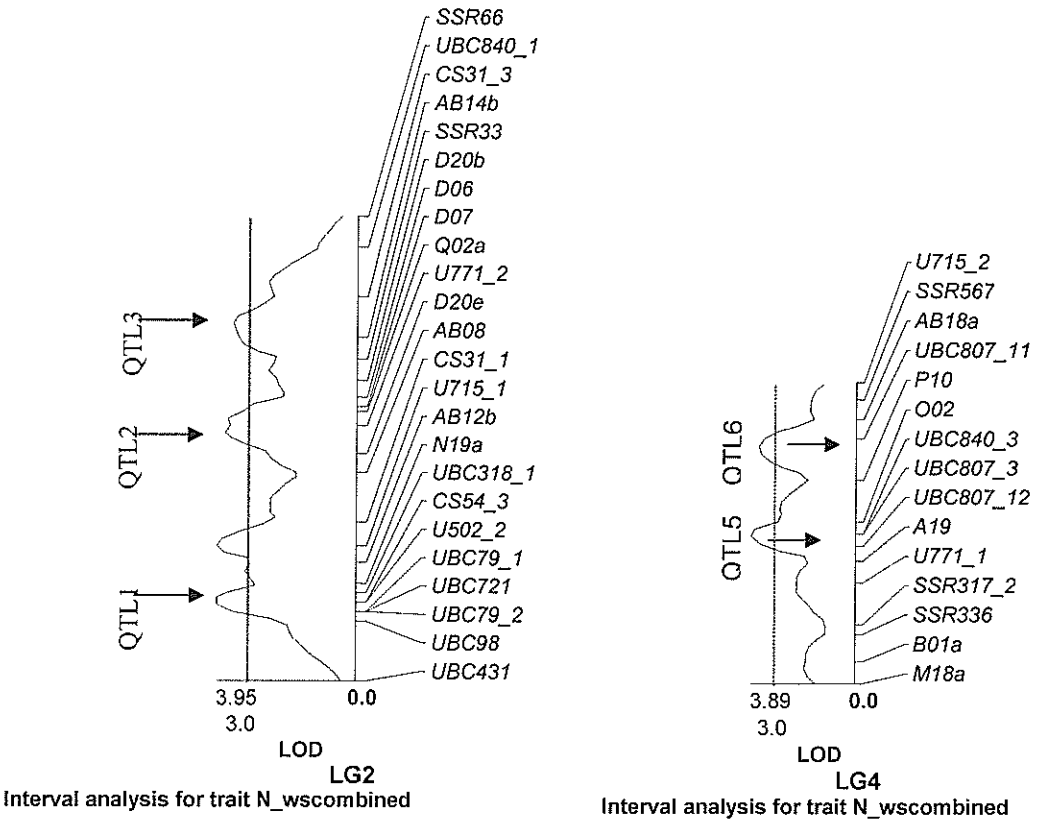
Şekil 4.3. Haymana lokasyonu 1997-98 mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri.



Şekil 4.4. Pullman lokasyonu 1998-99, mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri.



Şekil 4.5. Haymana lokasyonu 1999-00, mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri.



Şekil 4.6. Üç lokasyona ait birleştirilmiş veriler ve mercimekte kışa dayanıklılığı kontrol eden QTL bölgeleri

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

İki ebeveyn (Precoz ve WA8649041) kışa dayanıklılık bakımından büyük farklılıklar göstermiştir. Dayanıklı ebeveyn WA8648041 sert kış şartlarının oluştuğu Pullman lokasyonunda kışa dayanıklılığı yüksek olurken, dayanıksız ebeveyn Precoz'a ait bütün bitkiler ölmüştür. RIL popülasyonuna ait kışa dayanıklılık verileri, mercimekte kışa dayanıklılığın çok gen tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Frekans tablolarının süreklilik göstermesi, karakteri çok gen tarafından kontrol edildiğinin bir işareti olarak kabul edilmektedir (Lynch and Walsh, 1998). Fakat, çevre varyasyonu yüksek olduğunda, karakter tek bir major gen tarafından kontrol edilse bile, frekans dağılım grafiği yine sürekli bir eğilim gösterebilmektedir. Çalışmada lokasyonlar ve birleştirilmiş analizlerde RIL popülasyonuna ait frekans dağılım grafikleri tek gen modeline uygun bir dağılım göstermemiştir. Bu sonuçlar kışa dayanıklılığın buğdayda (Thomashow,1990), bezelyede (Liesenfeld ve ark.,1986) ve mercimekte (Kahraman ve ark., 2004a) birden fazla gen tarafından kontrol edildiğini belirten literatür raporları ile uyum göstermektedir.

Genetik bağlantı haritası 149 markır (59 RAPD, 57 AFLP ve 18 ISSR, 13 SSR ve 2 morfolojik markır) ve 11 bağlantı grubundan oluşmuştur. Genetik haritaya ait özellikler Tablo 4.4' te ve mercimek genetik bağlantı haritası Şekil 4.2' de verilmiştir. Genetik harita toplam uzunluğu 1340.0 cM olup, iki markır arası ortalama uzaklık 8.99 cM ve ortalama kromozom uzunluğu 121.8 cM'dır. Haritada yer alan bağlantı gruplarında markır sayıları 5 ile 39 arasında değişmiştir. AFLP markörleri genellikle belli bağlantı gruplarında kümelenirken, RAPD, ISSR ve SSR markörleri bağlantı gruplarına genel bir dağılım göstermişlerdir.

Moleküler markörlerden RAPD, AFLP, ISSR, SSR ve morfolojik markırlar mercimek genetik harita çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Eujayl ve ark., 1997, 1998; Ford ve Taylor, 2003; Duran et al. 2004; Hamwieh ve ark., 2005, Kahraman ve ark 2004b; Tullu ve ark., 2008). Çeşitli araştırıcılar tarafından değişik popülasyonlarda geliştirilen bu genetik haritalar kodominant markırların fazla olmayışı ve kullanılan markırların farklı oluşu nedeniyle haritaların karşılaştırmalı analizleri mümkün gözükmemektedir. Bu çalışmada oluşturulan genetik harita ile diğer mercimek genetik haritaları karşılaştırma imkanı elde edilmiştir Ortak markörlerden bazıları aynı bağlantı grubu üzerinde yer alırken, diğer markırlar farklı bağlantı gruplarında yer almışlardır. Diğer yandan mercimek kromozomları üzerinde her hangi bir kodominant markır tam olarak anchor edilemediğinden kromozomlara özgün ve belirleyici anchor markırlar bulunmamaktadır. Bu durum geliştirilen genetik haritalarda ki bağlantı gruplarının, araştırıcının istediği şekilde isimlendirmesine yol açmaktadır. Anchor markırların olmayışı genetik haritaların karşılaştırmalı analizlerini zorlaştırmaktadır. SSR markörleri kodominant olmalarına rağmen, bu çalışmada ve Tullu ve ark., (2008) tarafından oluşturulan genetik haritadaki SSR markörlerinin az sayıda olması bu haritaların Hamwieh ve ark., (2005) tarafından geliştirilen genetik harita ile tam olarak karşılaştırma imkanı vermemektedir.

Mercimek genomunda polimorfizm seviyesinin RAPD, AFLP, ISSR ve SSR gibi markörlerde yüksek olduğu gözlemlenmesine rağmen (Kahraman ve ark., 2004; Hamwieh ve ark., 2005) bu çalışmada SSR

primerlerinden beklenen polimorfizm oranı sağlanamamıştır. Duran ve ark. (2004), geliştirdikleri 5 SSR primerinden sadece MS5S SSR primerini kullandıkları F_2 popülasyonunda haritalarken, Hamwieh ve ark. (2005), geliştirdikleri 30 SSR primerinden 42 polimorfik markır (26 kodominant ve 16 dominant) belirleyerek 39 SSR markörünü mercimek genomunda haritalamışlardır. Polimorfizm oranı ve genetik bağlantı haritasında fazla sayıda SSR markırı haritalanmasının sebebi, SSR primerlerinin çalışmada kullanılan popülasyonun ebeveynlerine ait genomik DNA'larından geliştirildiği için olabilir. Diğer yandan Hamwieh ve ark. (2005), tarafından geliştirilen SSR primerleri başka bir mercimek genetik haritalama popülasyonunda kullanılmış olup sadece 7 SSR markırı haritalanabilmiştir (Tullu ve ark., 2008). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Tullu ve ark. (2008), tarafından elde edilen sonuçlara benzerlik göstermekte olup, kullanılan popülasyonun genetik yapısının SSR primerlerinde polimorfizm oranını etkilediği görülmektedir.

Bu çalışma kapsamında en önemli konulardan birisinide SSR markörlerinin genom haritalamasında kullanılması oluşturmuştur. SSR markörleri kodominant özellik göstermeleri nedeniyle karşılaştırmalı genetik harita analizlerinin yapılmasına imkan verdiği için çalışmalar SSR markörleri üzerinde yoğunlaşmış ve proje kapsamı ve desteğinde SSR markörleri üzerine yüksek lisans tez çalışması yapılmıştır (Varlı, 2009). Bağlantı analizleri sonucunda 23 polimorfik SSR marköründen 13 SSR değişik bağlantı gruplarında yer alırken diğer 10 SSR markır hiçbir bağlantı grubunda yer almamıştır. SSR markörlerinin genomda farklı gruplarda dağılış göstermesi istenilen bir sonuç olup, mercimekte geliştirilen diğer genetik haritalarla karşılaştırma imkânı sağlaması bakımından önemlidir. Daha çok SSR markörünün mercimek genomunda haritalanması için mercimekte yeni SSR markörlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kışa dayanıklılıkla ilgili 8 QTL belirlenmesine rağmen sadece 1 QTL (QTL1) tüm lokasyonlarda bulunmuştur. Herhangi bir karakter için aynı QTL'in değişik çevre şartlarında belirlenmesi markıra dayalı seleksiyon ıslahı programlarında arzu edilen bir durumdur (Veldboom and Lee, 1996). QTL1 değişik lokasyonlarda belirlenmesine rağmen, QTL etkinliği ve pozisyonunda lokasyonlar arasında farklılıklar gözlemlenmesi her bir lokasyonda oluşan farklı kış şartlarının etkisi nedeniyle olabilir. Aynı lokasyonda (Haymana) fakat farklı yıllarda farklı QTL'lerin bulunması kış şartlarının QTL belirlemede etkisinin lokasyon etkisinden daha önemli olduğunun bir göstergesi olabilir. Bunun yanında kullanılan popülasyonun genetik yapısı da belirlenen QTL sayısını etkilemektedir. Kahraman ve ark., (2004b) farklı bir RIL populasyonu kullanarak yaptıkları çalışmada kışa dayanıklılıkla ilgili 5 QTL belirlemişlerdir. Mercimekte kışa dayanıklılıkla ilgili QTL çalışmaları oldukça sınırlı olup buğdayda yapılan çalışmalara kıyasla çok azdır. Konu üzerinde daha fazla araştırma yapılması kışa dayanıklılık hakkında daha fazla bilgi elde edilmesine katkıda bulunacaktır.

Çalışma da QTL analizleri ile kışa dayanıklılık için markıra dayalı seleksiyon (MAS) ıslahı programlarında kullanılma ihtimali olabilecek bir çok aday markır belirlenmiştir. RAPD markörleri U715_1, CS54_3 ve N19a QTL1 için; D07 ve AB08 markörleri QTL2 için; CS31_3 ve AB14b markörleri QTL3 için; B01a markırı QTL 4 için, UBC840_3, UBC807_3, UBC807_12 markörleri QTL5 için, UBC807_11 markırı QTL6 için; B10b markırı QTL7 için ve UBC840_2 markırı QTL8 için kışa dayanıklılıkla ilgili MAS programlarında kullanılabilirlikleri değerlendirilmelidir. MAS çalışmalarının kışa dayanıklılık için başarılı bir

şekilde kullanılması, tarla çalışmalarının güvensizliğini (yumuşak kış şartları ya da çok sert kış şartlarında verilerin değerlendirilememesi gibi) ve tarla denemelerine olan bağımlılığı kaldırarak kışa dayanıklılık ıslahı çalışmalarını hızlandırmada yardımcı olacaktır. Kışa dayanıklılık için belirlenen bu QTL' ler ve genetik markırların etkinliklerinin daha kuvvetli olarak belirlenmesi için daha farklı çevre şartlarında kışa dayanıklılıkla ilgili yeni verilerin elde edilmesi ve farklı popülasyonlarda bu markırların kışa dayanıklılıkla ilişkilerinin araştırılması MAS çalışmaları için faydalı olacaktır.

REFERANSLAR

ALI, A., Johnson, D.L., Heritability Estimates for Winter Hardiness in Lentil Under Natural and Controlled Conditions, Plant Breeding, 119:283-285, (2000).

ARUMUGANATHAN, K., Earle, E.D., Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species, Plant Mol Boil., 9: 208-218, (1991).

AULD, D. L., Ditterline, R. L., Murray, G. A., Swensen, J. B., Screening Peas for Winter Hardiness under Field and Laboratory Conditions, Crop Sci., 23:85-88, (1983).

BAUM, M., Weeden, N. F., Muehlbauer, F., Kahl, G., Udupa, S. M., Eujayl, I., Weigand, F., Harrabil, M., Bouznad, Z., Marker Technology for Plant Breeding, (ed. Knight, R.), Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century. Kluwer, Dordrecht, pp 421–427, (2000).

COLLARD, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K., An Introduction to Markers, Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping and Marker-Assisted Selection for Crop Improvement: The Basic Concepts, Euphytica, 142,169-196, (2005).

COUSIN, R., Messager, A., Vingere, A., Breeding for Yield in Combining Peas. pp. 115-129. (ed. Hebblethwaite, P.D., Heath, M. C., Dawkins, T. C. K.,), The Pea Crop. A Basis for Improvement, Butterworths, London, UK., (1985).

DEXTER, S.T., Tottingham, W.E., Graber, L.F., Investigations of Hardiness of Plants by Measurements of Electrical Conductivity, Plant Physiology, 7: 63-78, (1932).

DEXTER, S.T., The Evaluation of Crop Plants for Winter Hardiness, (ed.Norman, A. G.,) Advances in Agronomy, Vol. 8. Academic Press Inc., publisher, New York, pp. 204-236, (1956).

DOYLE, J.J., Doyle, J.L., A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue, Phytochem Bull, 19,11-15, (1987).

DURAN, Y., Fratini, R., Garcia, P., Vega, M.P., An Intersubspecific Genetic Map of Lens, Theor. Appl. Genet., 108: 1265-1273, (2004).

ERSKINE, W., Meyveci, K., Izgin, N., Screening of World Lentil Collection for Cold Tolerance, LENS Newsletter, 8:5-9, (1981).

EUJAYL, I., Baum, M., Erskine, W., Pehu, E., Muehlbauer, F. J., The Use of RAPD Markers for Lentil Genetic Mapping and the Evaluation of Distorted F_2 Segregation, Euphytica, 96:405-412, (1997).

EUJAYL, I., Baum, M., Powell, W., Erskine, W., Pehu, E., A Genetic Linkage Map of Lentil (*Lens sp.*) Based on RAPD and AFLP Markers Using Recombinant Inbred Lines. Theor. Appl. Genet., 97: 83-89, (1998).

EMAMI, M. K., Sharma, B., Linkage Between Three Morphological Markers in Lentil, Plant Breeding, 118: 579-581, (1999).

FAO. FAO Statistical Databases, http://faostat.fao.org., (2006)

FOWLER, D.B., Gutsa, L.V., Selection for Winterhardiness in Wheat, I. Identification of Genotypic Variability, Crop Sci. 19: 769-772, (1979).

FOWLER, D.B., Gutsa, L.V., Tyler, N.J., Selection for Winterhardiness in Wheat Screening Methods, Crop Sci., 21: 896-901, (1981).

GÜLŞEN, O., Mutlu, N., Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları, Alatarım, 4(2), 27-37, (2005).

HAMWİEH, A., Udupa, S.M., Choumane, W., Sarker, A., Dreyer, F., Jung, C., Baum, M., A Genetic Linkage Map of Lens sp. Based on Microsatellite and AFLP Markers and Localization of *Fusarium vascular* Wilt Resistance, Theor. Appl. Genet. 110: 669-677, (2005).

HAVEY, M. H., Muehlbauer, F. J., Linkages Between Restriction Fragment Length, Isozyme and Morphological Markers in Lentil, Theor Appl Genet, 77:395–401, (1989).

HAYES, P. M., Blake, T.,. Chen, T. H. H., Tragoonrung, S., Chen, F., Pan, A., Liu, B., Quantitative Trait Loci on Barley (*Hordeum vulgare L.*) Chromosome 7 Associated with Components of Winterhardiness, Genome, 36: 66-71, (1993).

HERZOG, H., Winter Hardiness in Faba Beans: Varietal Differences and Interrelation Among Selection Criteria, Plant Breeding, 101: 269-276, (1988).

JONES, B.N., Ougham, H., Thomas, H., Markers and Mapping: We are All Genetics Now, New Phytol, 137, 165-177, (1997).

KAHRAMAN, A., Kusmenoğlu, I., Aydın, N., Aydoğan, A., Erksine, W., Muehlbauer, F.J., QTL Mapping of Winter Hardiness Genes in Lentil, Crop Science, 13-22, (2004a).

KAHRAMAN, A., Kusmenoğlu, I., Aydın, N., Aydoğan, A., Erksine, W., Muehlbauer, F.J., Genetics of Winter Hardiness in 10 Lentil Recombinant Inbred Line Populations, Crop Sci. 44:5–12, (2004b).

KEARSEY, M. J., Pooni, H. S., The Genetical Analysis of Quantitative Traits. Chapman & Hall, London, p.381, (1996).

KUSMENOĞLU, I., Aydın, N., The Current Status of Lentil Germplasm Exploitation for Adaptation to Winter Sowing in the Anatolian Highlands, (ed. Keatinge, J.D.H., Kusmenoglu, I.), Autumn-Sowing of Lentil in the Highlands of West Asia and North Africa, Central Research Institute for Field Crops (CRIFC), Ankara, Turkey, pp. 63-71, (1995).

LANDER, E. S., Green P., Abrahamson J., Bartow A., Doly M. J., Lincoln, S. E, Newburg L., Map Maker, An Interactive Computer Package for Constructing Primary Genetic Linkage Maps of Experimental and Natural Populations, Genomics 1: 174-181, (1987).

LEWITT J., Responses of Plants to Environmental Stresses: Chilling, Freezing and High Temperature Stresses, Vol: 1., Academic Press, New York, 497p, (1980).

LIENSENFELD, D. R., Auld, D. L., Murray, G. A., Swensen, J. B., Transmittance of Winter Hardiness in Segregated Populations of Peas., Crop Sci., 26:49-54, (1986).

MALHOTRA, R. S., Singh, K. B., The Inheritance of Cold Tolerance in Chickpea, Journal of Genetics and Breeding, 44:227-30, (1990).

MANLY, K. F., User's Manual for Map Manager Classic and Map Manager QT. http//mcbio.med.buffalo.edu. (1998).

MICHOLMORE, R.W., Paron, I., Keselli, R. V., Identification of Markers Linked to Disease Resistance Genes by Bulked Segregant Analysis: A Rapid Metod to Detect Markers in Spesific Genomic Regions by Using Segregating Populations, PNAS, p.6-9, (2006).

MOHAN, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krisha, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., Sasaki, T., Genome Mapping, Molecular Markers and Marker-Assisted Selection in Crop Plants, Molecular Breeding 3, 87-103, (1997).

MUEHLBAUER, F. J., Tahir, M., Simon, C. J., Gene Map of Lentil: A Review. LENS Newslett, 20:3–10, (1993).

MURRAY, G. A., Eser, D., Gusta, L.V., Eteve, G., Winter Hardiness in Pea, Lentil, Faba Bean and Chickpea, (ed. Summerfield, R J.), World Crops: Cool Season Food Legumes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 831-843, (1988).

NELSON, J. C., QGENE: Software for Marker-Based Genomic Analysis and Breeding. Mol. Breed., 3:239-245, (1997).

O'BRIEN, S.J., Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes, 6th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, (1993).

OLIEN, C.R., Freezing Stresses and Survival, Annu. Rev. Plant Physiol., 18:387–408, (1967).

PAN, A., Hayes, P .M., Chen, F., Chen, T. H. H., Blake, T., Wright, S., Karsai, I., Bedo, Z., Genetic Analysis of the Compenents of Winter Hardiness in Barley (*Hordeum vulgare L.*). Theor. Appl. Genet., 89:900-910, (1994).

PATERSON, A.H., *Making Genetic Maps. In: Genome Mapping in Plants,* (ed. Paterson, A.H.), Academic Pres, Austin, Texas, pp :23-29, (1996).

RAJESH, P. N., White, D., Saha, G., Chen, W., Muehlbauer, F., Development and genetic analysis of SSR markers in lentil. Plant & Animal Genomes XVI Conference, January 12-16, Town & Country Convention Center, San Diego, CA, (2008).

RATNAPARKHE, M. B., Santra, D. K., Tullu, A.,. Muehlbauer, F. J.,. Inheritance of Inter-Simple Sequence Repeat Polymorphism and Linkage with *Fusarium* Wilt Resistance Gene in Chickpea. Theor. Appl. Genet., 96:348-353, (1998).

RUBEENA, R., Ford, P., Taylor, W. J., Construction of An Intraspecific Linkage Map of Lentil (*Lens culinaris ssp. culinaris*) Theor. Appl. Genet., 107: 910-916, (2003).

SAKAR, D., Durutan, N., Meyveci, K., Factors Which Limit the Productivity of Cool-Season Food Legumes in Turkey, (ed. Summerfield, R.J), World Crops: Cool Season Food Legumes, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 137-146, (1988).

SANTRA, D. K., Tekeoğlu, M., Ratnaparkne, M., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J., Identification and Mapping of QTLs Conferring Resistance to *Ascochyta Blight* in Chickpea. Crop Sci. 40:1606–1612, (2000).

SINGH, K. B., Malhotra, R.S., Saxena, M. C., Chickpea Evaluation for Cold Tolerance under Field Conditions, Crop Science, 29: 282-285, (1989).

SPAETH, S.C., Muehlbauer, F.J., Registration of Three Germplasms of Winterhardy Lentil. Crop Sci., 31:1395, (1991).

STEPONKUS, P., Cold Hardiness and Freezing Injury of Agronomic Crops, (ed. Brady, N. C .), Advances in Agronomy, Vol. 30. Academic Press Inc., NY, pp. 51-97, (1978).

SUTKA, J., Genetic Studies of Frost Resistance in Wheat, Theoretical and Applied Genetics, 59: 145-152, (1981).

QUAMME, H. A., Breeding and Selecting Temperate Fruit Crops for Cold Hardiness, (ed. Lyons, J.M, Graham, D., Rauson, J. K.), Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Academic Press, Inc., New York, pp. 313-332, (1978).

TAHIR, M., Erksine, W., Hussain, A., Baksh, A., Ellis, R. H., Summerfield, R. J., Roberts, E. H., Field Evaluation of a Model of Photothermal Flowering Responses in a World Lentil Collection. Theor. Appl. Genet, 88: 423-428, (1994).

TANSKLEY, S.D., Hewit, J., Use of Molecular Markers in Breeding for Soluable Solids Content in Tomato-a Reexamination, Theo. Appl. Genet., 75,811-823, (1988).

THOMASHOW M.F., Molecular Genetics of Cold Acclimation in Higher Plants, Advances in Genetics, 28: 99-131, (1990).

THOQUET, P., Ghenardi, M., Journet, E.P., Kereszt, A., Ane, J.M., Prosperi, J.M., Huguet, T., The Molecular Genetic Linkage Map of the Model Legume *Medicogo truncatula*: an Essential Tool for Comparative Legume Genomics and the Isolation of Agronomically Important Genes, BMC Plant Biology, 2:1, 1-13, (2002),

TINNEMORE, D., USDA-ARS, Procedures and Recipies for DNA Isolation, RAPD, RFLP, AFLP, STMS and ISSR Methods, F.J. Muehlbauer Lab., Grain Legume Genetics and Physiology Research Unit, Pulman, W.A., p. 46, (1999).

TULLU, A., Tar'an, B., Warkentin, T., Vanderberg, A., Construction of an Intraspecific Linkage Map and QTL Analysis for Earliness and Plant Height in Lentil. Crop Sci 48:2254-2264, (2008).

VARLI, İ., Microsatellit (SSR) DNA Markörlerinin Mercimek Genom Haritalamasında Kullanılması, (Yüksek Lisans Tezi), Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi, (2009).

WEEDEN, N. F., Muehlbauer, F. J., Ladizinsky, G., Extensive Conservation of Linkage Relationships Between Pea and Lentil Genetic Maps. Journal of Heredity. 83: 123-129, (1992).

WEEDEN, N. F., Gu, W. K., Wallace, D. H., Singh, S. P., Mapping the Second Photoperiod Gene, Hr, with the Assistance of A Moleculer Marker in Common Bean. Annu Rpt. Bean Improv. Coop., 39: 215-21, (1996).

VELDBOOM, L. R., Lee, M., Genetic Mapping of Quantitative Trait Loci in Maize in Stress and Non-Stress Environments: I. Grain Yield and Yield Components, Crop Sci., 36:1310-1319, (1996).

YILDIRIM, A., Kandemir, N., Genetik Markırlar ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi II, (ed. Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M.), Bölüm 23, Konya, pp: 334-363, (2001).

YÜCE, S., Bitki Islahı ve Moleküler Biyoteknoloji Uygulamaları, Workshop on Genomics and Marker Assisted Selection (MAS) in Plant Breeding, İzmir, 03-07 Ekim, pp: 23-32, (2005).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 106O093

Proje Başlığı: Mercimekte Kışa Dayanıklılığı Kontrol Eden Genlerin Haritalanması ve Dayanıklılıkla İlgili Moleküler Markırların Belirlenmesi

Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:

Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN
Yrd. Doç. Dr. Beybin BUCAK HACIKAMİLOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Osmanbey Kampüsü 63100 Şanlıurfa

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 06.01.2006- 06.01.2009

Öz (en çok 70 kelime)

Bu projeyle mercimek genom haritası oluşturulması, kışa dayanıklılığı kontrol eden genlerin mercimek genomunda haritalanması ve kışa dayanıklılıkla ilişki gösteren moleküler markırların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada Precoz/WA8649041 mercimek genotiplerinin melezlenmesinde elde edilen 93 rekombinant saf hat (RIL) popülasyonu kullanılmıştır. Mercimek genetik bağlantı haritası 149 markır ve 11 bağlantı grubundan oluşmuştur. Kışa dayanıklılıkla ilgili toplam 8 QTL belirlenmiştir. Kışa dayanıklılık için MAS çalışmalarında kullanılma ihtimali olabilecek aday markırlar belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mercimek, kışa dayanıklılık, genetik harita, QTL

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? **Evet** ☐ **Gerekli Değil** ☒
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

VARLI, İ., Microsatellit (SSR) DNA Markörlerinin Mercimek Genom Haritalamasında Kullanılması, (Yüksek Lisans Tezi), Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi, (2009).