

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MERCİMEK CİNSİNDE (*Lens* MILLER) DAYANIKLILIK GEN
ANALOGLARI, PEROKSİDAZ VE WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ
GEN AİLELERİNİN POLİMORFİZMİ**

Duygu SARI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MERCİMEK CİNSİNDE (*Lens* MILLER) DAYANIKLILIK GEN
ANALOGLARI, PEROKSİDAZ VE WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ
GEN AİLELERİNİN POLİMORFİZMİ**

Duygu SARI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2012.02.0121.014 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

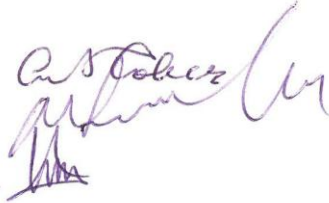
**MERCİMEK CİNSİNDE (*Lens MILLER*) DAYANIKLILIK GEN
ANALOGLARI, PEROKSİDAZ VE WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ
GEN AİLELERİNİN POLİMORFİZMİ**

Duygu SARI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 01./ 07./ 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cengiz TOKER
Doç. Dr. Nedim MUTLU
Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN



ÖZET

MERCİMEK CİNSİNDE (*Lens* MILLER) DAYANIKLILIK GEN ANALOGLARI, PEROKSİDAZ VE WRKY TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ GEN AİLELERİNİN POLİMORFİZMİ

Duygu SARI

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Haziran 2013, 82 sayfa

Dayanıklılık gen analogları, peroksidazlar ve WRKY transkripsiyon faktörleri evrimsel süreçte bitkilerin canlı ve cansız stres faktörlerine karşı dayanıklılık sağlamasında rol oynayan çoklu gen ailelerindendir. Bu çalışmada, mercimek bitkisinde bu gen ailelerinin polimorfizmi araştırılmıştır.

Genetik materyal olarak mercimek türlerinden 7 takson; 1 *L. culinaris* Medik. (kültür formu), 3 *L. ervoides* (Brign.) Grande, 4 *L. lamottei* Czefr., 4 *L. nigricans* (M.Bieb.) Godr, 4 *L. odemensis* Ladiz., 11 *L. orientalis* (Boiss.) Ponert, 3 *L. tomentosus* Ladiz. ile 2 *Vicia montbretii* (Fish. & Mey) Davis ve Plitmann türü olmak üzere toplam 32 genotip kullanılmıştır. RGA, peroksidaz ve WRKY gen ailelerinin içerdiği korunmuş bölgelerden elde edilmiş dejenere primerler yardımıyla 32 genotipte PCR yöntemi kullanılarak polimorfik ve monomorfik bantlar elde edilmiştir. UPGMA dendogramları oluşturularak türler arası genetik ilişki belirlenmiştir.

Toplamda 123 RGA, 22 peroksidaz ve 10 WRKY primeri denenmiştir. Bunun sonucunda 103 RGA, 66 peroksidaz ve 52 WRKY bandı elde edilmiştir. RGA bantlarındaki polimorfizm oranı %83 iken türler arasındaki genetik benzerlik, 0.62 ile 0.90 arasındadır. Peroksidaz bantlarının %89'u polimorfik olup bu gen ailesi bakımından türler arası genetik benzerlik 0.13 ile 0.62 arasındadır. Gözlenen 52 WRKY bandının 47'si polimorfiktir ve polimorfizm oranı %90'dır. Genetik benzerlik ise 0.07 ile 0.63 arasındadır.

Sonuçlar göstermektedir ki gen aileleri biyotik ve abiyotik streslere karşı devamlı bir savunma mekanizması içindedir. Tüm genomun çalışıldığı polimorfizm ile kıyaslandığında bu gen aileleri daha hızlı bir evrimsel yol , . Bu çalışmada incelenen PCR tabanlı RGA, peroksidaz ve WRKY markırları ilerde mercimekte haritalama ve farklı gen ifadesi çalışmalarında kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELE: Mercimek, *Lens*, PCR, RGA, peroksidaz, WRKY, polimorfizm

JÜRİ: Prof. Dr. Cengiz TOKER (Danışman)

Doç. Dr. Nedim MUTLU

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

POLYMORPHISM OF RESISTANCE GENE ANALOGS, PEROXIDASE AND WRKY TRANSCRIPTION FACTORS GENE FAMILIES IN THE GENUS *Lens* MILLER

Duygu SARI

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz TOKER

June 2013, 82 pages

Resistance gene analogs (RGAs), peroxidases and WRKY transcription factors are multigene families that play roles in resistance to various biotic and abiotic stresses during evolution. In this study, the polymorphism of these gene families are determined in the genus *Lens* Miller and *Vicia montbretii* (Fish. & Mey) Davis ve Plitmann.

As genetic material, total of 32 genotypes of 7 lentil taxa including four accessions of *L. lamottei* Czeffr., four accessions of *L. nigricans* (M.Bieb.) Godr, four accessions of *L. odemensis* Ladiz., eleven accessions of *L. orientalis* (Boiss.) Ponert, three *L. tomentosus* Ladiz. and two accessions of *V. montbretii* were used. Specific degenerate primers were designed from conserved motifs of resistance gene analogs (RGAs), peroxidases and WRKY gene families were used with PCR to amplify targeted regions from genomic DNA of 32 genotypes and obtained monomorphic and polymorphic bands. Genetic similarity between species was determined using UPGMA dendograms.

123 RGA, 22 peroxidases and 10 WRKY primer combinations were tested and 103 RGA, 66 peroxidases and 52 WRKY bands screened. Polymorphism rate of RGAs was 83% and genetic similarity was between 0.62 and 0.90. On the other hand the polymorphism rate of peroxidase genes was 89%. The genetic similarity was between 0.13 and 0.62. In WRKY genes, 47 of the evaluated 52 bands were polymorphic and the polymorphism rate was 90%. The genetic similarity was between 0.07 and 0.63.

Results indicated that the gene families have evolved continuously in response to biotic/abiotic stresses. In the comparative analysis with the polymorphism of whole genome, it is apparent that the gene families have evolved at a faster rate than genome average. The results justify targeted gene families approach in studying evolution as compared to the use of random or anonymous loci. The PCR-based RGA, peroxidase, and WRKY markers described in this study may also have potential for linkage mapping and differential gene expression studies in lentils.

KEYWORDS: Lentil, *Lens*, PCR, RGA, peroxidase, WRKY, polymorphism

COMMITTEE: Prof. Dr. Cengiz TOKER (Supervisor)

Assoc. Prof. Dr. Nedim MUTLU

Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Bitkiler, içerisinde bulundukları ortamı diğer canlılarla (patojen ve simbiyontlar gibi) paylaşmak ve rekabet etmek zorundadır. Bunun içinde yaşadıkları alan ve şartlar ne olursa olsun, içinde bulundukları çevreyi tanıma ve o ortama adapte olma işlevini çeşitli moleküler ve fizyolojik olaylar sayesinde gerçekleştirmektedir. Bu evrimsel süreç içerisinde değişen patojen populasyonlarına ve farklı çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılığın sağlanabilmesi bitkilerin lokuslarında meydana getirilen çeşitlilik ile mümkündür.

RGA, peroksidazlar, WRKY transkripsiyon faktörleri gen ailelerinde meydana gelen duplikasyonlar ve rekombinasyonlar bitkilerin bu evrimsel ilişki içerisinde cansız ve biyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılık sağlanmasında oldukça önemlidir. Mercimekte bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla belirtilen bu gen ailelerinin organizasyonun ve evriminin araştırılması bitkilerde dayanıklılık genlerinin dinamiğinin anlaşılması için oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasının hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgi ve tecrübelerini paylaşan çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Cengiz TOKER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmaları sırasında bilgisi ve imkânlarıyla yardımlarını eksik etmeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Nedim MUTLU'ya, Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimine, laboratuvar çalışmalarım sırasındaki yardımları için Semra GÖNÜL'e, manevi yardımlarını daima hissettiğim arkadaşlarım Arş. Gör. Öncü CEYLAN BALOĞLU'na ve Arş. Gör. Begüm TÜTÜNCÜ'ye teşekkür ederim.

Sevgi ve desteklerini hayatım boyunca hissettiğim sevgili aileme, her zaman maddi ve manevi yönden yanımda olan Arş. Gör. Engin YOL'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	4
2.1. Mercimek (<i>Lens</i> Mill.) Cinsi ile İlgili Genel Bilgiler	4
2.2. Mercimek Taksonları ile İlgili Genel Bilgiler.....	6
2.3. Dayanıklılık Gen Analogları (RGA) ve Yapılan Çalışmalar	9
2.4. Peroksidaz Genleri ve Yapılan Çalışmalar	12
2.5. WRKY Transkripsiyon Faktörleri ve Yapılan Çalışmalar.....	18
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Materyal	21
3.1.1. Araştırma yeri.....	21
3.1.2. Deneme için kullanılan toprak analiz sonuçları	21
3.1.3. Bitki materyali.....	22
3.2. Metot	23
3.2.1. DNA izolasyonu	23
3.2.2. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	23
3.2.3. Primerlerin seçimi	24
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, polymerase chain reaction).....	27
3.2.5. Elektrolit çözeltisi	28
3.2.6. Jelin hazırlanması.....	28
3.2.7. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi	28
3.2.8. Bant fotoğraflarının elde edilmesi.....	29
3.2.9. Jelden DNA izolasyonu.....	29
3.2.10. Bantların değerlendirilmesi ve sekans analizleri.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. <i>Lens</i> Miller Cinsinde Dayanıklılık Gen Analogları (RGA)	30

4.2. <i>Lens</i> Miller Cinsinde Peroksidaz Genleri	38
4.3. <i>Lens</i> Miller Cinsinde WRKY Genleri.....	41
4.4. Sekans Analizleri	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrad derece
ml	Mililitre
µL	Mikrolitre
g	Gram
ng	Nanogram
M	Molar
Dk	Dakika
bp	Baz çifti
mm	Milimetre
cm	Santimetre

Kısaltmalar

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromid
POX	Peroksidaz
RGA	Dayanıklılık Gen Analogları
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi
PCA	Temel Bileşenler Analizi
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Dünyada ortalama mercimek üretim alanları (ha).....	8
Şekil 2.2.	Sınıf III bitki peroksidazlarının filogenisi	14
Şekil 2.3.	Hem peroksidazlar arasındaki filogenetik akrabalık	15
Şekil 4.1.	K03HD01 primer kombinasyonunu ait bant görüntüsü	31
Şekil 4.2.	K04HD01 primer kombinasyonunu ait bant görüntüsü	31
Şekil 4.3.	K10HD03 primer kombinasyonuna ait bant görüntüsü	33
Şekil 4.4.	S2INV/AS3INV primer kombinasyonuna ait bant görüntüsü.....	34
Şekil 4.5.	RGA markırları ile oluşturulan <i>Lens Mill.</i> ve <i>Vicia montbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki ağacı.....	35
Şekil 4.6.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA markırları ile oluşturulan <i>Lens Mill.</i> ve <i>Vicia montbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki	36
Şekil 4.7.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA markırları ile oluşturulan <i>Lens Mill.</i> ve <i>Vicia montbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki	37
Şekil 4.8.	POX3 primerine ait bant görüntüsü.....	40
Şekil 4.9.	Peroksidaz markırları ile oluşturulan <i>Lens Mill.</i> ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki ağacı.....	43
Şekil 4.10.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre peroksidaz markırları ile oluşturulan <i>Lens Mill.</i> ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki.....	44
Şekil 4.11.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre peroksidaz markırları ile oluşturulan <i>Lens Mill.</i> ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki.....	45
Şekil 4.12.	GII primerine ait bant görüntüsü.....	47

Şekil 4.13.	GIII primerine ait bant görüntüsü.....	47
Şekil 4.14.	WRKY markırları ile oluşturulan <i>Lens</i> Mill. ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki ağacı.....	48
Şekil 4.15.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre WRKY markırları ile oluşturulan <i>Lens</i> Mill. ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki.....	49
Şekil 4.16.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre WRKY markırları ile oluşturulan <i>Lens</i> Mill. ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki.....	50
Şekil 4.17.	RGA, peroksidaz ve WRKY markırlarının tümüyle oluşturulan <i>Lens</i> Mill. ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki ağacı.....	51
Şekil 4.18.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA, peroksidaz ve WRKY markırlarının tümüyle oluşturulan <i>Lens</i> Mill. ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki.....	52
Şekil 4.19.	Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA, peroksidaz ve WRKY markırlarının tümüyle oluşturulan <i>Lens</i> Mill. ve <i>Vicia monbretii</i> taksonlarına ait genetik ilişki.....	53
Şekil 4.20.	BLAST analizleri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Deneme için kullanılan toprak analiz sonuçları.....	21
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan genotipler.....	22
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan primerler ve baz .sıraları	24
Çizelge 4.1.	Seçilen RGA primerlerinin polimorfizm oranları	30
Çizelge 4.2.	RGA primerleri ile elde edilen bant sayısı ve uzunlukları.....	32
Çizelge 4.3.	Jeldeki bantların incelenmesi oluşan verilerin bir kısmı.....	38
Çizelge 4.4.	Peroksidaz primerleri ile elde edilen bant sayısı ve uzunlukları.....	39
Çizelge 4.5.	Seçilen WRKY primerlerinin polimorfizm oranları.....	41
Çizelge 4.6.	WRKY primerleri ile elde edilen bant sayısı ve uzunlukları.....	42
Çizelge 4.7.	Seçilen RGA, peroksidaz ve WRKY genlerinin BLAST analizleri...	55

1. GİRİŞ

Kültürü yapılan mercimek (*Lens culinaris* Medik.) bitkisi *Fabaceae* (*Leguminosae*) familyasının Faboideae (Papilionadiae) altfamilyasında ve *Lens* Miller cinsi içinde yer alan bir türdür. *Lens* Mill. cinsi *Vicia* L., *Lathyrus* L., *Pisum* L. ve *Vavilovia* A. Fedorov cinslerini içeren *Vicieae* Alef. oymağında yer almaktadır (Smart 1990, Redden vd 2007). Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) diploid, kendine döllen ve $2n=14$ kromozoma sahip bir baklagil bitkisidir. Ülkemizde Türk Standartları Enstitüsü Kurumuna (TSEK) göre ticareti yapılan kuru mercimekler dane rengi ve büyüklüğüne göre 3 grupta toplanır: (i) sultani (pul, yaprak), (ii) yeşil (sıra) ve (iii) kırmızı mercimekler (Şehirali 1988).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2011 yılı istatistiklerine göre mercimekler dünyada 4 169 382 ha alanda yetiştirilmekte ve 4 411 104 ton üretilmektedir. Ortalama dünya verimi 1058 kg/ha iken, ülkemizde hektara verim ortalaması 1890 kg kadardır. Ülkemizde 214 847 ha alanda tarımı yapılmakta ve 405 952 ton üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye Kanada ve Hindistan'dan sonra dünyada en fazla mercimek üreten ülkeler sıralamasında üçüncü sıradadır (FAOSTAT 2013).

Eskiden beş *Lens* cinsi olduğu bildirilmiştir (Davis 1970; Cubero 1981, Şehirali 1988). Daha sonra *Lens montbretii* türünün baklalar sınıfında yer alması gerektiği bildirilmiştir (Ladizinsky ve Şakar 1982). Günümüzde 7 tane takson belirlenmiştir: *Lens culinaris*, *Lens orientalis*, *Lens odemensis*, *Lens lamottei*, *Lens tomentosus*, *Lens ervoides*, *Lens nigricans*. Bunlardan *L. lamottei* ve *L. tomentosus* literatüre yeni kazandırılmış türlerdir (Redden vd 2007).

Stres faktörleri, orijinlerine göre canlı ve cansız stres faktörleri olmak üzere iki grupta incelenebilmektedir. Cansız stres faktörleri soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve toprakta besin yetersizliği gibi çevresel faktörlerdir. Canlı stres faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlardır (Mahajan ve Tuteja 2005). Mercimek üretimi yapılan alanlarda verimi sınırlayan en önemli cansız stresler, kuraklık ve yüksek sıcaklık, tuzluluk ve demir elementi eksikliği, canlı stresler ise *Ascochyta lentis*, *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Uromyces fabae* olarak verilmiştir (Muehlbauer ve Kaiser 1994). Bitkilerin stres altındaki reaksiyonları ve strese dayanıklılık mekanizmaları pratikte büyük önem taşımaktadır. Tarımsal üretim stres koşulları altında azaldığından strese dayanıklı bitki türlerine dair çalışmaların artırılması gerekmektedir (Opik ve Rolfe 2005). Bitki çeşitleri ve değişik bitki grupları içerisinde tolerans mekanizmalarında farklılıklar görülmektedir. Bu durum bitkilerin stres toleranslarının geliştirilmesinde son derece önemlidir (Rao vd 2006).

Bitkilerde patojenlere karşı dayanıklılık patojen Avr (avirülans) gen lokusu ve bitki dayanıklılık gen (R) lokusundaki bir allel arasındaki spesifik bir interaksiyon ile kontrol edilmektedir (Dangl ve Jones 2001). Konukçu bitkideki R geni ve patojenin Avr geni arasındaki bu eşleşme gen-gen hipotezi olarak ifade edilmektedir (Flor 1971).

Konukçu bitkinin patojeni tanınması ve sonrasında savunma yanıtlarını oluşturması karmaşık, dinamik ve etkileşimli bir moleküler olaylar zinciridir. Bu

moleküler yanıtlar çok sayıda farklı genin up ve down regülasyonu ile bağlantılıdır. Gen-gen etkileşiminde patojen popülasyonlarının hastalık yapıcı karakteristiklerindeki ani değişimler bitkideki dayanıklılık genlerinin etkinliği için devamlı bir tehlike oluşturmaktadır. Sonuç olarak, türlerin evrimsel süreçte hayatta kalma mücadelesi dayanıklılık lokuslarını koruma ve burada kullanışlı bir çeşitlilik meydana getirme yeteneğine bağlıdır. Bu yüzden bitki türlerinde R genlerinin evrimi ve çeşitliliği analizleri bitkide devamlı bir dayanıklılığın meydana getirilmesinde oldukça önemli bir yerdedir (van der Hoorn vd 2002, van der Vossen vd 2003, McDowell ve Simon 2006, Rose vd 2007, Yang vd 2008).

Stres faktörleri, süperoksit anyonları (O_2^-), hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinde (ROS) artmaya yol açarak bitkilerde oksidatif strese neden olmaktadır (Prasad vd 1994, Shen vd 1999). Bitki hücreleri oksidatif stresin etkilerini azaltan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) gibi ROS enzimleri ve glutatyon, askorbat ve serotenoid gibi antioksidanları içeren kompleks bir savunma mekanizması geliştirmiştir (Lee ve Lee 2000). Peroksidazlar (POD, E.C:1.11.1.7), hidrojen atomlarını vermek eğiliminde olan bileşikler ile bu atomları alıcı durumunda olan H_2O_2 bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen oksidoredüktazlardır (Adams 1978; Whitaker 1994). Bitki peroksidazları bir çoklu gen ailesine ait olup patojen bulaşması, böcek toleransı, tuz toleransı, oksin degradasyonu, hücre duvarı lignifikasyonu, doku süberinleşmesi ve bitki senesensi gibi birçok strese bağlı interaksyonda önemli rol oynamaktadır (Hinman ve Lang 1965, Espelie vd 1986, Amaya vd 1999, Chittoor vd 1999, Passardi vd 2005, Gulsen vd 2010a). Bitkiler stres faktörlerine maruz kaldıklarında peroksidaz enzimleri reaktif oksijen türlerinin birikimini azaltmakta ve oksidasyon ürünlerini parçalamaktadır (Willekens vd 1994, Schenk vd 2000). Dayanıklı genotiplerin peroksidaz aktivitesinin derecesini arttırdıkları ve bunun sonucu olarak da serbest radikallerin ve peroksitlerin zararlı etkilerini azaltabildikleri bunun yanında hassas bitkilerin ise bu bileşenleri detoksifiye edebilme yeteneklerinin olmadığı bildirilmiştir (Hildebrand vd 1986, Heng-Moss vd 2004, Gutsche vd 2009). Yüksek dayanıklılık gücü ya daha üst düzeyde bir peroksidaz upregulasyonu ya da daha hassas bir upregulasyon yanıtına sahip olmayı gerektirmektedir.

Strese duyarlı ve toleranslı genlerin indüklenmesi bitkilerin olumsuz çevre koşullarına uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır (Matsui vd 2008). Stresle ilişkili genlerin indüksiyonu temel olarak transkripsiyonel seviyede görülmektedir. Transkripsiyon faktörleri sekansa özgü DNA bağlama yapısı sergilemektedir ve hedef genlerin transkripsiyonu aktive etme veya inhibe etme yeteneğindedir. WRKY genleri düzenleyici proteinlerin en geniş ailesini kodlayan transkripsiyon faktörlerinden biridir (Eulgem ve Somssich 2007). Bitkilerde canlı ve cansız stres faktörlerine karşı oluşturulan fizyolojik yanıtlar, senesens ve bundan başka tüy ve tohum kabuğu gelişimi, sekonder metabolitlerin biyosentezi gibi olayları düzenleyen bitkiye özgün transkripsiyonel faktörlerinin bir ailesini kodlamaktadır (de Pater vd 1996, Gus-Mayer vd 1998, Dellagi vd 2000, Hara vd 2000, Alexandrova ve Conger 2002, Deslandes vd 2002, Huang ve Duman 2002, Kim vd 2000, Pnueli vd 2002, Schenk vd 2000, Yoda vd 2002).

Görüldüğü gibi bitkiler, içerisinde bulundukları ortamı diğer canlılarla (patojen ve simbiyontlar gibi) paylaşmak ve hatta onlarla zaman zaman rekabet etmek

zorundadır. Bunun içinde yaşadıkları alan ve şartlar ne olursa olsun, içinde bulundukları çevreyi tanıma ve o ortama adapte olma işlevini çeşitli moleküler ve fizyolojik olaylar sayesinde gerçekleştirmektedirler (Tör 1998). Bu evrimsel süreç içerisinde değişen patojen popülasyonlarına ve farklı çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılığın sağlanabilmesi bitkilerin lokuslarında meydana getirilen çeşitlilik ile mümkündür. RGA, peroksidazlar, WRKY transkripsiyon faktörleri gen ailelerinde meydana gelen duplikasyonlar ve rekombinasyonlar bitkilerin bu evrimsel ilişki içerisinde canlı ve cansız stres faktörlerine karşı dayanıklılık sağlanmasında oldukça önemlidir. Dolayısıyla belirtilen bu gen ailelerinin organizasyonun ve evriminin araştırılması bitkilerde dayanıklılık genlerinin dinamiğinin anlaşılması için oldukça önemlidir. Yapılan bu tez çalışmada, bu gen ailelerinin evrimsel dinamiklerinin anlaşılması aynı zamanda evrimsel hızının genomun diğer kısımlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Mercimek (*Lens* Mill.) Cinsi İle İlgili Genel Bilgiler

Mercimek insanoğlunun ilk kültüre aldığı bitkilerden biridir. Yeryüzünde tarımın başlaması ile birlikte mercimek tarımının başladığı kabul edilmektedir. Mercimeğin orjininin ve ilk kültüre alındığı yerin verimli hilal denilen Mezopotamya ve güney Türkiye olduğu tahmin edilmektedir (Zohary 1972). Bu bölgeden Mısır, Yunanistan ve Avrupa'ya yayılmıştır (Sandhu ve Singh 2007). Tarımın başlangıcında Akdeniz Havzası boyunca baklagillerin yaygın kullanımı atalarının yayılışından ve kültür formlarına dönüşümün gerçekleştiği bölgelerdeki varyetelerinden kaynaklanmaktadır. Bölgesel uyum artan bir şekilde *L. culinaris* türleri içinde çeşitlilik meydana getirmiştir (Erskine 1997).

Mercimek adını kültürü yapılan mercimeğin (*Lens culinaris* Medik.) tohumunun lens şekline benzemesinden almıştır. Tohum yuvarlak ve merkeze doğru şişkindir. Mercimeğin adı alman botanikçi Medicus tarafından 1787 yılında verilmiştir (Cubero 1981). Eskiden beş *Lens* cinsi olduğu bildirilmiştir (Davis 1970, Cubero 1981, Şehirali 1988). Daha sonra *Lens montbretii* (Fish. & Mey) Davis ve Plitmann türünün baklalar sınıfında yer alması gerektiği bildirilmiştir (Ladizinsky ve Şakar 1982). Günümüzde 7 tane taxon belirlenmiştir: *Lens culinaris* Medik., *L. orientalis* (Boiss.) Ponert, *L. odemensis* Ladiz., *L. lamottei* Czefr., *L. tomentosus* Ladiz., *L. ervoides* (Brign.) Grande ve *L. nigricans* (M. Bieb.) Godron. Bunlardan *L. lamottei* ve *L. tomentosus* literatüre yeni kazandırılmış türlerdir (Redden vd 2007, Toker vd 2007).

Mercimek aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

Takım:	<i>Fabales</i>
Familya:	<i>Fabaceae</i>
Al familya:	<i>Faboideae</i>
Oymak:	<i>Vicieae</i> Alef.
Cins:	<i>Lens</i> Miller
Tür:	<i>Lens culinaris</i> Medicus

Cubero (1981) tarafından bildirildiğine göre, kültürü yapılan mercimeklerde ilk sınıflandırma Alefeld (1866) tarafından morfolojik görünüşleri dikkate alınarak yapılmıştır. Barulina (1930) kültürü yapılan mercimekleri sınıflandırırken, mercimeklerin coğrafi dağılımlarını dikkate almıştır. Daha sonra Cubero (1981), Barulina'nın sınıflandırdığı sistemde yer alan alt türleri, bir alt tür değil ırk olduğunu bildirilmiştir. Ladizinsky ve Şakar (1982), *Lens montbretii* türünün bir mercimek olmadığını savunmuşlardır. İki tür arasında morfolojik farklılıklar yanı sıra karyolojik farklılıklar da mevcuttur. En farklı özellik ise kromozom sayısının diğer mercimeklerde $2n=14$ olmasına rağmen, *Lens montbretii*'de kromozom sayısı $2n=12$ olarak bildirilmiştir. Bu nedenle, araştırmacılar *Lens montbretii*'nin bir bakla olduğunu ve *Vicia montbretti* olarak sınıflandırılması gerektiğini rapor etmişlerdir.

Günümüzde Mercimek cinsinin (*Lens* Mill.) yaygın olarak kabul gören sınıflandırılması aşağıda verilmiştir (Ferguson vd 2000):

Lens culinaris Medik.

- subsp. *culinaris*
- subsp. *orientalis* (Boiss.) Ponert
- subsp. *tomentosus* (Ladiz.) M.E.Ferguson vd
- subsp. *odemensis* (Ladiz.) M.E.Ferguson vd

L. ervoides (Brign.) Grande

L. nigricans (M.Bieb.) Godr.

L. lamottei Czefr.

V. montbretii türü de dahil 7 mercimek taksonu ile yapılan son çalışmada mercimek taksonları arasındaki filogenetik ilişki aşağıdaki gibidir (Özügür 2011):

Lens culinaris Medik.

- subsp. *orientalis* (Boiss.) Ponert
- subsp. *culinaris* Medik.
- subsp. *tomentosus* Ladiz.
- subsp. *odemensis* Ladiz.

L. ervoides (Brign.) Grande

L. lamottei Czefr.

L. nigricans (M.Bieb.) Godr

Ladizinsky (1979a) *Lens culinaris*, *L. orientalis* ve *L. nigricans* türleri arasında melezlemeler yapmıştır. *L. orientalis* x *L. culinaris* melezlemesi melez tohum vermiştir ve F₂ generasyonu büyüme habitusu, çiçek rengi, baklada çatlama ve dene rengine göre açılmalar olmuştur. *Lens culinaris* ve *L. nigricans* melezleri de normal olarak gelişmişlerdir. Cubero (1981) bu sonuçların *Lens orientalis*'in kültürü yapılan mercimeğin bir alt türü olabileceğini bildirmiştir. Ladizinsky (1979b) *Lens culinaris* ve *L. ervoides* melezlerinden döl verir bitki elde edememiştir.

Mercimek kazık köklü bir bitkidir fakat yan kökler de oldukça gelişmiştir. Nemli ve alüvyal topraklarda kök sistemi yüzeysel olarak kalırken hafif ve su oranı düşük topraklarda daha derine gitmektedir. Çimlenmeden 12-15 gün sonra ana kökün etrafında ve yüzeye yakın yan köklerin üzerinde küçük, yuvarlak veya silindirik birçok nodül görülür, çiçeklenmeden sonra sayıları azalmaya başlar.

Mercimeğin otsu gövdesi oldukça zayıf, ince ve enine kesiti kare şeklindedir. Bitki gelişmesi ilerledikçe sapın dip kısmı odunlaşır. Bitki boyu çevre koşulları ve genotipe bağlı olarak 15-75 cm arasında değişir. Mercimek bitkisi oldukça fazla dallanır ve çoğu zaman ana dal yan dallardan ayırt edilemez. Bununla birlikte genotipten genotipe farklılık gösterir ve çevreden büyük ölçüde etkilenir. Dallanma ekim sıklığı ile yakından ilgilidir, dar ekimlerde dallanma azalırken geniş ekim mesafelerinde dallanma artmaktadır (Saxena 2009).

Wilson ve Teare (1972)'nin bildirdiğine göre küçük taneli mercimek çeşitleri 15x1.5 cm ekim mesafesinde ortalama 4.2 dallı olurken, 30x6 cm ekim mesafesinde ortalama 75.3 dallanma olmaktadır. Mercimekte dallanma istenen bir özelliktir, dal sayısı arttıkça bitkide bakla sayısı artmakta ve sonuçta verim yüksek olmaktadır.

Mercimek yaprakları 1-8 çift yaprakçıktan oluşan bileşik yaprak tipindedir ve gövdeye almaşıklı olarak dizilir. Yaprak sapları kısadır, yaprak eksenini uzunluğu 1-4.5 cm arasında değişir. Yaprak eksenini özellikle üst yapraklarda genellikle sülükle sonuçlanır. Yaprak kenarları düz olup, yaprakçık sayısı genotiplere ve yaprağın bulunduğu boğuma göre farklılık gösterir (Saxena 2009).

Çiçekler yaprak koltuklarından çıkan salkımda bulunur. Salkım sapı 2.5-5 cm uzunluğundadır. Çiçek sapları kısadır. Bitkide 10-150 arasında salkım bulunur (Malhotra vd 1974). Her salkımda normal olarak 1-4 çiçek bulunur. Çiçekler küçük, bayrak yaprak beyaz, açık morumsu, mavi veya beyaz olabilir. Kanatçık ve kayıkçıklar genellikle beyazdır. Kaliks tüpü dip kısmından beş parçaya bölünür. Erkek organlar diadelphustur (9+1) yani diadelphustur. Mercimek kendine döllenir ancak % 0.8 yabancı döllendiği tahmin edilmektedir (Wilson ve Law 1972)

2.2. Mercimek Taksonları İle İlgili Genel Bilgiler

Günümüzde 7 tane mercimek taxonu belirlenmiştir: *Lens culinaris*, *L. orientalis*, *L. odemensis*, *L. lamottei*, *L. tomentosus*, *L. ervoides*, *L. nigricans*. Bu taksonlarının benzer ve farklı özellikleri aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir;

***Lens culinaris* Medicus:** Tek yıllık, ince, hemen hemen dik bir gövdeye sahiptir. Bitki 15-75 cm. boyunda, hafif yada çok tüylü olabilir. Yapraklar 10-16 yaprakçıklı, üst yapraklar basit veya nadiren dallı sülüklüdür. Yaprakçıklar oval veya lineer eliptik şekillidirler. Yaprakçıkların boyu 12-15 (20) mm, ortalama 7 mm ve eni 3-4 (8) mm ortalama 1.5 mm. Kulakçıklar, mızrak şeklinde ve uzunlukları 5-6 mm kadardır. Çiçek sapı, 1-3 (4) çiçek taşır. Çiçekler küçük, 5-7 mm uzunluğunda ve çiçek renkleri beyazdan maviye kadar değişir. Baklalar, tüysüz bazen tüylü yamuk dikdörtgen şekilli ve yanlardan basık görünümlüdür. 6-20 x 4- 12 mm boyutundadır. Baklalar 1-2 (3) dene içerir. Deneler, 3-9 mm çapında değişik renklerde (gri, kahverengi, siyah, yeşil, kırmızımsı ve bahsedilen renkler üzerinde benekli şekilde), mercimek şeklindedir. (Cubero 1981).

***Lens ervoides* (Brign.) Grande:** Tek yıllık, ince, yarı yatık, çok dallanan, fideleri mor renkli 10-30 cm boyundadır. Hafif tüylüdür. Yapraklar 2-4 çift yaprakçıklı, yaprak sapı 6-10 mm uzunluğunda, üst kısımdakiler de kısa ve basit bir sülük vardır. Alt yaprakçıklar oval, üst yaprakçıklar uzun-eliptik şekillidir. Kulakçıklar, bitkinin alt kısmında yarım üçgen ve üst kısmında mızrak şeklinde, 5-6 mm uzunluğundadırlar. Çiçek sapı, 1 (2) çiçek taşır. Çiçekler küçük, 4-6 mm uzunluğunda ve çiçek renkleri mavi-menekşe renginde ve kayıkçık beyazımsıdır. Baklalar, hafif tüylü, 8-11 x 3.5-5 mm dikdörtgen şekilli ve yanlardan basık görünümlüdür. Baklalar 1-3 dene içerir, küçük, kahverengi-kırmızımsı, ebruludur. (Cubero 1981).

***Lens nigricans* (Bieb.) Godron:** Tek yıllık, ince, dallanan, 10-30 cm boyundadır. Bitki fark edilir bir şekilde tüylüdür. Yapraklar, 3-4 (5) çift yaprakçıklı, ortalama 2 çift yaprakçıklı, yapraklar sülüksüz yada üst kısımlarda basit bir sülükle sonuçlanır. Yaprakçıklar, alt kısımda kısa oval ve üst kısımda uzun eliptik şekillidirler. Kulakçıklar, dişli, yarım üçgen şeklinde 5-6 mm'dir. Çiçek sapı, 1-2 çiçek taşır. Çiçekler küçük, 4-7 mm uzunluğunda ve mavi renklidir. Baklalar, dikdörtgen şekilli,

yanlardan basık görünümlü ve 9-12 x 4-6 mm. ve 2 dene içerir. Daneler, küçük, düz, kahverengidir. (Cubero 1981).

***Lens orientalis* (Boiss.) Ponert:** Tek yıllık, çok dallanan, yarı dik 15-20 cm boyunda ve fideleri mor renklidir. Orta derecede tüylüdür. Fakat Filistin ve Suriye'den bazı örnekler çok tüylüdür. Yapraklar, 3-6 çift yaprakçıklı ve yaprak sapı $\pm$ 2 cm uzunluğunda, üst kısmı bir sülükle son bulur. Yaprakçıklar; 5-14 x 2-3.5 ortalama 1 mm, oval ya da eliptik şekillidirler. Kulakçıklar, yumurta-mızrak şekillidir. Çiçek sapı, genellikle kısa kılçıklı ve 1-2 çiçek taşır. Çiçekler küçük, 4-6 mm uzunluğunda ve mor-mavi, kayıkcık beyazımsıdır. Baklalar, 9-12 x 4-6 mm, dikdörtgene benzer şekilli, yanlardan basık görünümlüdür ve 2 dene içerir. Deneler, küçük, kahverengi-kırmızımsı, mermer şekilli ya da siyah renkli ve 2.5-3.5 x 2 mm boyutundadır. Bu tür kültürü yapılan mercimeğin olası ilkel formu olarak bildirilmiştir (Cubero 1981, Ladizinsky 1993).

***Lens odemensis* Ladizinsky:** Tek yıllıktır. Yapraklar, 3-4 çift yaprakçıklı ve yaprak eksenini 8-20 mm uzunluğunda, yapraklar mucronate ya da üst kısım bir sülükle son bulur. Kulakçıklarda belli belirsiz diş var. Çiçekler küçük ve mor-mavi, kayıkcık beyazımsıdır. Calyx dişlerinin corollaya oranı birbirine eşittir. Çiçek sapının ucunda çıkıntı vardır. Çiçek sapının yaprak eksenine oranı birden (>1) büyüktür. Baklalar küçük dikdörtgene benzer şekilli, yanlardan basık görünümlüdür. Baklalar tüysüzdür. Deneler, küçük, kahverengi-kırmızımsı, mermer şekilli ya da siyah renkli ve 2.5-3.5 boyutundadır (Ladizinsky 1993, Ferguson vd 2000).

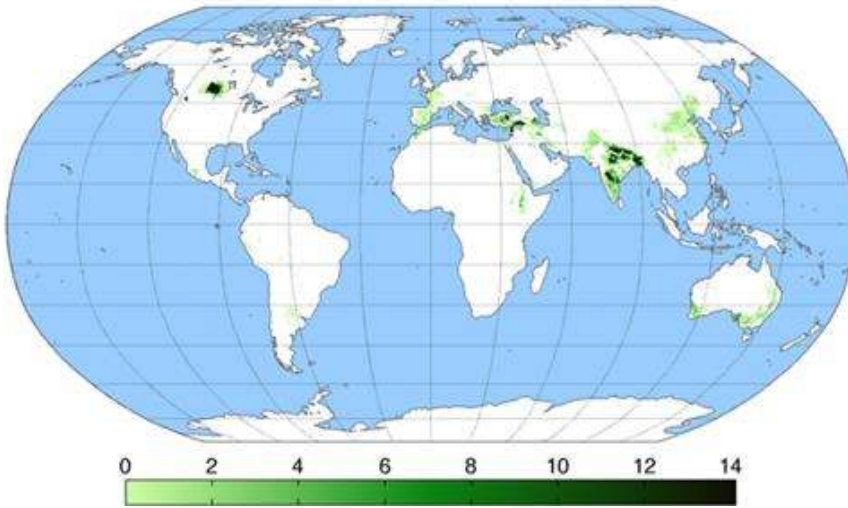
***Lens lamottei* Czefranova:** Tek yıllıktır. Yapraklar 6-10 adet yaprakçıktan meydana gelmiş ve yaprak eksenini 7-10 mm uzunluğunda, yapraklar mucronate ya da üst kısım bir sülükle son bulur. Yaprakçıklar; oval ya da eliptik şekillidirler. Kulakçıklar 'V' şeklinde dişlidir. Çiçek sapının ucunda bir çıkıntı vardır. Çiçek sapı, genellikle kısadır. Bu tür *L. ervoides* türünün bir alt türü olarak tanıtılmıştır (Czefranova 1971). Calyx dişlerinin corollaya oranı ve çiçek sapının yaprak eksenine oranı birden (>1) büyüktür. Çiçekler küçük ve mor-mavi, kayıkcık beyazımsıdır. Baklalar tüysüzdür. Baklalar, dikdörtgene benzer şekilli, yanlardan basık görünümlüdür. Deneler, küçük, kahverengi-kırmızımsı, mermer şekilli ya da siyah renkli ve 2.5-3.5 mm boyutundadır. (Ferguson vd 2000).

***Lens tomentosus* Ladizinsky:** Tek yıllıktır. Yapraklar, 3-6 çift yaprakçıklı ve yaprak eksenini 7-20 mm uzunluğundadır. Yaprakçıklar oval ya da eliptik şekillidirler. Kulakçıklar dişli değil mızrak şekillidir. Çiçek sapında bir uzantı vardır. Çiçek sapı, genellikle kısa kılçıklı ve 1-2 çiçek taşır. Çiçekler küçük ve mor-mavi, kayıkcık beyazımsıdır. Calyx dişlerinin corollaya oranı birden (>1) büyüktür. Çiçek sapının yaprak eksenine oranı da birden büyüktür. Baklalar, tomentose'dır. Baklaların dikdörtgene benzer şekilleri vardır ve yanlardan basıktır. Deneler, küçük, kahverengi-kırmızımsı, mermer şekilli ya da siyah renkli ve 2.5-3.5 mm boyutundadır. Bu tür *L. orientalis* türünden baklalarındaki mat ve donuk tüyler ile ayırt edilmektedir (Ladizinsky 1997, Ferguson vd 2000)

***Vicia montbretii* (Fish. & Mey) Davis ve Plitmann:** Tek yıllık, yatık, 15-20 cm boyunda, oldukça tüylü, 12-30 yaprakçıklı, yaprakçıklar uzun, dallanmış sülükle sonuçlanır. Yaprakçıklar oval veya uzun, 6-12 x 2.5-4 mm boyutlarındadır. Salkımda 1-

2 çiçek bulunur, tomurcuklar tüylüdür. Baklalar 16-20 x 6-7 mm ebatlarında tüylüdür ve her baklada 2 tohum bulunur. Tohumlar oval, büyük ve siyahtır. (Cubero 1981).

Mercimek insanoğlunun ilk kültüre aldığı baklagillerden biridir. Yeryüzünde tarımın başlaması ile birlikte mercimek tarımının başladığı kabul edilmektedir. Arkeolojik kazılarda en eski mercimek kalıntılarını Suriye’de M.Ö. 7500-8500 yıllarında rastlanmıştır. Güney Türkiye ile birlikte bu bölgede M.Ö. 7000 yıllarına ait kalıntılar tespit edilmiştir. Bu bulgulara dayanılarak mercimeğin orjininin ve ilk kültüre alındığı yerin verimli hilal denilen Mezopotamya ve güney Türkiye olduğu tahmin edilmektedir. Bu bölgeden Mısır, Yunanistan ve Avrupa ve Asya’nın merkezine yayılmıştır (Sandhu ve Singh 2007). Mercimek kültürünün Pakistan’a ve kuzeybatı Hindistan’a yayılması ise Milattan önce 2250 ve 1750 yılları arasında olmuştur. Milattan sonra 1500 yıllarından sonra İspanyollar mercimeği Şili üzerinden Güney Amerika’ya tanıtmışlardır. Mercimek son zamanlarda ise Meksika, Kanada, Amerika ve Avustralya’ya tanıtılmıştır. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi günümüzde neredeyse dünyadaki mercimek ekim alanının (% 48.2) yarısı Güney Asya ülkelerindedir (Erksine 1997, Ferguson vd 1998).



Şekil 2.1. Dünyada ortalama mercimek üretim alanları (ha)

Ülkemizde hızlı nüfus artışı ve özellikle kırsal kesimlerdeki hayvancılığın giderek yok olması en önemli protein kaynağı olan hayvansal ürünlerin fiyatlarının artmasına neden olmuş ve gelir dağılımındaki dengesizlik sebebiyle de halkın büyük çoğunluğu beslenmede baklagillere yönelmiştir. Ülkemizde hayvansal protein tüketimindeki yetersizlikler dikkate alındığında mercimek, tane kısmında % 22-35 ve diğer kısımlarında ise % 4-5 protein içermesi nedeniyle insan ve hayvan beslenmesinde büyük bir önem kazanmıştır (Nath ve Nath 1965, Mital vd 1975, Bhatti vd 1976).

Ayrıca mercimek tohumunun saklanması hayvansal proteinlere göre daha kolaydır. Mercimek yüksek oranda B grubu vitaminleri, demir, fosfor, kalsiyum ve magnezyum gibi madensel maddeleri içermesi nedeniyle de beslenme açısından önemli bir yer tutmaktadır (Summerfield 1985).

Mercimek, diğer baklagil bitkileri gibi toprakta bulunan *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bakterileri sayesinde havanın serbest azotunu kökleri yardımıyla toprağa fıkse ederek, toprağın azotça zenginleşmesini sağlamaktadır.

Dünyadaki toplam mercimek ekim alanı (yaklaşık 48 ülkede) 4 169 382 hektardır (FAO 2011). Bunun % 58'i Asya ülkelerinde, % 37'si batı Asya ve Kuzey Afrika ülkelerinde yetiştirilmektedir (Galasso vd 2001, Rubenna vd 2003, Furman ve Baum 2006, Muehlbauer 2006). Ülkemiz mercimek dış ticaretinde 1994 yılına kadar dış satım yaparken, bu yıldan itibaren üretimdeki politik desteklerin zaltması, önemli ekim alanlarının olduğu GAP bölgesinde sulanan bitkilerin tercih edilmesi, istikrarsızlık, çevresel ve coğrafi nedenlerden dolayı ekim alanlarının azalması, bilinçsiz tarım, çevre kirliliğı, kaynakların dengesiz kullanımı, genel sosyo-ekonomik politikalar ve baklagillerdeki canlı ve cansız faktörlerden dolayı meydana gelen kayıplar sebebi ile hem dıştan alım hem de dış satım yapan ülke durumuna gelmiştir. Özellikle yeşil mercimekte 1980'li yıllara göre 1999 yılına gelindiğinde ekim alanlarındaki % 65'lik azalma ile birlikte dış satımda ülkemiz pazar payını Kanada'ya kaptırılmıştır. Türkiye'nin 1994 yılı verilerine göre mercimek üretimi toplam 610 000 ton iken 2012 verilerine göre ise 438 000 tona gerilemiştir. Buna rağmen mercimek üretimi nohuttan sonra ikinci sırayı almaktadır (TUİK 2012). İstatistiklerden de anlaşılacağı gibi mercimek ülkemiz için önemli bir besin kaynağı olmasına rağmen son yıllarda üretimimiz önemli miktarda gerilemiştir.

Üretim ve ihracatta görülen bu düşüşü durdurmak ve tekrar dünya pazarında lider konumuna gelebilmek için hastalıklara ve zararlılara dayanıklı standart çeşitler ıslah edilmelidir. Bitki ıslahı programında gen kaynaklarının etkin bir biçimde kullanılabilmesi için ilk şart gen kaynaklarındaki ve kültür hatlarındaki genetik çeşitliliğin tespit edilmesidir. Bu çeşitliliğin tespit edilmesinde morfolojik, biyokimyasal ve DNA işaretleyicileri yaygın olarak kullanılmaktadır (Eujayl vd 1997, Rubenna vd 2003).

2.3. Dayanıklılık Gen Analogları (RGA) ve Yapılan Çalışmalar

Bitki zararlılarına karşı dayanıklılık sağlayan birçok dayanıklılık (R) geni çeşitli türlerden izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Bent 1996, Hammond-Kosack ve Jones 1997). Bu genlerin ürünleri bitki savunması sırasında ortaya çıkan belirli sinyal olaylarının gerçekleşmesini kapsayan ve yüksek oranda yapısal benzerlikler taşıyan proteinlerdir (Baker vd 1997). Aminosit sekans benzerliklerine göre dayanıklılık genleri tahmini fonksiyonlarını temsil eden sınıflara ayrılmaktadır. Bitki dayanıklılık genlerinin çoğu nükleotid bağlama bölgeleri ve lösince zengin tekrarlar (nücleotide binding site-leucine rich repeat-NBS-LRR) olarak tanımlanan bir aileye dahildir (Bai vd 2002, Cannon vd 2002, Meyers vd 2003, Micheltmore ve Meyers 1998). NBS-LRR sınıfı patojen saldırısına yanıtı kapsayan sinyal transdüksiyon yolunda reseptör olarak rol oynamaktadır. Bu genlerin ürünlerin hepsi karakteristik bir nükleotid-bağlama bölgesi (NBS) içermektedir (Saraste vd 1990, Traut 1994). Bu proteinlerin C-terminal bölgeleri değişken sayılı lösün bakımından zengin tekrarlı dizilerden (LRRs) oluşmaktadır. NBS-LRR genleri ürünlerinin N-terminal bölgelerindeki korunmuş motiflere göre iki alt sınıfa ayrılmaktadır (Hulbert vd 2001, Meyers vd 1999). İlk grup, korunmuş leucine-zipper-like kalıbı (NonTIR) kodlayan genlerden oluşur. Non-TIR NBS-LRR'ler genellikle N terminal bölgelerinde sarmal bir yapıya sahiptir ve bundan dolayı CC-

NBS-LRRs olarak isimlendirilir (Dangl ve Jones 2001). Bu gruba domatesten kök-ur nematoduna dayanıklılık sağlayan *Mi* geni (Milligan vd 1998), *Arabidopsis*'de *Pseudomonas syringae* bakterisine dayanıklılık genleri RPS2 ve RPM1 (Bent vd 1994, Grant vd 1995), ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye dayanıklılık sağlayan I2 geni (Simons vd 1998) örnek verilebilir. İkinci grup; ürünleri insanda interleukin-1 ve *Drosophila* Toll benzeri reseptör bölgelerine (TIR) homolog olan bir yapı bulunduran genlerden oluşmaktadır (Staskawicz vd 1995, Hammond-Kosack ve Jones 1997). Bu gruba örnek olarak tütün mozaik virüsüne dayanıklılık sağlayan N geni (Whitham vd 1996) ve ketende pasa dayanıklılık sağlayan L6 ve M genleri (Lawrence vd 1995, Anderson vd 1997) verilebilmektedir. Bu genlerin NBS sekansı çok sayıda korunmuş bölgenin varlığı ile karakterize edilmektedir (Meyers vd 1999). Bunlardan P-loop (kinase-1a) ve kinase-2 domainleri adenozintrifosfat ve guanozintrifosfat bağlayıcı proteinlerin her ikisinde de bulunmaktadır (Saraste vd 1990). Kinase-3a ve Gly-Leu-Pro-Leu (GLPL, hidrofobik kısım) NBS bölgesinde bulunan diğer motiflerden olup bunlar membranı saran domainlerdir (membran spanning). Bu korunmuş motifler NBS benzeri sekansları oligonükleotid primerler kullanılarak PCR teknikleri ile diğer bitkilerden izole etme imkanı sunmaktadır. PCR ürünleri bilinen R genlerine yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu yüzden dayanıklılık gen analogları (RGA) olarak tanımlanmaktadır. Mevcut bilgilerin varlığında NBS-RGA'ların fonksiyonel rolü özellikle zararlılara karşı dayanıklılık sağlama amaçlıdır (Bertioli vd 2003, Di Gaspero ve Cipriani 2003). RGA'lar bitki genomlarında yaygın bir dağılım göstermektedir. Bunların bolluğu yanında yüksek orvea polimorfizm içermeleri bu bölgelerin ideal bir moleküler markır olarak kullanılmalarına olanak vermektedir (Quint vd 2002). RGA'lar sıklıkla R genlerini içeren genomik bölgelerde bulunur. Bu yüzden, hedef R genlerini klonlamak için etkili birer araçtır (Aarts vd 1998, Dodds vd 2001).

Korunmuş aminoasit sekanslarına göre yapılan sınıflandırmada en geniş R geni ailesini oluşturan NBS-LRR sınıfı dışında hücreler arası serine/treonin protein kinaz (PK) genleri (örneğin *Lycopersicon esculentum* pto geni ve *Hordeum vulgare* Rpg1 geni), tek bir transmembran bölgesi ve kısa bir sitoplazmik karboksil ucu barındıran ve hücrelerarası alıcı proteinleri kodlayan LRR-TM genleri (*Lycopersicon pimpinellifolium* Cf-2, Cf-4, Cf-5 ve Cf-9 genleri), tek bir transmembran bölgesi ve sitoplazmik kinaz domaini ile hücrelerarası proteinleri kodlayan PK-LRR-TM genleri (*Oryza sativa* Xa-21 geni ve *Arabidopsis thaliana* FLS2 geni) ve hücre içi proteinleri kodlayan ve sinyal noktası ve coiled-coil domaini bulunduran SA-CC genleri (*Arabidopsis thaliana* RPW8.2 ve RPW8 genleri) diğer R geni ailelerindendir.

Bitki dayanıklılık genleri birçok monokotil ve dikotil bitkide klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Hammond-Kosack ve Jones 1997). Bakteriyal, fungal ve viral patojenlere, afid ve nematod zararlılarına dayanıklılık sağlayan NBS-LRR gen bölgeleri *Arabidopsis thaliana* (Bent vd 1994; Grant vd 1995), keten (Lawrence vd 1995), tütün (Whitham vd 1994), domates (Milligan vd 1998), ve çeltik (Yoshimura vd 1998) gibi birçok bitkiden klonlanmıştır.

NBS sekansları içindeki korunmuş bölgeler temel alınarak R geni sekanslarını izole etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayanan yaklaşımlar üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Leister vd 1996, Kanazin vd 1996). Grant vd (1995) tarafından tanımlanmış olan P-loop ve korunmuş domain (conserved domain 2-CD2) motiflerine bağlanan oligonükleotid primerlerin kullanımı ile patates (Leister vd 1996), soya (Kanazin vd 1996), arpa ve pirinç (Leister vd 1998), buğday ve arpa (Seah

vd 1998), *A. thaliana* (Aarts vd 1998) gibi pek çok bitkide R geni NBS bölgelerine analog olan DNA sekansları çoğaltılmıştır.

Wang vd (2005) bilinen 45 hastalık dayanıklılık genini kullanarak Japonica pirinci genomunun tamamını taramıştır. Bu çalışma sonucunda 2119 dayanıklılık gen analogu tanımlamış ve bu sekansların genom içinde rastgele dağılmadıklarını bunun yerine kümeler halinde toplanmaya eğilimli olduklarını ifade etmiştir. Japonica pirincinde bulunan RGA'lar Indica türü pirincin tüm genomuyla karşılaştırıldığında bu 2 alt tür arasında 702 RGA allelik formu bulunmuş ve bunların 671 tanesinin (% 95.6) genomik sekanslarında uzunluk farklılıkları gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda pirincin 2 alt türü arasında RGA'ların yüksek oranda polimorfik olduğu ifade edilmiştir.

Timmerman-Vaughan vd (2000) NBS sekanslarına homolog olan 9 tane bezelye sekansını çoğaltmak için oligonükleotid primerler ve PCR yöntemi kullanarak yaptığı çalışmada 8 türün genomik lokasyonları haritalandırılmıştır. Toplam 10 lokus içerisinde tespit edilen 8 RGA sekansı 6 linkaj grubu içerisinde haritalandırılmıştır. Ayrıca RGA'ların genomik organizasyonu belirlenerek bir veya birden çok kopya içeren sekans ailelerinin mevcut olduğu ve çoklu gen ailelerinin sıklıkla birbirine bağlı kümeler halinde bulunduğu sonucuna varılmıştır. RGA sekans ailelerinin 3'ünde türüçi kopya sayılarında değişkenlik gözlemlenmişler, bu yüzden bu sekans ailelerinin hızlı bir şekilde evrildiğini ifade etmişlerdir.

Limei vd (2004) adlı araştırmacı poliploid pamuktan PCR teknikleri ile NBS-LRR genleri klonlamışlardır. NBS-LRR gen sekansı kütüphanesinden 150 klonluk bir örnek seçmiş ve bunları sekans etmiştir. Belirlenen 61 RGA'nın sekans analizleri ile bu gen bölgelerinin pamuk genomunda oldukça fazla bulunduğunu ifade etmiştir. Gen indeksi analizleri sonucu her bir sınıfın farklı birer evrim derecesinde olduklarını açığa çıkarmıştır. Genetik haritalama çalışmaları sonucunda RGA'ların pamuk kromozomlarında sınırlı sayıda bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

Quirin vd (2012) hastalığa dayanıklı yabani patates *S. bulbocastanum* türünden 97 tane ve bazı diğer patates türlerinden çeşitli sayılarda RGA sekansı elde etmiştir. İleri karşılaştırmalı genomik yöntemleriyle toplamda 800 sekans olmak üzere patatesin bilinen tüm RGA'ları ve klonlanmış NBS-LRR gen sekanslarını tek bir meta analiz çalışması kapsamında bir araya getirmiştir. Bu çalışmalar ile R geni çeşitliliğinin evrimsel akrabalık ve DNA hibridizasyon sonuçlarının her ikisini de yansıttığını ortaya çıkarmıştır. Araştırmalar sonucunda çalışılan tüm R genlerinin eski bir kökene sahip olduğu ve *Solanum* türleri arasında dağılmış durumda oldukları ifade edilmiştir.

Mutlu vd (2006) EST veri tabanlarından NBSLRR tipindeki R genlerinin korunmuş kinase-1a (GVGKTT) ve hidrofobik domainlerinden (GLPLAL) dizayn edilen 20 dejenere primer ile fasülyede polimorfizmi incelemek için toplamda 66 primer kombinasyonu test etmiştir. Çalışma sonucunda fasülye için toplam 32 RGAP markırı haritalandırılmıştır. Markırlar kuvvetli bir kümelenme eğilimi göstererek 10 linkage grubunda toplandığı ifade edilmiştir. 32 markırdan 19 tanesinin boyutları 500 bp'den daha büyük iken 133 tanesinin daha küçük olduğu ortaya konulmuştur.

Bhavani vd (2002) tarafından yapılan çalışmada bilinen R genlerinin NBS ve hidrofobik bölgelerindeki korunmuş kısımları tanıyan oligonükleotid primerler kullanılarak PCR tekniği ile börülce [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] bitkisinde mevcut

olan dayanıklılık gen analogları çoğaltılmıştır. Yaklaşık 500 bp uzunluğundaki fragmentlerden oluşan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde tek bir bant halinde ilerlemiştir. 50 farklı klonlanmış fragmentin nükleotid sekansları belirlenmiş ve bunların tahmini aminoasit sekansları birbirleriyle ve farklı bitki türlerinde bulunan RGA'lar ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda börülcede RGA'ların 5 farklı sınıfının olduğu ifade edilmiştir.

Rajesh vd (2002) bitkilerde birbirlerine bağlı halde bulundukları için tespit edilmeleri oldukça güç olan hastalıklara dayanıklılık gen markırlarını belirlemede dayanıklılık gen analogları polimorfizmi yönteminin oldukça kullanışlı olduğunu ifade etmiştir. Bu yöntemle nohut bitkisinde yaptıkları çalışmada R genleri üzerinde bulunan korunmuş motiflerden dizayn edilen primerleri kullanarak antraknoza dayanıklı ve hassas hatlar üzerinde bulk segregant analizi (BSA) yapılmıştır. BSA'da Tüm RGA'lar ve bunların 48 farklı kombinasyonu içinde sadece bir RGA'nın polimorfizim gösterdiğini ifade edilmiştir. Bu markır *C. arietinum* (FLIP 84-92C) × *C. reticulatum* (PI 599072) melezinden elde edilen 142 RIL'in F7:8 populasyonunda değerlendirilmiş ve sonucunda *Cicer* linkage haritası yapılmıştır. Bu analizlere göre nohut RGA'sının genomik lokasyonu haritalandırılmış nohut R genlerinin lokasyonları ile karşılaştırılmıştır.

Yaish vd (2004) tarafından yapılan çalışmada NBS-LRR dayanıklılık proteinlerinin NBS bölgesinde var olan korunmuş motiflerden elde edilen primerler ile mercimek türlerindeki genomik sekanslar çoğaltılmıştır. Araştırma sonunda elde edilen fragmentler 500-850 bp uzunluğunda gözlenmiştir. Bu fragmentlerin nükleotid sekans analizleri diğer bitkilerde bulunan RGA'lar ile yüksek oranda benzerlik (%91'e kadar) taşıyan 32 farklı RGA sekansı ortaya çıkarmıştır. Çalışmada diğer baklagil türlerinden izole edilmiş olan RGA sekanslarında göz önünde bulundurarak yapılan filogenetik araştırmalar snucunda mercimek NBS sekanslarını NBS-LRR genlerinin Toll ve interleukin-1 receptor (TIR) sınıfında gruplandırılmıştır.

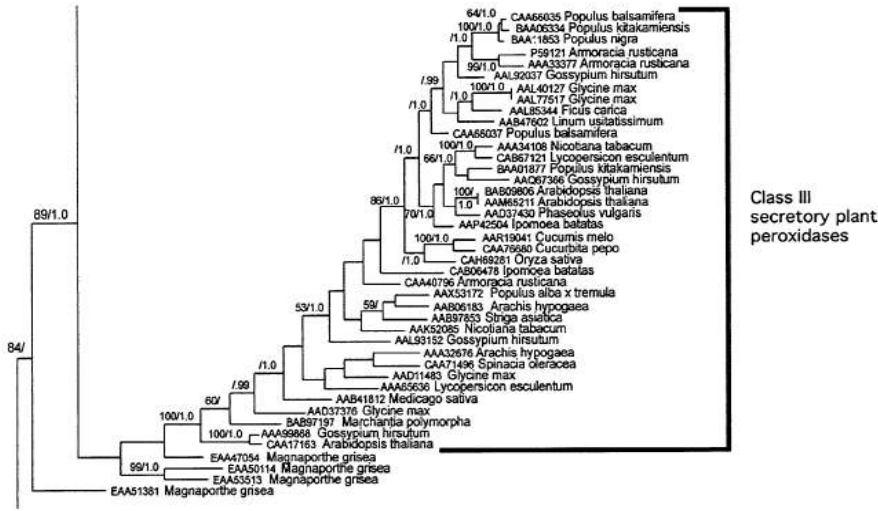
2.4. Peroksidaz Genleri ve Yapılan Çalışmalar

Yüksek yapılı bitkilerin çoğu çoklu gen aileleri tarafından kodlanan çok sayıda peroksidaz izoenzimi bulundurmaktadır. Peroksidazlar (EC 1.11.1.X) çeşitli stres faktörlerine maruz kaldıklarında hidrojen peroksitin suya dönüşümünü sağlayarak çeşitli substratların oksidasyonunu katalizleyen enzimler olarak tanımlanmaktadır (Adams 1978, Willekens vd 1994, Whitaker 1994, Schenk vd 2000).

Hidrojen peroksit miktarı peroksizomlarda, H_2O_2 'den başka bir substrata ihtiyaç duymayan katalaz enzimleri tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer kısımlarında aktivitesini göstermek için H_2O_2 'den başka substratlara da ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenmektedir (Scandalus vd 1994). Peroksidazlar (POD), hidrojen peroksiti kullanarak organik ve inorganik substratların oksidasyonunu katalizlerken, fenoller, hidrokinonlar, hidrokinonid aminler gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrogenasyonunu da katalizlemektedir. Bu moleküller arasında 2-kresol, 2-toluidin, guaiakol, pirogalol, lökomalaşit yeşili, 4,4'-diaminodifenilen amin, propiyonil promozin, benzidin, o-tolidin, di-oanisidin ve bazı azo boya türevleri sayılabilmektedir (Pütter ve Becker 1987, Van Huytstee 1987).

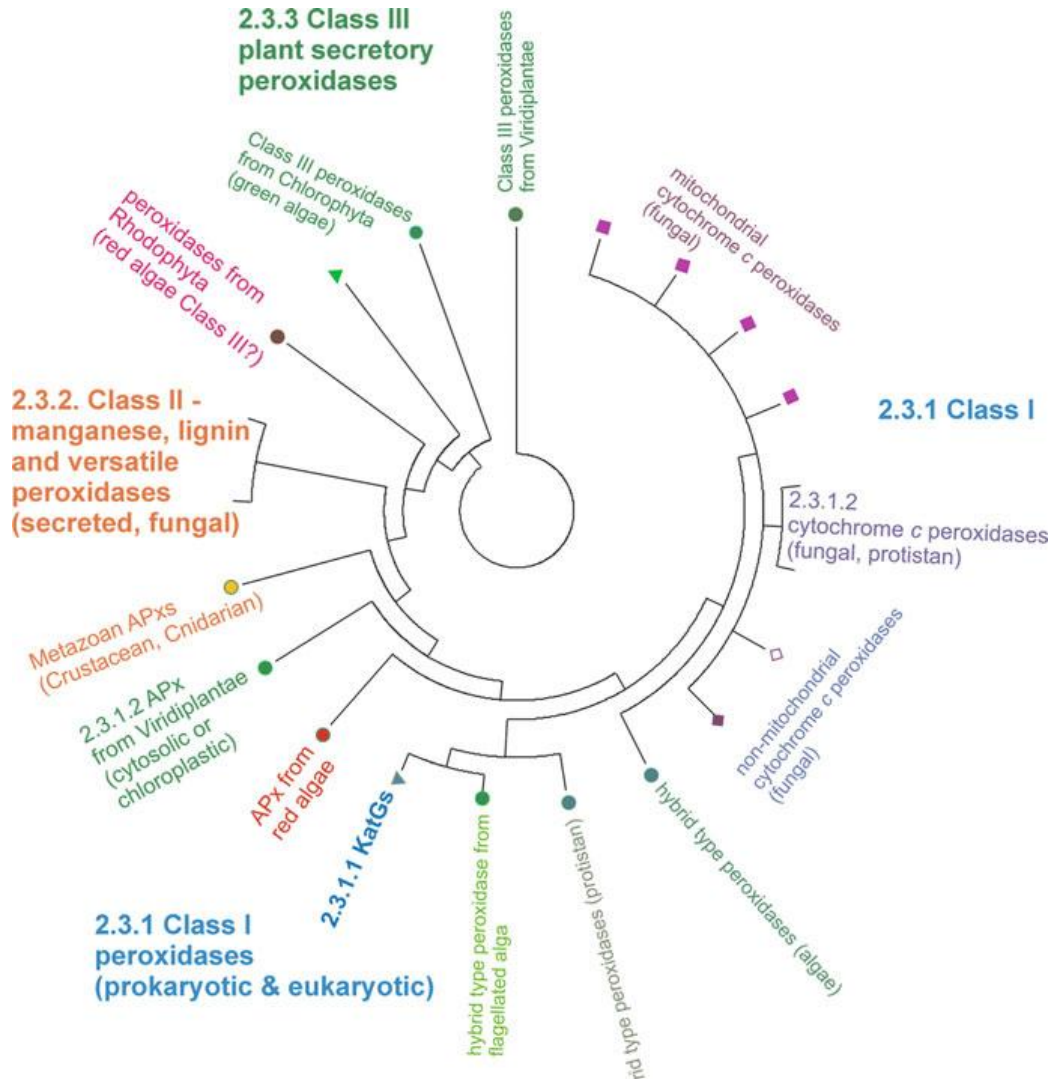
Peroksidazların katalitik mekanizması yaygın bir şekilde çalışılmakta olup sıklıkla aromatik hidrojen vericileri olan küçük oksidasyon ürünleriyle sonuçlanan hidrojen peroksitin su molekülüne yükseltgenmesi tepkimelerini içermektedir. X-ray kristalografik ve spektroskopik çalışmalar peroksidazların yapılarını oldukça iyi anlaşılmasına olanak vermiştir (Schuller vd 1996, Gajhede vd 1997, Henriksen vd 1998a, Mirza vd 2000, Østergaard vd 2000, Henriksen vd 2001, Berglund vd 2002). Yapısal ve kinetik analizler peroksidazlarda bulunan korunmuş aminoasit bölgelerini fonksiyonlarını ortaya çıkarmıştır. Bu bölgeler; (1) hem grubunun etrafındaki anahtar katalitik bölgeleri, (2) 2 kalsiyum bağlayıcı bölge, 4 sistin köprüsü ve molükülün uç kısmında bulunan tuz köprüsü gibi başlıca yapısal elementler (3) hem kısmından kalsiyum bağlayıcı bölgeye kadar uzanan hidrojen bağlayan su molekülleridir.

Peroksidazlar temel olarak 2 geniş aileye ayrılmaktadır. Bunlar; memelilerde bulunan peroksidazlar ve bakteri, fungus ve bitkilerde mevcut olan peroksidazlardır. Welinder adlı araştırmacı tarafından yapılan ilk sistematik sınıflandırmada memeli dışındaki organizmalarda bulunan peroksidaz ailesi 3 ayrı sınıfa bölünmüştür (Welinder 1992). Bu 3 sınıf protoporfirin IX ve Fe (III) tarafından oluşturulan benzer bir hem grubu bulundurmaktadır ve çok benzer 3 boyutlu yapıyı paylaşmaktadır (Adams 1978, Whitaker 1994). Ancak, aminoasit sekansları bakımından düşük seviyede bir benzerlik bulundurmakta ve farklı fonksiyonlar ve lokalizasyonlar ile tanımlanmaktadır. İlk sınıf (class I), maya sitokrom c peroksidazları, askorbat peroksidazlar ve bakteriyal katalaz peroksidazlarını içermektedir. Fungal lignin ve mangan peroksidazlar sınıf 2 (Class II) grubunda bulunmaktadır. Sınıf 3 (Class III) ise salgılayıcı bitki peroksidazları ile temsil edilmektedir (Şekil 2.2). Bu grupların moleküler filogenisi çeşitli yönleriyle araştırılmaktadır. Genel olarak class II ve III'ün tek bir ortak atadan köken aldığı düşünülmektedir (Morgenstern 2008 ve Şekil 2.3). Komşu dallarda hiçbir prokaryotik sekans bulunmadığı için (Morgenstern 2008), class II ve III'ün atasal ökaryotik genomdan çeşitlendiği sonucu çıkarılabilmektedir. Salgılayıcı Class II fungal peroksidazları ve Class III bitki peroksidazların birbirine paralel olarak evrildiği bilinmektedir.



Şekil 2.2. Sınıf III bitki peroksidazlarının filogenisi (Morgenstern 2008)

Peroksidaz enzimlerinden bir tanesi olan askorbat peroksidaz (E.C. 1.11.1.11) izoenzimleri kloroplast bulunduran hücrelere özgüdür. Yüksek yapılı bitkilerde kloroplastik ve sitozolik izoformları saptanmıştır. Bunların kloroplastlarda H_2O_2 'un neden olduğu hücre zararını önlemek için gerekli olduğu belirlenmiştir. Aynı anda bitki hücresinin farklı kısımlarında lokalize olmuş durumdadır. Örneğin kloroplastlarda (Asada 1994, Laloue vd 1997) ve sitosolde (Elia vd 1992, Ohya vd 1997, Caldwell 2003) askorbat peroksidaz izoenzimleri tespit edilmiştir. Bu enzimler indirgeme substratı olarak özellikle askorbatı kullanmakta ve askorbat-glutatyon veya Halliwell-Asada yolu olarak bilinen reaksiyon döngüsüne katılmaktadır. Döngü enzimler tarafından askorbatın indirgenmiş formunun yeniden oluşturulması ile tamamlanmakta ve burada AFR-Redüktaz (Ascorbate free radical) enzimi görev almaktadır (Inze vd 1995). Dalton vd (1993) askorbat-glutatyon yolu enzimlerini soya fasulyesi bitkisinde bildirmiştir. Daha sonrada benzer çalışmalar bezelye yapraklarında da gerçekleştirilmiştir (Jimenez vd 1997).



Şekil 2.3. Hem peroksidazlar arasındaki filogenetik akrabalık (Morgenstern 2008)

Başka bir peroksidaz türü olan glutasyon peroksidazın önceleri sadece hayvanlarda yaygın olarak bulunduğu kabul edilirken (Halliwell ve Gutteridge 1989), yakın dönemlerde yapılan çalışmalar bitkilerde de H_2O_2 giderilmesi için glutasyon peroksidazın görev yaptığını göstermiştir (Eshdat vd 1997).

Bilinen en eski peroksidazlardan biri olan yaban turpu peroksidazları 1930 yılından bu yana çalışılmaktadır (Keilin ve Mann 1937). 1940'larda maya sitokrom c peroksidazı keşfedilmiştir; fakat tüm sekansı ancak 1982 yılında çıkarılabilmektedir (Kaput vd 1982). 1980'lerde fungal lignin ve mangan peroksidazları ulaşılabilir sekans veri tabanlarında görülmeye başlanmıştır. Aynı zamanlarda çalışmalar katalaz-peroksidazlar ve askorbat peroksidazlar üzerine yoğunlaşmıştır. Günümüzde bu süper aile için IPR002016 (PF00141)'da 4020'nin üzerinde protein sekansına erişilebilmektedir.

Canlı ve cansız stres koşulları altında bitkilerde peroksidazların etkisi oldukça fazladır. Hidroksi sinnamil alkol oksidasyonu (Gross 1980), fenol oksidasyonu (Schmid ve Feucht 1980), polisakkarit çapraz bağlanması (Fry 1986), ilave monomerlerin çapraz

bağlanması (Everdeen vd 1988), lignifikasyon (Grisebach 1981, Walter 1992, Duarte vd 2000) yaralanmalara karşı savunma mekanizmaları (Espelie vd 1986, Dowd ve Lagrimini 1997), patojen veya böcek saldırılarına karşı savunma (Ye vd 1990, Dowd ve Lagrimini 1997) gibi dayanıklılığa yardımcı olan çok sayıda fizyolojik süreçte yer almaktadır. Stres koşulları altında dayanıklı genotiplerin peroksidaz aktivitesinin derecesini arttırdıkları ve bunun sonucu olarak da serbest radikallerin ve peroksitlerin zararlı etkilerini azaltabildikleri bildirilmiştir. Bunun yanında hassas bitkilerin ise bu bileşenleri detoksifiye edebilme yeteneklerinin olmadığı ifade edilmiştir (Hildebrand vd 1986, Heng-Moss vd 2004, Gutsche vd 2009). Yüksek dayanıklılık gücü ya daha üst düzeyde bir peroksidaz upregulasyonu ya da daha hassas bir upregulasyon yanıtına sahip olmayı gerektirmektedir.

Artan peroksidaz aktivitesi ırka özgün olan savunma yanıtları sırasında bitki hücre duvarına fenolik materyallerin depolanması ile yakından ilişkilidir (Graham ve Graham 1991, Reimers ve Leach 1991). Bu evrede sağlam çapraz bağların oluşumu ve sekonder hücre duvarının gelişimi sırasında meydana gelen lignin birikimi patojen girişini ve yayılımını sınırlandırmaktadır (Ride 1983, Tiburzy ve Reisener 1990). Yine lignifikasyon evreleriyle ilişkilendirilen reaktif bileşenler patojen büyümesini durdurabilmektedir.

Artan peroksidaz aktivitesi bazı bitki-patojenik fungal ve bakteriyel interaksiyonlarda incelenmiştir (Flott vd 1989, Schweizer vd 1989, Graham ve Graham 1991, Reimers vd 1992, Young vd 1995). *Rhizobium*-baklagil simbiyosisinde de gösterilmiştir (Salzwedel ve Dazzo 1993). Özgün ekstrasellüler peroksidazların aktivitelerindeki artış genellikle patojenlerin çoğalma ve yayılma oranlarındaki azalmayla ilişkilendirilmektedir (Reimers vd 1992, Guo vd 1993).

Model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da 73'ün üzerinde (Welinder 2002), *Medicago truncatula*'da 101'in üzerinde, *Oryza sativa*'da 138'in üzerinde farklı sınıf III peroksidaz geni belirlenmiştir. PeroxiBase veri tabanına giren sınıf III genlerinin toplam sayısı 3000'e ulaşmıştır (Ocak 2010). Bu sayı tüm ailenin üyelerinin % 73'ünü oluşturmaktadır. Monokotilodon peroksidazlarının sekans yapıları dikotilodonlarda bulunanlara göre çok az farklılıklar göstermektedir (Passardi 2004). Ama genel olarak bu genlerin büyük çoğunluğu tüm sınıf III üyeleri içinde yüksek oranda korunmuştur. Gözlenen tüm sekans benzerlikleri erişilebilir sınıf III peroksidazlarını 8 ayrı grupta ayrılmasına neden olmaktadır (Passardi 2004).

Zhang vd (2001) 4 çim taksonunda peroksidaz genlerini de içeren 25 çoklu gen ailesini içeren bir araştırma yapmıştır. Analizler sonucunda peroksidazlar arasında % 53.1 ve % 90.9 aralığında olmak üzere ortalama % 64.2 oranında bir sekans benzerliği bulmuştur. Peroksidaz genleri arasındaki bu benzerliğin seviyesi 25 çoklu gen ailesi içinde en düşük ikinci sıradadır. 23 aile ile karşılaştırıldığı zaman beklenenden daha yüksek bir peroksidaz değişkenliği görülmesi ile bu ailenin ortalamadan daha yüksek bir evrimsel güç baskısı altında olduğu ifade edilmiştir. Bu sebeple çalışmalarının sonucunda peroksidaz genlerinin sekans verilerini karşılaştırarak ilgili taksonlardaki evrimsel ilişki de aydınlatılmıştır.

Churin vd (1999) yaptığı bir çalışmada 3 arpa bitkisinin cDNA'larını izole ederek glutatyon peroksidaz enziminin homologları olan HVGPH1, HVGPH2 ve

HVGPH3 enzimlerini karakterize etmiştir. Çalışmada; araştırmacılar, HVGPH1, glutatyon peroksidaz enziminin sitosolik bir formu olduğunu ifade etmiştir. HVGPH2 formunun N terminal domainleri ise plastidlerdeki taşıyıcı peptidlerin tipik yapısını göstermektedir. Peroksisomal sekansların HVGPH3 N terminalinin yanında bulunduğu gözlenmiştir. HVGPH1 ve HVGPH2 formlarının transkript seviyelerinin yapraklarda stres koşulları altında arttığı gözlenmiştir. Bunun tersine HVGPH3 mRNA'ları ise strese karşı negatif bir yanıt göstermiştir. Sonuç olarak yapılan araştırmanın verileri farklı fonksiyon ve lokalizasyonlarda glutatyon peroksidaz enziminin homologlarını kodlayan küçük bir gen ailesi bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

Chittoor vd (1997) bakteriyal patojenlere karşı bitkiler tarafından meydana getirilen yanıtlarda peroksidaz enzimlerinin fonksiyonlarını araştırdığı çalışmada pirinç cDNA'sı kütüphanesinden POX22.3, POX8.1, ve POX5.1 olmak üzere 3 peroksidaz geni belirlenmiştir. Araştırmacı bu genlerin nükleik asit ve amino asit sekansı bakımından oldukça benzer olduklarını ifade etmiştir. Bu 3 genin patojen etkileşimleri ve mekanik stres sırasında farklı ekspresyon gösterdiği bulunmuştur. Bu araştırmada genomik kütüphaneden alınan dördüncü bir peroksidaz geni olan POXgX9'un pirinç genomu içerisinde POX22.3 genine komşu olduğunu ve nükleotid ve amino asit sekansı bakımında % 90'dan daha yüksek oranda bir benzerlik taşıdığını ortaya koymuştur. POX22.3, POX8.1 ve POX5.1 genlerinin pirinç haploid genomunda tek kopyalarının olduğu ifade edilmiştir. Araştırmanın sonuçları farklı çevresel etmenlere karşı peroksidaz gen ailesi üyelerinin farklı şekillerde düzenlendiğini göstermektedir.

Gulsen vd (2010) yaptıkları çalışmada *Malus* türleri arasında peroksidaz genlerinin polimorfizmini ve elde edilen markırlar arasındaki korelasyonu incelemiştir. Türk elma germplazmı 1 spesifik peroksidaz primeri ile değerlendirilmiştir. 192 elma genotipinin genomik DNA'ları bu primer kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Sonuç olarak 0.56 ve 0.98 değerleri arasında ortalama 0.77 oranında bir benzerlik bulunmuştur. Peroksidaz genleri polimorfizmi ile elma genotipleri arasında farklı evrimsel süreçleri izleyen 2 ayrı küme elde edilmiştir. Korelasyonun, -0.22 ve 0.90 değerleri arasında değişkenlik gösteren POGP markırları arasındaki linkage dengesizliğinin bir göstergesi olduğu ifade edilmiştir.

Gulsen vd (2007) yaptıkları farklı bir çalışmada buffalograss genotipleri ve farklı 8 çim genotipi arasındaki peroksidaz genlerinin polimorfizmini değerlendirmiştir. Bu çalışmada 34 pirinç peroksidaz cDNA'sı ile bu genler üzerindeki korunmuş domainleri temel alarak 14 spesifik peroksidaz primeri dizayn edilmiştir. 28 buffalograss, 4 C4, ve 4 C3 çim genotipinden elde edilen genomik DNA'lar PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Bu yöntemle buffalograss genotipleri arasından, C3 ve C4 türlerinin ise birbirleri içinden diploid türleri poliploid olanlardan ayırt etmeyi amaçlanmıştır. PCR sonucunda elde edilen 7 tanesi buffalograss ve 7 tanesi diğer çim türlerine ait olan toplam 11 peroksidaz gen fragmenti sekans edilmiştir. Bu sekanslardan 5'inin kloroplast orjinli olan pirinç (*Oryza sativa* L.) askorbat peroksidazlar ile kümelenme gösterdiğini ortaya konulmuştur. Bu araştırma sonucunda peroksidaz gen ailesinden elde edilen spesifik primerler ile tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin ve evrimsel ilişkinin incelenebileceği ifade edilmiştir.

Mittler ve Zilinskas (1992) yaptıkları çalışmada bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkisinden sitosolik askorbat peroksidaz (ApxI) enzimini kodlayan bir geni izole

etmişler ve nükleotid sekansını çıkarmışlardır. Bu sırada ApxI cDNA ve genomik klonlar arasında intron ve eksonların pozisyonları belirlemişlerdir. Araştırmanın sonucunda izole edilen ApxI geni nin 9 intron içerdiği ifade edilmiştir. Bu intronlardan ilki mRNA'nın 5'ucunda translasyona uğramayan bir bölgede bulunmaktadır. Ayrıca, çalışmalarında ApxI transkript seviyelerinin kuraklık, sıcak ve etafon, absisik asit uygulamaları gibi çok sayıda stres faktörüne karşı oluşturulan yanıtlar sırasında arttığını ve peroksidaz aktivitesindeki bu artışların immunoblot analizleriyle ölçülen transkript seviyelerinden daha az olduğu ifade edilmiştir.

2.5. WRKY Transkripsiyon Faktörleri ve Yapılan Çalışmalar

Bitki-patojen etkileşimlerinde stresle ilişkili genlerin indüksiyonu temel olarak transkripsiyonel seviyede görülmektedir. Bu genlerin temporal ve spatial ekspresyon kalıplarındaki değişiklikler bu mekanizmanın önemli bir bölümüdür (Rushton ve Somssich 1998). Bitkiler genom kapasitelerinin çok büyük bir kısmını transkripsiyon olayına ayırmaktadır. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* ve çeltik türlerinin genomunda sırasıyla 2100 ve 2300 transkripsiyon faktörü (TF) bulunmaktadır (Riaño-Pachón vd 2007). Genom analizleri ile *Arabidopsis* genomunda protein kodlayan 1,510–1,581 TF geni bulunmuştur (Riechmann vd 2000, Gong vd 2004, Guo vd 2005, Iida vd 2005). Pirinç genomunun ise 1,611 TF geni içerdiği tahmin edilmektedir (Xiong vd 2005).

Transkripsiyon faktörleri sekansa özgü DNA'ya bağlanma yapısı sergilemektedir ve hedef genlerin transkripsiyonu aktive etme veya inhibe etme yeteneğindedir. Bitkilerde WRKY genleri canlı ve cansız stres faktörlerine karşı oluşturulan fizyolojik yanıtlar, yaşlanma ve bundan başka trikom ve tohum gelişimi, sekonder metabolitlerin biyosentezi gibi olayları düzenleyen bitkiye özgün transkripsiyonel faktörlerinin geniş bir ailesini kodlamaktadır (Alexandrova ve Conger 2002, Dellagi vd 2000, Deslandes vd 2002, Gus-Mayer vd 1998, Hara vd 2000, Huang ve Duman 2002, Kim vd 2000, de Pater vd 1996, Pnueli vd 2002, Schenk vd 2000, Yoda vd 2002). Transkripsiyon faktörlerinin WRKY ailesi ilk defa bitkilerde keşfedilmiştir (Ishiguro ve Nakamura 1994, Rushton vd 1995).

WRKY proteinleri ailesi ismini yüksek oranda korunmuş 60 aminoasit uzunluğundaki WRKY domainlerinden almaktadır. Bu domain dayanıklılıkla ilgili olan genlerin promotor bölgelerinde bulunan W-box (TTGAC[C/T]) veya SURE (sugar-responsive cis-element) denilen kısımlara bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Maleck vd 2000, Rushton vd 1995, Sun vd 2003). Bu domain heptapeptid bir WRKYGQK yapısı ve bilinen diğer çinko-parmak motiflerinden farklı olan C₂H₂- veya C₂HC- yapısındaki bir çinko-parmak modeli ile karakterize edilen yüksek oranda korunmuş bir veya iki WRKY domaini içermektedir (Eulgem vd 2000). *Arabidopsis* WRKY4 (AtWRKY4)'ün WRKY domaininin C terminal bölgesinin nüklear manyetik rezonans (NMR) analizlerinden anlaşıldığına göre, WRKY domainlerinin korunmuş WRKYGQK sekansı, doğrudan DNA'ya bağlanma bölgesini içermektedir (Kazuhiko vd 2005).

WRKY domainlerinin sayısı ve çinko-parmak motiflerinin özellikleri baz alınarak, WRKY protein ailesi 3 ayrı grup içerisinde sınıflandırılmaktadır (Eulgem 2000). Grup 1 proteinleri tipik olarak bir C₂H₂ çinko parmak motifinden oluşan iki WRKY domaini içermektedir. Grup 2 proteinleri tek bir WRKY domaini ve C₂H₂ çinko

parmak motifine sahiptir. Bu grup WRKY domainlerinin filogenisine göre 5 alt gruba ayrılmaktadır. WRKY proteinlerinin çok az bir kısmı çinko parmak motiflerinin yapısı dolayısıyla grup I ve II üyelerinden farklıdır ve grup III içinde değerlendirilmektedir (Eulgem vd 2000, Dong vd 2003). Bu grubun proteinleri yine tek bir WRKY domaini taşımaktadır fakat çinko parmak motifleri C₂-H-C yapısı şeklindedir (Wu vd 2005).

WRKY genlerinin büyümesinde gen duplikasyonları önemli rol oynamaktadır. Örneğin; çeltikte WRKY gen lokuslarının % 80'i duplikasyon bölgelerinde bulunmaktadır (Ramamoorthy vd 2008). Gen duplikasyonları yeni WRKY genlerinin oluşumuna yol açmaktadır. WRKY genlerinin 3 grubunun da evrim boyunca farklı zamanlarda ortaya çıktıkları bilinmektedir. Grup I ve II' nin çoğu üyesinin monokot ve dikotların ayrılmasından önce ortaya çıktığı, grup III WRKY genlerinin ise daha sonraki bir evriminin olduğu tahmin edilmektedir (Wu vd 2005).

İlk WRKY proteini, SPF1, tatlı patatesten (*Ipomoea batatas*) klonlanmıştır (Ishiguro vd 1994). Bunun yanında; yabani yulaf (*Avena fatua*) (Rushton vd 1995), domuz ıyığı (*Dactylis glomerata*) (Alexandrova ve Conger 2002), arpa (*Hordeum vulgare*) (Sun vd 2003, Xie vd 2007), kakao (*Theobroma cacao*) (Borrone vd 2007), nohut (*Cicer arietinum*) (Mantri vd 2007), *Coptis japonica* (Kato vd 2007), üzüm (*Vitis vinifera*) (Marchive vd 2007), tütün (*Nicotiana tabacum*) (Wang vd 1998, Chen ve Chen 2000, Hara vd 2000; Yoda vd 2002), *Matricaria chamomilla* (Ashida vd 2002), maydonoz (*Petroselinum crispum*) (Rushton vd 1996, Cormack vd 2002), *Retama raetam* (Pnueli vd 2002), *Solanum dulcamara* (Huang vd 2002), patates (*Solanum tuberosum*) (Dellagi vd 2000, Beyer vd 2001), buğday (*Triticum aestivum*) (Sun vd 2003), vb. birçok bitki türünde daha WRKY genleri klonlanmıştır.

WRKY transkripsiyon faktörlerinin hücre sinyalinde bir bileşen olarak fonksiyonu bitki stres cevaplarında devam etmektedir. Ancak biyotik streslere yönelik yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında WRKY proteinlerinin cansız streslerdeki görevlerine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Farklı bitkilerde bulunan oldukça fazla WRKY transkripsiyon faktörü ve bunların karmaşık çevre şartlarındaki bilinmeyen işlevleri göz önüne tutulduğunda, onların cansız stres koşulları altındaki fonksiyonlarını aydınlatmak oldukça zordur. Bu koşullarda WRKY proteinlerinin transkripsiyon ile olan ilişkisi dolaylı olarak ortaya çıkartılmıştır; ancak günümüzde yapılan çalışmalarda bazı doğrudan bulgular bildirilmiştir. Son zamanlarda araştırmacılar WRKY faktörlerinin kuraklık, soğuk, besin yetersizliği gibi cansız streslere yanıtındaki fonksiyonel analizleri üzerinde durmaktadır. Ayrıca test materyalleri artık *A. thaliana* gibi model bitkilerle sınırlı değildir.

Borrone vd (2004) tarafından yapılan çalışmada grup I ve II WRKY genlerinin korunmuş DNA'ya bağlanma bölgelerinden ve diğer korunmuş motiflerinden dejenere PCR primerleri dizayn edilmiştir. Bu primerler kullanılarak çalışma sonunda 16 WRKY fragmenti izole edilmiştir. Bu 16 lokusun sekansları incelendiğinde 7 tanesinin intron bölgesinde tek nükleotid sekans polimorfizmi gösterdiği ortaya konmuştur. Diğer 4 lokus ile moleküler markır olarak kullanılmış ve F2 polulasyonunda haritalandırılmıştır.

Kim vd (2008) domates ve biber bitkisinde yaptıkları araştırmada WRKY tabanlı moleküler markır geliştirmek için öncelikle WRKY domainlerinde bulunan korunmuş sekanslardan primerler dizayn edilmiştir. *C. annuum* 'CM334' ve *C. annuum*

‘Chilsungcho’ ebeveynleri arasındaki polimorfizm 6 primer kombinasyonu ile test edilmiştir. Araştırmanın sonucunda Grup II WRKY genlerinden dizayn edilen primerlerin çoğalttığı fragmentlerin yüksek seviyede polimorfizm ortaya çıkarttığı gözlemlenmiştir. Toplamda 32 primer çifti kullanarak 60 polimorfik bant belirlenmiştir.

Wei vd (2012) yaptıkları araştırmada mısır bitkisinin B73 homozigot hattından elde edilen genomdan 136 WRKY proteini tanımlamışlardır. Yine bu araştırmada 5 türü içeren filogenetik analizlerle WRKY genlerinin orijini ve evrimsel süreçlerini ortaya koymuşlardır. Elde edilen sonuçlara göre gen duplikasyonları yeni grupların ve alt grupların oluşumunda belirleyici temel faktördür. Mısır WRKY genlerinin kromozomal lokasyon analizleri ile 20 gen kümesinin genomda eşit olmayan bir şekilde dağılmış olduklarını ortaya koymuşlardır. Araştırmalarında kullandıkları mikroarray analizlerinden çıkan sonuçlara göre 116 gen tarafından kodlanan 131 WRKY transkriptinin mısırdaki büyüme gelişmenin düzenlenmesinde görev aldıkları gösterilmiştir. Kuraklık stresi ve fungal zarara karşı meydana getirilen transkripsiyonal yanıtı kapsayan bu analizler WRKY proteinlerinin stres yanıtlarıyla da ilişkili olduğunu göstermiştir.

Wang vd (2011) *A. thaliana*’da WRKY gen sekanslarındaki duplikasyon olaylarını araştırmışlardır. Araştırmalarında duplikasyon olayları sonrasındaki seçim baskısını değerlendirmek için erişilebilir WRKY sekanslarını kullanılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçta WRKY ailesinde 5 alt grup elde edilmiştir. Test sonuçlarına göre bu gen ailesinin evrim sürecinde seleksiyonda anahtar rol oynadığını ortaya koyulmuştur. Bu ağaç üzerinde alt gruplar arasında farklılıkların ortaya çıkmasına neden olan bazı aminoasit değişiklikleri belirlenmiştir.

Ramamoorthy vd (2008) yaptıkları araştırmada erişilebilir pirinç genomunun sekans verilerini ve WRKY transkripsiyon faktörlerini kodlayan 103 gen üzerinde analizler yapmışlardır. Araştırmanın sonucunda pirinç WRKY genlerinin çok büyük bir bölümünün (% 77.7) duplikasyon bölgelerinde yerleştikleri ortaya koyulmuştur. Bunlardan % 45.6’sı parçalı olarak ve %35’i ise rastgele duplikasyona uğramıştır. Bu sonuçlar bu gen ailesinin büyümesi için temel mekanizmanın genom duplikasyonları olduğunu ortaya çıkarmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri

Bu çalışmada kullanılan bitkiler Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk Üretim Uygulamaları seralarında çimlendirilmiştir. Moleküler çalışmalar ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.2. Deneme için kullanılan toprak analiz sonuçları

Saksılara doldurulan toprak örnekleri 0-30 cm derinlikten alınmıştır. Toprak örneklerinin pH'ları Jackson'a göre 1/2.5 toprak/su karışımında (Jackson 1967), CaCO_3 içerikleri Scheibler kalsimetresi kullanılarak (Evliya 1964), elektriksel iletkenlik satürasyon çamurunda (Anonim 1988), bünje; Bouyoucos hidrometre yöntemine göre (Bouyoucos 1955), organik madde modifiye Walkey-Black metoduna göre (Black 1965) belirlenmiştir. Toplam N modifiye Kjeldahl metoduna göre (Black 1957), alınabilir P, Olsen metoduna göre (Olsen 1982), değişebilir K, Ca ve Mg analizleri 1 N Amonyum Asetat (pH=7) metoduna göre (Kacar 1972) ve alınabilir Fe, Zn, Cu ve Mn analizleri ise DTPA metoduna göre (Lindsay ve Norwell 1978) yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan toprak analiz sonuçları

Ölçülen Parametreler	Bulunan değerler	Değerlendirme
pH	7.96	Alkali
E.C. (mS/cm)	0.93	Tuzluluk tehlikesi yok
CaCO_3 (%)	26.5	Aşırı kireçli
Kum (%)	45.08	-
Kil (%)	31.28	-
Silt (%)	23.64	-
Bünje	-	Kumlu-Killi-Tınlı
Organik Madde (%)	1.87	Düşük
Toplam N (%)	0.106	Orta
P (ppm)	9.37	Yeterli
K (meq / 100 g)	0.61	İyi
Na (meq / 100 g)	0.15	Düşük
Ca (meq / 100 g)	37.71	İyi
Mg (meq / 100 g)	7.12	İyi
Fe (ppm)	3.56	Noksanlık gösterebilir
Zn (ppm)	0.746	Noksanlık gösterebilir
Mn (ppm)	23.156	Yeterli
Cu (ppm)	1.368	Yeterli

Toprak örneklerinin analiz sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Buna göre deneme yeri alkali ve aşırı kireçli ve toprak bünyesi de kumlu-killi-tınlı bulunmuştur. Tuzluluk tehlikesi olmayan deneme yerinin organik maddece fakir olduğu, buna karşılık sodyum seviyesinin düşük olduğu saptanmıştır. Demir ve çinko gibi elementlerin eksiklik gösterebileceği belirlenmiştir.

3.1.3. Bitki materyali

Çizelge 3.2’de verilen mercimek türleri ve yakın bir cins kullanılmıştır

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genotipler

No	Latince Adı	Kökeni (Orijin)
1	<i>Lens ervoides</i>	Turkey
2	<i>Lens ervoides</i>	Turkey
3	<i>Lens ervoides</i>	Italy
4	<i>Lens lamottei</i>	Spain
5	<i>Lens lamottei</i>	Spain
6	<i>Lens lamottei</i>	Turkey
7	<i>Lens lamottei</i>	France
8	<i>Lens nigricans</i>	Italy
9	<i>Lens nigricans</i>	Croatia
10	<i>Lens nigricans</i>	Spain
11	<i>Lens nigricans</i>	Turkey
12	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Turkey
13	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Syrian Arab Republic
14	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Israel
15	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Israel
16	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Cyprus
17	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Syrian Arab Republic
18	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Uzbekistan
19	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Iran
20	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Palestine
21	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Jordan
22	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Uzbekistan
23	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Turkmenistan
24	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Lebanon
25	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Turkey
26	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Turkey
27	<i>Lens culinaris subsp. tomentosus</i>	Turkey
28	<i>Lens culinaris subsp. tomentosus</i>	Turkey
29	<i>Lens culinaris subsp. tomentosus</i>	Syrian Arab Republic
30	<i>Vicia montbretii</i>	Turkey
31	<i>Vicia montbretii</i>	Turkey
32	<i>Lens culinaris subsp. culinaris</i>	Turkey

Mercimek türlerinden 7 taksona ait 30 farklı genotip kullanılmıştır. Eskiden mercimekler içinde sınıflandırılan (Ladizinsky ve Sakar 1982) fakat şimdi mercimek cinsinden çıkarılan 2 *Vicia montbretii* türü kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. DNA izolasyonu

Orjinleri farklı ülkelerden olan ve ICARDA'dan getirtilen 32 farklı genotipteki bitkilerin çimlenmesi ile elde edilen genç yaprak örnekleri alınmış CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılmıştır (Doyle ve Doyle 1990).

CTAB metoduna göre (Doyle ve Doyle 1990); her bir bitkiden 3-4 yaprak 1,5 ml'lik ependorf tüplerin içerisine konulup ve üzerine 500 µl CTAB tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra yapraklar plastik ve tüp içinde rahatça hareket ettirilebilen plastik ezme çubukları (pestil) ile her tüp için farklı bir tane kullanılarak iyice ezilmiştir. Ezme işleminin ardından DNA'larının sıvıya geçmesini sağlamak için 65 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örneklerden proteinin uzaklaştırılması için 600 µl kloroform-izoamil alkol (25:1) çözeltisi konularak 10 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmıştır. Örnekler daha sonrasında 10 dakika boyunca 14000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerde tüpün alt kısmında kloroform, orta tabakada protein ve üst fazda ise DNA bulunduğu sıvı olmak üzere üç faza ayrılmıştır. Tüpün içerisinde bulunan süpernatant kısım 1,5 ml'lik temiz tüplere alınmıştır (yaklaşık 500 µl). Bu faz içerisindeki DNA'nın çökmesi için üzerine 500 µl hacimde -20 °C'de bulunan soğuk izopropanol konulup 10 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmıştır ve ardından -20 °C'de dondurucuya 30-45 dk kadar bekletilmiştir. Daha sonra -20 °C'den alınan örneklerin DNA'larının çökmesi amacıyla 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemin sonunda tüplerin dibinde pellet oluştuğu gözlenmiştir. Pelet yerinden oynatılmadan tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmış ve pelet üzerine -20 °C'de bulunan % 70'lik etanolden 600 µl konularak 14000 rpm'de 5 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar dikkatlice boşaltılmış ters çevrilerek 30-40 dakika boyunca ağzı açık vaziyette tüp içerisinde kalan etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. İyice kurduğundan emin olduğumuz tüplerin içerisine 50 µl 65 °C'de sıcak su konmuştur. DNA'ların sıvıya geçmesi için örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında ise bozulmamaları için -20 °C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile % 1'lik agarose jel hazırlanarak örnekler jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 65 voltta 15 dakika koşan örnekler UV transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir.

3.2.2. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA konsantrasyonu jel-elektroforez yöntemiyle, % 1'lik jele yüklenen standart DNA/Hind III (0,5 µg/µl) ile yüklediğimiz örneklerdeki DNA bantlarının karşılaştırılmasıyla miktarları belirlenmeye çalışılmıştır.

Her bir bitkiden elde edilen 1 µl ve 2 µl hacminde DNA miktarları 1 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Örneklerin yanına yine aynı miktarda standart

DNA/Hind III (0,5 µg/µl) yüklenerak elektroforezde 65 voltta 30 dakika koşturma işlemi yapılmıştır ve daha sonrasında UV transilluminatör ile jel görüntüsü alınmıştır.

3.2.3. Primerlerin seçimi

Bu çalışmada daha önce farklı çalışmalarda kullanılan (Kim vd 2007, Mutlu vd 2006, Gulsen vd 2007) 125 adet 13-26 baz aralığında primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin isimleri, baz dizilişleri ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ve baz sıraları

No	Primerin adı	Baz uzunluğu	Baz sırası (5'→3')
1	GI-F	14	AGTCATAATCATCC
2	GI-R	13	CTTCATAGGTTGT
3	GII-F	11	AGCAGCAGCAA
4	GII-R	13	CAACTCTCTTCTT
5	GIII-F	13	GCAAAAAGAAGGA
6	GIII-R	12	TACATCGTGGTT
7	WS-F	17	AGATGGAGGAAGTATGG
8	WS-R	17	TGACCATACTTCTCCA
9	WRKY 1 FP	19	TGGMGIAARTAYGGNCARA
10	WRKY 2 FP	26	GAYGGITAYAAYTGGMGIAARTAYGG
11	WRKY 3 FP	17	GCIAMYATGMGNAARGC
12	WRKY 2 RP	26	TGRBYRTGYTTICCYTCRTAIGTDGT
13	WRKY 3 RP	17	GTDAIYGTIGGRAANGG
14	XLRR For	18	CCGTTGGACAGGAAGGAG
15	XLRR Rev	18	CCCATAGACCGGACTGTT
16	CLRR For	18	TTTTTCGTGTTCAACGACG
17	CLRR Rev	18	TAACGTCTATCGACTTCT
18	RLRR For	18	CGCAACCACTAGAGTAAC
19	RLRR Rev	18	ACACTGGTCCATGAGGTT
20	NLRR For	18	TAGGGCCTCTTGCATCGT
21	NLRR Rev	18	TATAAAAAGTGCCGGA
22	NPLOOP	24	TCAATTAATGTTTGAGTTATTGTA
23	Nkin2	15	GTAAC TAAGGATAGA
24	Pto kin1	18	GCATTGGAACAAGGTGAA
25	Pto kin2	18	AGGGGGACCACCACGTAG
26	Pto kin3	18	TAGTTCGGACGTTTACAT
27	Pto kin4	18	AGTGTCTTGTAGGGTATC
28	LM637	17	ARIGCTARIGGIARICC
29	LM638	20	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
30	NBS-F1	23	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
31	NBS-R1	23	YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC
32	RLK-For	17	GAYGTNAARCCIGARAA

Devamı arkada

Çizelge 3.3'ün Devamı

33	RLK-Rev	26	TCYGGYGCRATRTANCCNGGITGICC
34	S1	21	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
35	AS1	18	CAACGCTAGTGGCAATCC
36	S2	20	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
37	AS3	18	IAGIGCIAGIGGIAGICC
38	PtoFen-S	22	ATGGGAAGCAAGTATTCAAGGC
39	PtoFen-AS	23	TTGGCACAAAATTCTCATCAAGC
40	XLRR-INV1	18	TTGTCAGGCCAGATACCC
41	XLRR-INV2	18	GAGGAAGGACAGGTTGCC
42	CLRR-INV1	14	GCAGCAACTTGTGC
43	CLRR-INV2	15	TCTTCAGCTATCTGC
44	NLRR-INV1	16	TGCTACGTTCTCCGGG
45	NLRR-INV2	18	TCAGGCCGTGAAAAATAT
46	Pto-kin1IN	18	AAGTGGAACAAGGTTACG
47	Pto-kin2IN	17	GATGCACCACCAGGGGG
48	S1-INV	21	GCAACAGAAGGGTTGGGGTGG
49	AS1-INV	18	CCTAACGGTGATCGCAAC
50	S2-INV	20	CAICAIAAIGGITGIGGIGG
51	AS3-INV	16	CCIGAIGGIGAICGIG
52	wlrk-S	21	GAAAGATGAGTAAATTACTTG
53	wlrk-AS	18	TGAGGGTCAGGCATGCAG
54	Cre3Ploop	20	GCGGGTCTGGGAAATCTACC
55	Cre3-k3	20	CTGCAGTAAGCAAAGCAACG
56	Cre3LR-F	20	CACACACTCGTCAGTCTGCC
57	Cre3LR-R	21	CAGGAGCCAAAAATACGTAAG
58	Xa1NBS-F	17	GGCAATGGAGGGATAGG
59	Xa1NBS-R	18	CTCTGTATACGAGTTGTC
60	Xa1LR-F	22	CTCACTCTCCTGAGAAAATTAC
61	Xa1LR-R	19	GAGATTGCCAAGCAATTGC
62	POX1F	16	CTCGACCTACAAGGAC
63	POX2F	18	CTCGACGTCAAGGACCTC
64	POX3F	18	CAACGAGACCAACATCGA
65	POX4F	21	TTACGCTACATACAATTTCAA
66	POX5F	18	CACACGATCGGGGCGATC
67	POX6F	15	TACCCGACGGTGAGC
68	POX7F	19	CTCGACACAACCGATGTTG
69	POX8Fa	21	CACCATCAAGAGCGTCATAAC
70	POX8Fb	21	CACCATCAAGAGCGTCATAAC
71	POX8Fc	21	CACCATCAAGAGCGTCATAAC
72	POX9F	13	GGCGTCGGCGTCG
73	POX10Fa	15	CCACGCCCTCATCGC
74	POX10Fb	17	CCGAGGGACACGACGAC

Devamı arkada

Çizelge 3.3'ün Devamı

75	POX10Fc	18	CTGTCCAACAAGGGCCTC
76	POX10Fd	17	GTTCTGCAGCGCCTTCG
77	POX10Fd	17	GTTCTGCAGCGCCTTCG
78	POX11F	20	CCTTCTTCTTGCCATCTTGC
79	POX12Fa	21	CGAGCTGAGAGTGAATCGATC
80	POX12Fb	22	CTCTCTCCTGGGGGTTCTATGC
81	POX12Fc	18	CGTGAGGTGGCACCTCAC
82	POX13F	21	GACGGTTCTATTGGGAAGAAG
83	POX14F	20	CTCATCGTTAACGTCGCATC
84	POX1R	16	ATGTAGGCGCTGGTGA
85	POX2R	17	GCCCATCTTCACCATGG
86	POX3R	17	CCTGATCTGTCCCTGCG
87	POX4R	16	ACTCGACTGCGACCAG
88	POX5R	17	AATCTGCCGGCAGAGCC
89	POX6R	19	CTTGATCGTACTGACTCTA
90	POX7R	23	TTCACAAACTAGTCACAATCACA
91	POX8Ra	16	TTGGGCGTCGTCGTGT
92	POX8Rb	17	TTGCTAGAGCGAGCTGG
93	POX8Rc	19	ATCCTCCATGCATGCCTTC
94	POX9R	18	ATCGGGAAGCTTCCCCTC
95	POX10Ra	16	CATCTGGCCGTGCGTC
96	POX10Rb	17	GAGCGTGGTGATGTCCG
97	POX10Rc	21	CAGGTTGCTCTACAGATCCCG
98	POX10Rd	21	AAACATGTAGCGCTCCACAAC
99	POX10Re	17	GGGTCACTCAGCAGGGC
100	POX11R	19	CATATCGCTCCACGACCTTT
101	POX12Ra	19	CTTGAACGCCTGGATGAGC
102	POX12Rb	17	GCGAGCGTGGTGATGTC
103	POX12Rb	17	GCGAGCGTGGTGATGTC
104	POX13R	20	CATGAAAGTGATGAGATGGC
105	POX14R	24	GATGCAAGGAGTATAGTGCAAATG
106	K01	20	GGSGGGGTGGGGAAGACSAC
107	K02	20	GGWGGGGTTGGGAAGACWAC
108	K03	20	GGSGSGTGGGTAARACDAC
109	K04	20	GGTGGCGTGGGCAAGACDAC
110	K05	20	GGGGGSATGGGYAARACDAC
111	K06	20	GGHGGGATGGGGAARACDAC
112	K07	20	GGVGGVYTNGGCAARACDAC
113	K08	20	GGVGGVTCNGGSAARACDAC
114	K09	20	GGVGGVGTNGGSAARAGYAC
115	K10	20	GGVGGVATHGGSAARACDAC
116	HD01	18	GAGGGCGAGGGGGAGGCC

Devamı arkada

Çizelge 3.3'ün Devamı

117	HD02	19	CCAACGCCAATGGAAGACC
118	HD03	18	AAGNCTAARGGGAGGGCC
119	HD04	18	GAGCGCCARCGGGAGGCC
120	HD05	18	GAGVGCGAAGGGGAGGCC
121	HD06	18	GAGVGCCARCGGNGAGCC
122	HD07	18	GAGVGCCARSGGRTGGCC
123	HD08	18	GAGVGCCARSGGYTTGCC
124	HD09	18	GAGVGCCARSGGRTTGCC
125	HD10	18	HTAVGCCARKGGRTTGCC

R=A,G; Y=C,T; K=G,T; S=C,G; W=A,T; H=A,C,T; V=A,C,G; D=A,G,T; N=A,C,G,T

3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, polymerase chain reaction)

Daha önceki araştırmalarda uygulanmış olan PCR teknikleri (protokolleri) (Kim vd 2007, Mutlu vd 2006, Gulsen vd 2007) bu çalışmada denenerek en iyi sonucu veren miktar ve oranlar ile program çalıştırılarak optimize edilmiştir.

Bireysel DNA örnekleri, PCR reaksiyonunda kullanmak amacıyla 0.5 ml' lik PCR tüplerine 1'er µl konulmuştur. PCR tüplerinin reaksiyon hacmi toplam 15 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar ve miktarları aşağıda verilmiştir.

- 1 örneklik reaksiyon karışımı;
- 5,35 µl Steril distile su,
- 1,5 µl 10 X Buffer,
- 2 µl MgCl₂,
- 1 µl dNTPs,
- 2'şer µl F ve R primer,
- 0,15 µl Taq Polimeraz

PCR uygulamaları için MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler marka cihaz kullanılmıştır. Öncelikle her PCR tüpüne 1 µl DNA ve 2'şer µl forward ve reverse primer konulmuş, daha sonra hazırlanan reaksiyon karışımı (master mix) her bir PCR tüpüne paylaştırılmıştır (10 µl + 1 µl DNA + 2 µl F-primer + 2 µl R-primer).

PCR programı, ayrılma (denaturasyon: DNA iplikçiklerinin ayrılması), yapışma (annealing: primerlerin DNA zincirindeki komplementer olan bölgelere yapışması) ve uzama veya sentez (extention: DNA' ya yapışmış olan primer ile Taq polimeraz yardımıyla DNA zincirinin sentezlenmesi) aşamalarından oluşmaktadır.

Genel olarak denaturasyon sıcaklığı 90-95 °C, annealing sıcaklığı 30-60 °C ve extention sıcaklığı 70-75 °C arasında değişmektedir. Bu çalışmada uygulanacak olan döngü sıcaklık ve süreleri aşağıda verilmiştir.

95 °C 4 dakika		
95 °C 1 dakika		
45 °C 1 dakika	}	5 döngü
72 °C 1:15 dakika		
95 °C 1 dakika		
50 °C 1 dakika	}	35 döngü
72 °C 1:15 dakika		
72 °C 10 dakika		

Yukarıdaki şekilde döngüler tamamlanmış ve son olarak 72 °C’de 10 dakika bekletilerek PCR bitirilmiştir. PCR’dan sonra tüpler yani PCR ürünleri elektroforez işlemine kadar 4 °C’de kapakları parafilm ile sarılarak saklanmıştır.

3.2.5. Elektrolit çözeltisi

Elektroforezde tampon çözeltisi olarak Tris-Acetate-EDTA (EthylenDinitriloTetraAceticacid) (TAE) kullanılmıştır. Bu çözelti pH:8.0 olacak şekilde ve 50X yoğunluğunda hazırlanarak 1 lt suda çözündürülmüştür. Bu stok çözeltiden 20 ml alıp saf su ile 1 lt’ye tamamlanmış ve böylece elektroforez için 1X’lik TAE tamponu hazırlanmıştır. Aşağıda bu çözeltinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir;

- 242 gr Tris base (0,5 M)
- 51,1 ml Glacial Asedic Asit
- 100 ml EDTA (0,5 M, pH: 8.0)

3.2.6. Jelin hazırlanması

PCR’da elde edilen DNA parçalarını elektroforezde birbirinden ayırmak için agaroz jel (Bio Basic Inc.) kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda %2’lik agaroz jel en uygun oran olarak görülmüştür. Agaroz, TAE tampon çözeltisi ile bir erlen mayerde, homojen bir karışım olması amacıyla ara ara karıştırılarak, mikrodalgada 2-3 dakika ısıtılarak hazırlanmıştır.

Jel kalıbına jele DNA yüklenebilmesi için gerekli olan kuyucukları oluşturması amacıyla taraklar yerleştirilmiştir. Soğutulan 100 µl jel içine bantların UV ışık altında görülmesini sağlayan 3 µl Ethidium Bromide eklenmiş ve jel kalıbına hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Jel tamamen donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmış ve elektroforez tankının içine, jelin üst kısmını kapatacak kadar elektrolit çözeltisi dökülmüştür.

3.2.7. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi

15 µl PCR tüplerinin içine DNA fragmentlerinin UV ışığı altında görüntülenebilmesi için 3 µl dye eklenmiş ve mikropipet yardımıyla karıştırılarak boyanmıştır. Boyanmış olan DNA fragmentlerinin içeren bu karışım jeldeki kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir.

Bantların baz çifti olarak uzunluklarının tahmin edilebilmesi amacıyla stveart olarak Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder kullanılmıştır. Bu markerdan 1 µl alınarak jele yüklenmiş ve 100 V'da 2,5-3 saat elektroforezde yürütülmüştür. Böylece RGA, peroksidaz ve WRKY bantlarının jel içerisinde, elektriksel ortamda moleküler büyüklüklerine göre sıralanıp ayrılması sağlanmıştır.

Elektroforez uygulaması sonucunda bantlara ait en iyi görüntüler elde edebilmek için; jelin yoğunluğunu, elektrik ekimını ve elektroforez süresini optimize etmek gerekmektedir. Bu amaçla yapılan birçok deneme sonucunda yukarıda belirtilen koşullar doğrultusunda çalışma devam ettirilmiştir.

3.2.8. Bant fotoğraflarının elde edilmesi

2,5-3 saatlik sürenin sonunda bantların birbirinden tam anlamıyla ayrıldığından emin olunduktan sonra jelin DNR bio-imaging systems-Mini Lumi marka UV görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.9. Jelden DNA izolasyonu

İzolasyonda Thermo Scientific marka GeneJET Gel Extraction Kiti kullanılmıştır. UV ışığı altında minumum jel fazlalığı ile bantlar jilet yardımıyla kesilerek 1.5 ml tüplere konulmuş ve ağırlıkları not edilmiştir. Jel parçalarının üzerine 1:1 hacimde Binding Buffer eklenmiştir. Jel eriyene kadar 50-60 °C'de 10 dakika süreyle su banyosunda bekletilmiştir. Tamamen eriyen sıvı GeneJeT column içine aktarılmış ve 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı uzaklaştırılmış ve üzerine 700 µl Wash Buffer eklenmiştir. 1 dakikalık santrifüjden sonra alt kısım uzaklaştırılmış ve column boş olarak 1 dakika süreyle tekrar santrifüj edilmiştir. Column 1.5 ml tüplere aktararak üzerine 50 µl Elution Buffer eklenerek 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alttaki kısım sekans analizleri için -20 °C'de bekletilmiştir. Elde edilen ürünler sekans analizleri için Iontek firmasına gönderilmiştir (Iontek AŞ, İstanbul, Türkiye).

3.2.10. Bantların değerlendirilmesi ve sekans analizleri

RGA, peroksidaz ve WRKY transkripsiyon faktörleri genlerine ait bantları çekilen jel fotoğrafları incelenerek değerlendirilmiş ve mevcut bantlar 1, olmayan bantlar ise 0 olacak şekilde bir veri matrisi oluşturulmuştur. Elde edilen veri matrisi kullanılarak benzerlik oranı ve polimorfizm oranı gibi istatistikler Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) version 2.1 bilgisayar programı (Exeter Software, Setauket, N.Y., USA) (Rohlf 1993) ile analiz edilmiştir. Genotipler arasındaki ilişkileri gösteren genetik benzerlik matriksi dendogram oluşturmak amacıyla SAHN modülü altında yeralan UPGMA metoduna göre yapılmıştır.

Sekansların ise GENBANK'ta BLAST analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *Lens* Miller Cinsinde Dayanıklılık Gen Analogları (RGA)

Araştırmada değerlendirilen RGA bant modelleri *Lens* cinsi içerisinde bulunan yabani ve kültür formlarını temsil eden 32 genotipe aittir. Öncelikle polimorfizm sağlayan primer kombinasyonları her türden alınan temsili 2'şer genotipten oluşturulan bulk DNA ile bulunmuştur. Bu bulk ile toplam 123 RGA primer kombinasyonu denenmiş ve bunlar içerisinde en yüksek sayıda bant veren 14 primer kombinasyonu seçilmiştir. Seçilen primer kombinasyonları 32 genotipin her birinde tekrarlanmıştır. Bu primerler ve verdikleri bantların sayı ve yaklaşık uzunlukları Çizelge 4.2'de verilmiştir.. 1, 4, 10, 11, 16, 18, 20, 21, 23 ve 29 numaralı genotipler PCR sonucu iyi ürün vermediklerinden dolayı analizlere dahil edilmemiştir. Yeni genotip sırası EK 1'de verilmiştir.

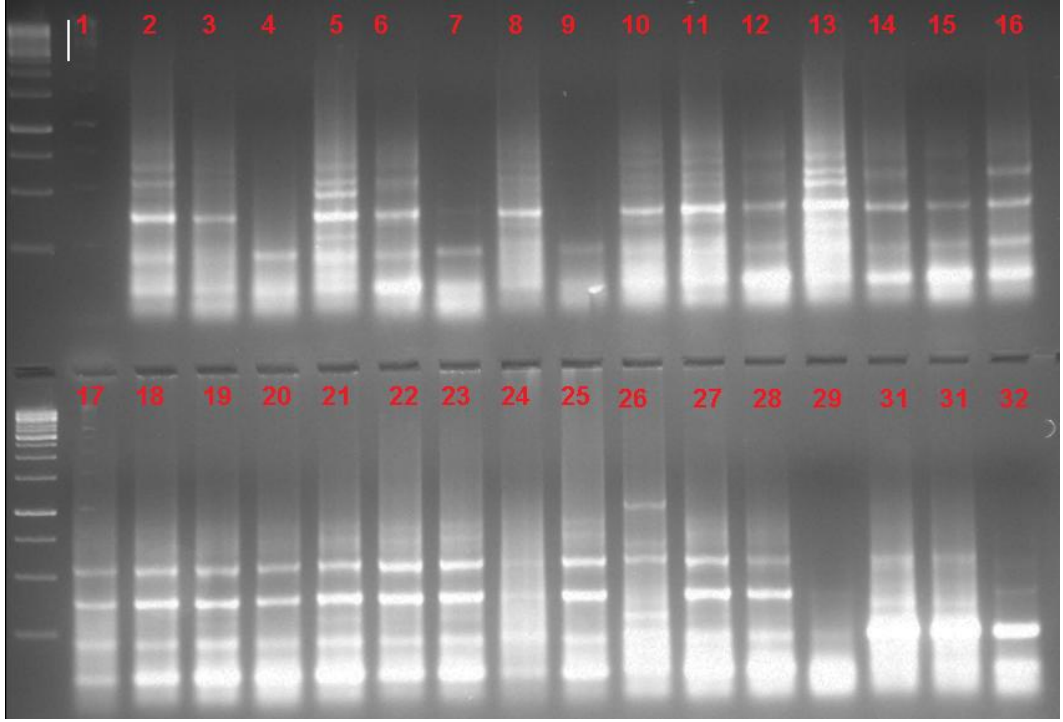
Çizelgede 4.2'de görüldüğü gibi, kullanılan primerler yardımıyla elde edilen bantların uzunlukları genel olarak 50-1500 bp aralığında değişmektedir. S2-INV/AS3-INV primer kombinasyonu toplam 12 ile en fazla bant sayısına ve LM 637/LM 638 primer kombinasyonu ise 5 ile en az bant sayısına sahiptir. Tüm primerler toplamda 103 bant meydana getirmiştir. Bunların 18'i monomorfik olup 85'i ise polimorfiktir. Polimorfizm oranı %83'dür (Çizelge 4.1).

K03HD01 primer kombinasyonu ile, tüm genotiplerde 50-1000 bp aralığında 7'si polimorfik olmak üzere toplam 10 bant elde edilmiştir. 190 bp ve daha düşük bölgede 3 bantın tüm genotiplerde monomorfik olduğu görülmüştür. Diğer bantlarda ise polimorfizm saptanmıştır. Bu primer kombinasyonunun meydana getirdiği polimorfizm oranı %70'dir (Şekil 4.1).

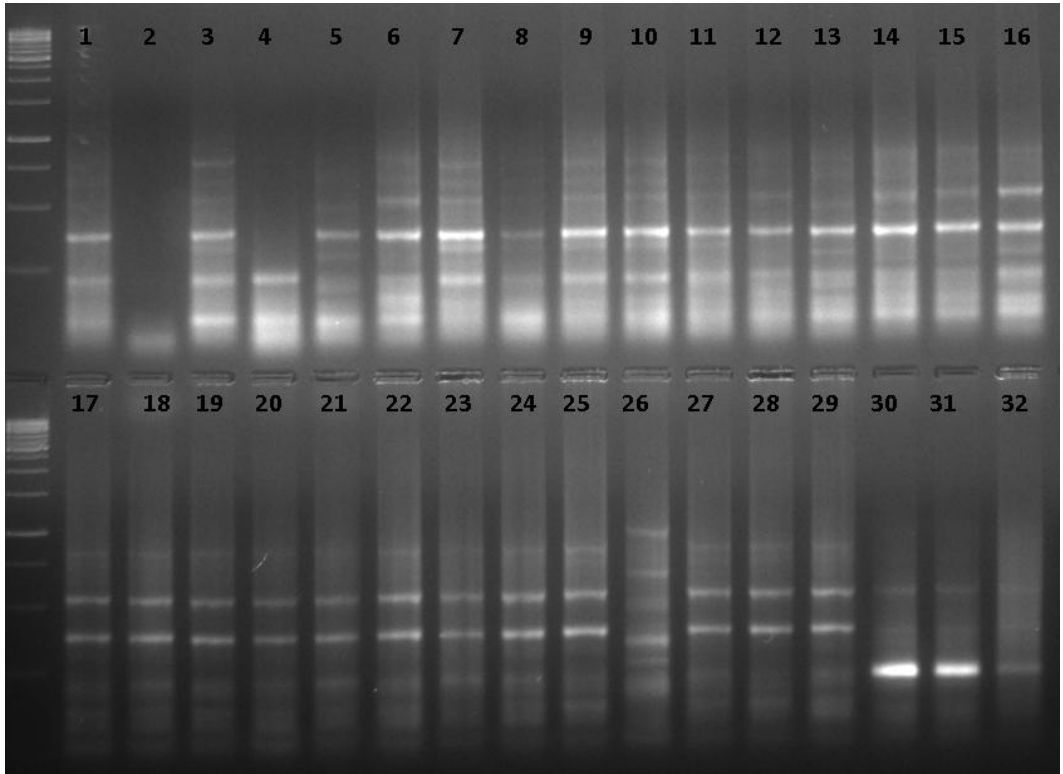
K04HD01 nolu primer kombinasyonunun kullanılmasıyla tüm genotiplerde elde edilen toplam 7 bant 150-950 bp aralığına yayılmış ve bu bantların 5'i polimorfik bulunmuştur. Bu aralıklarda mevcut 2 bantın monomorfik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Seçilen RGA primerlerinin polimorfizm oranları

Sayı	Primer Kombinasyonu	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)
1	K03/HD01	3	7	10	70
2	K04/HD01	2	5	7	71
3	K05/HD01	2	5	7	71
4	K06/HD02	2	4	6	67
5	K06/HD03	1	5	6	83
6	K06/HD06	1	6	7	86
7	K07/HD03	1	6	7	86
8	K07/HD10	2	3	5	60
9	K08/HD03	1	6	7	86
10	K10/HD03	2	5	7	71
11	LM 637/LM 638	1	4	5	80
12	XLRR F-R	0	7	7	100
13	S2-INV/AS3-INV	0	12	12	100
14	Xa1-NBS F-R	0	10	10	100
Toplam		18	85	103	83



Şekil 4.1. K03HD01 primer kombinasyonunu ait bant görüntüsü



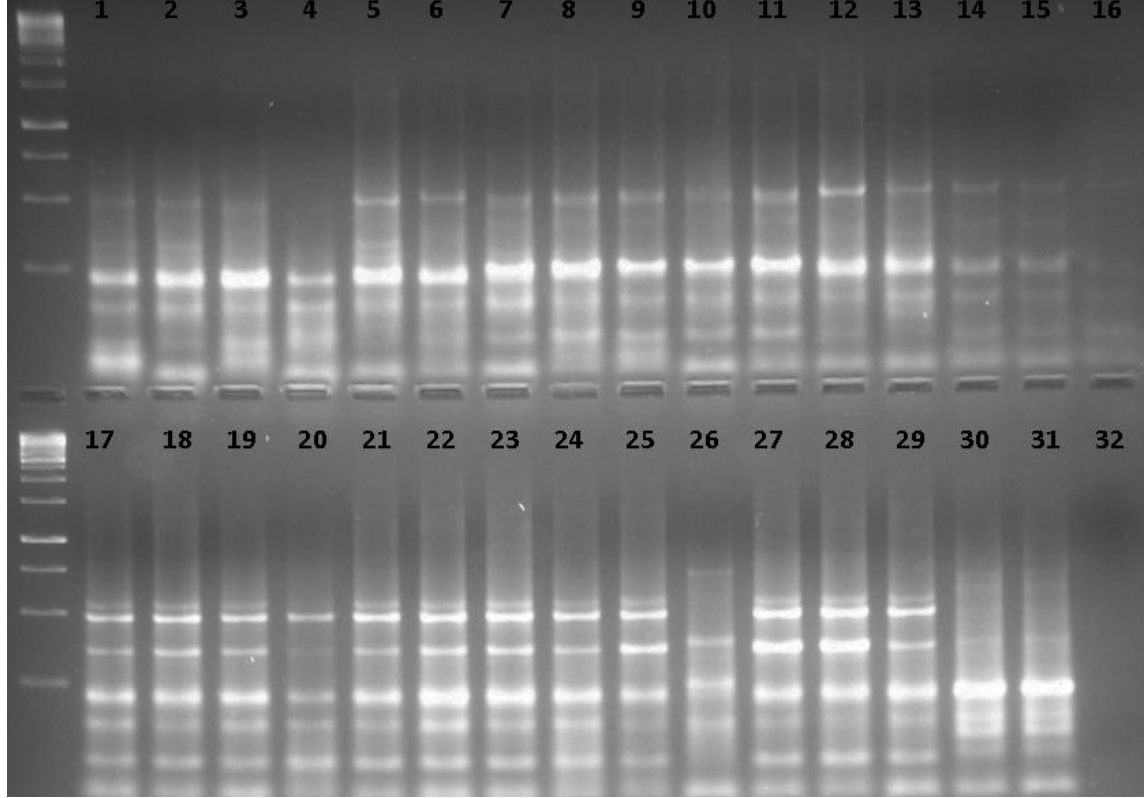
Şekil 4.2. K04HD01 primer kombinasyonunu ait bant görüntüsü

Çizelge 4.2. Kullanılan RGA primerleri ile elde edilen bant sayısı ve uzunlukları

Sayı	Primer Kombinasyonu	Bant Aralığı (bp)	Genotipler																															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	K03/HD01	50-1000	3	6	3	3	8	5	3	6	3	9	10	4	9	5	5	5	6	5	5	5	6	6	8	6	7	6	6	8	4	5	5	4
2	K04/HD01	150-950	5	.	6	2	4	6	7	3	7	7	5	4	7	6	6	6	5	5	5	5	5	5	5	7	5	5	6	5	4	4	4	
3	K05/HD01	200-1000	4	4	6	2	5	4	6	6	6	5	7	5	3	6	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	6	5	5	4	2	5	4
4	K06/HD02	200-1000	4	3	4	.	6	6	6	5	5	5	6	5	6	5	4	4	5	5	6	6	6	6	6	6	5	4	5	5	4	5	5	5
5	K06/HD03	210-1400	4	4	2	1	3	3	3	6	4	3	2	1	4	4	4	4	3	4	4	4	6	3	4	3	4	4	3	4	6	2	2	4
6	K06/HD06	150-1010	4	4	5	2	4	7	3	6	3	4	7	7	2	4	4	4	3	5	6	6	6	6	.	6	5	4	5	5	5	4	4	6
7	K07/HD03	200-800	4	4	3	1	3	4	3	3	0	3	2	5	3	2	2	2	1	7	4	3	3	4	7	1	1	2	3	3	4	5	3	2
8	K07/HD10	200-1300	4	3	4	.	5	4	5	3	3	5	4	5	4	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
9	K08/HD03	200-1450	1	2	2	1	7	6	4	6	1	7	6	5	5	2	2	3	2	.	3	4	3	4	3	3	3	5	5	5	4	4	2	2
10	K10/HD03	100-1400	5	5	4	2	7	4	5	6	6	5	5	5	5	5	4	3	5	5	5	5	5	6	6	5	5	5	6	6	5	5	5	.
11	LM 637/LM 638	230-800	2	3	3	1	2	2	1	1	1	1	2	4	2	1	5	1	3	3	3	3	3	5	5	4	3	2	3	3	4	3	3	3
12	XLRR F-R	190-1450	7	7	1	2	5	6	6	5	5	2	5	6	5	2	4	4	3	4	4	4	3	4	3	6	6	4	5	.	4	3	4	4
13	S2-INV/AS3-INV	270-1500	6	9	6	3	9	8	10	9	11	2	9	5	6	7	5	4	11	6	10	7	4	10	5	6	8	6	12	6	8	5	11	3
14	Xa1-NBS F-R	300-1050	6	8	4	.	6	7	6	10	7	6	7	9	5	7	7	8	7	7	7	7	7	7	7	5	6	3	6	6	7	5	5	4

K06HD03 primer kombinasyonu 210-1400 bp aralığında toplam 6 bant vermiştir. 210 bp bölgesinde bulunan 1 bant hepsi monomorfiktir. Diğer 5 bantta ise polimorfizm gözlenmiştir. Bu primer kombinasyonunda polimorfizm oranı %83 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

K07HD03 primer kombinasyonu kullanılarak, 6'sı polimorfik olmak üzere toplam 7 bant elde edilmiş ve bu bantlar 200-800 bp aralığına yayılmıştır (Çizelge 4.2).

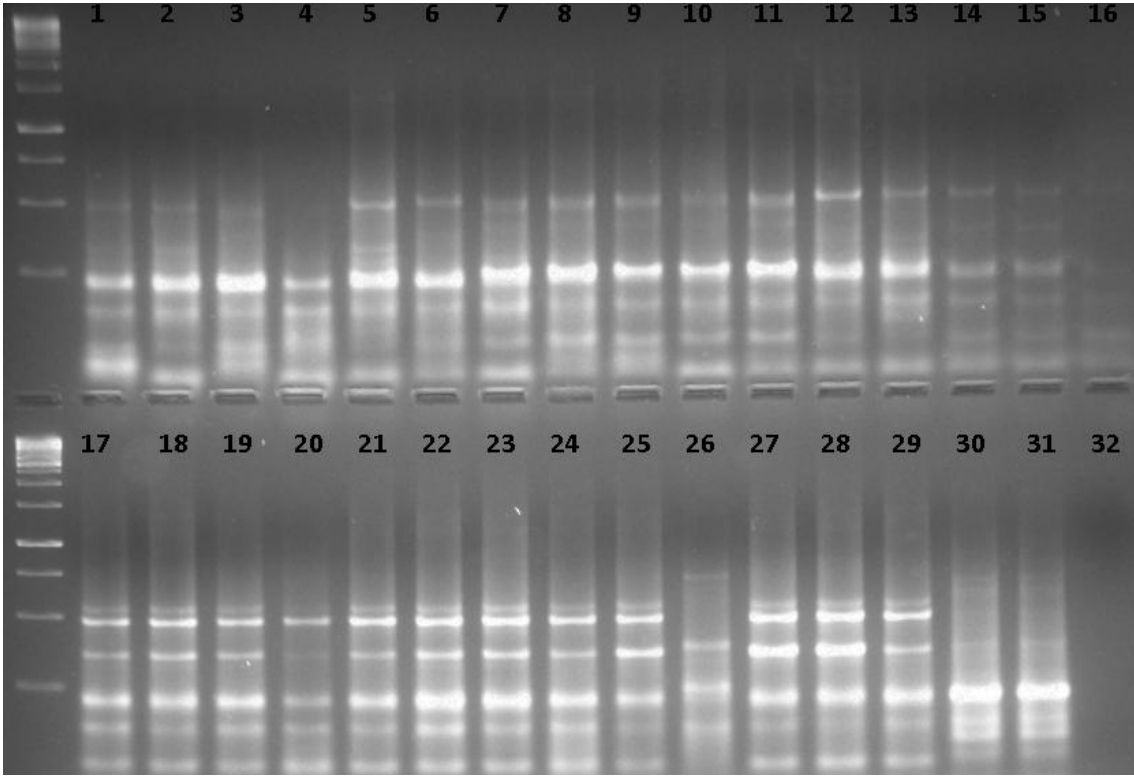


Şekil 4.3. K10HD03 primer kombinasyonuna ait bant görüntüsü

K10HD03 primer kombinasyonunun kullanılmasıyla 100-1400 bp aralığında elde edilen toplam 7 banttan 5'inin polimorfik olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

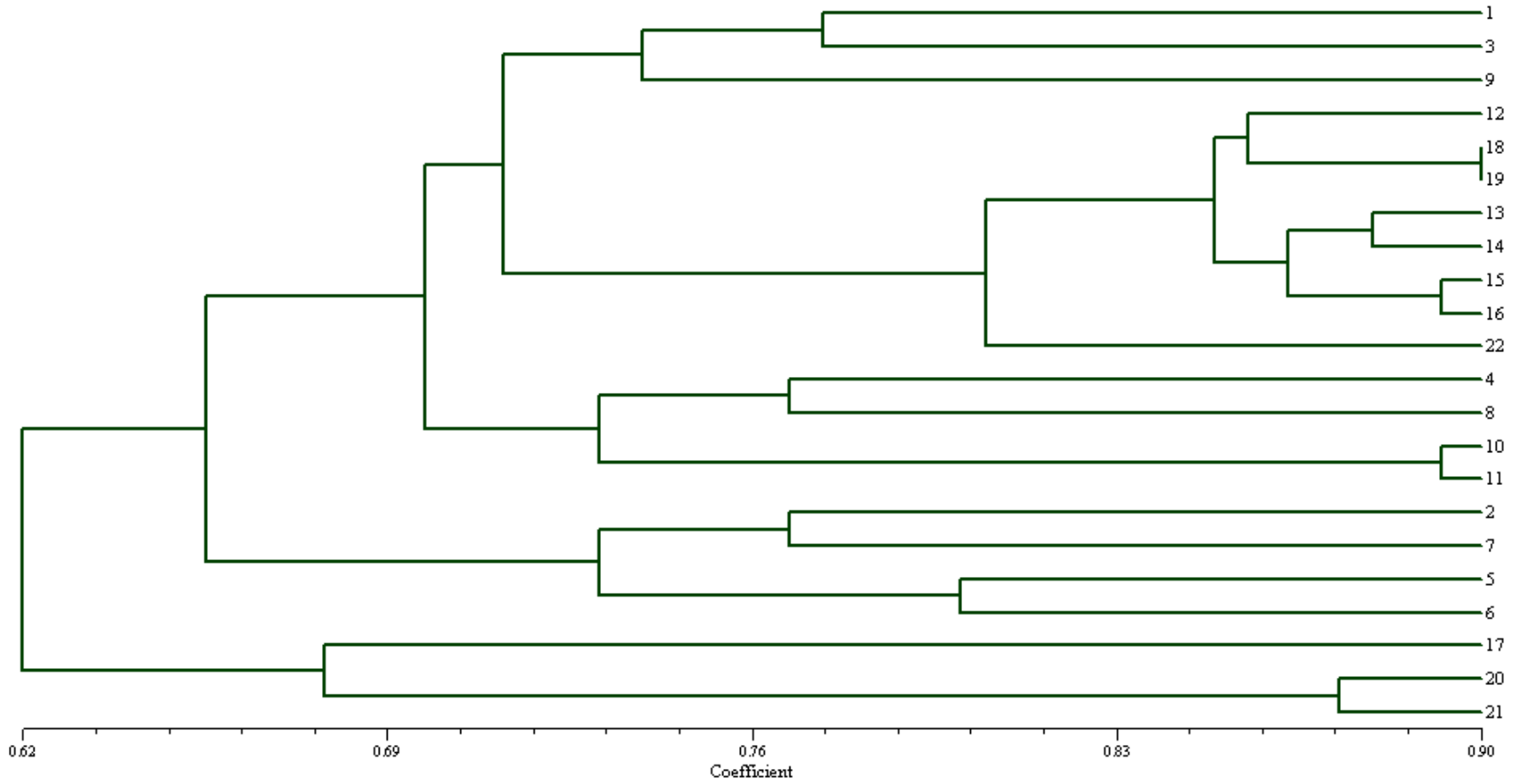
LM637-638 primer kombinasyonu ile 230-800 bp aralığından toplam 5 bant elde edilmiştir. 230 bp bölgesinde bulunan 1 bantın monomorfik olduğu gözlenmiştir. Diğer bantlarda ise polimorfizm saptanmıştır. Polimorfizm oranı ise %80'dir (Çizelge 4.1).

S2INV-AS3INV primer kombinasyonu 270-1500 bp aralığında hepsi polimorfik olmak üzere toplam 12 bant vermiştir (Şekil 4.4).

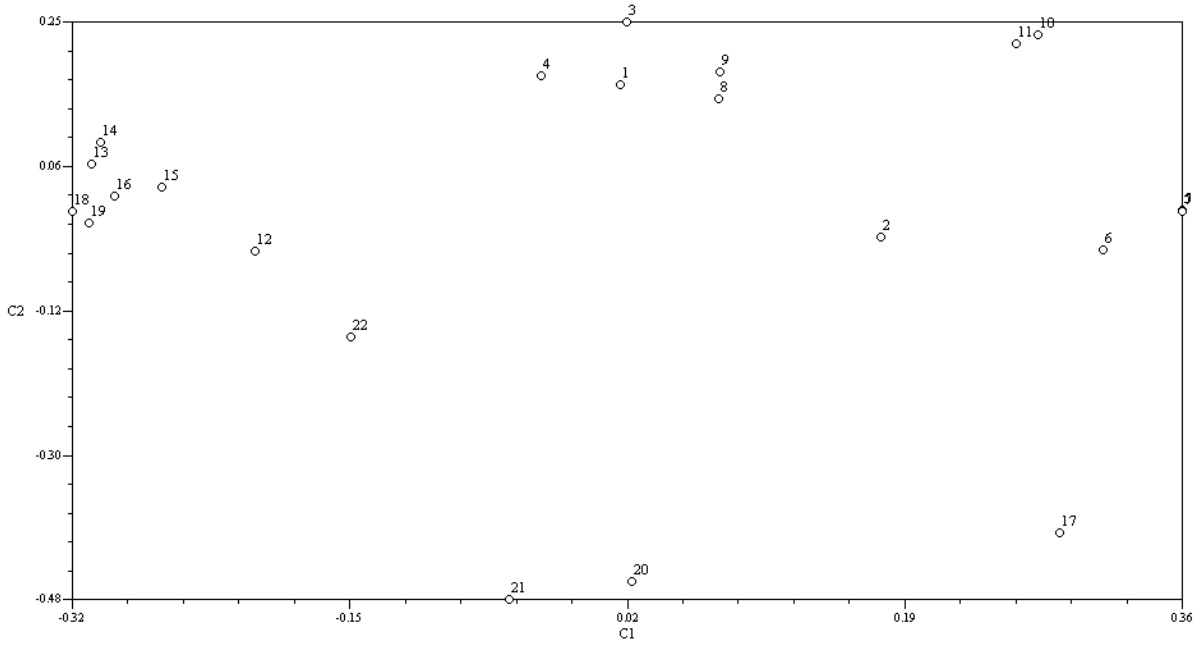


Şekil 4.4. S2INV/AS3INV primer kombinasyonuna ait bant görüntüsü

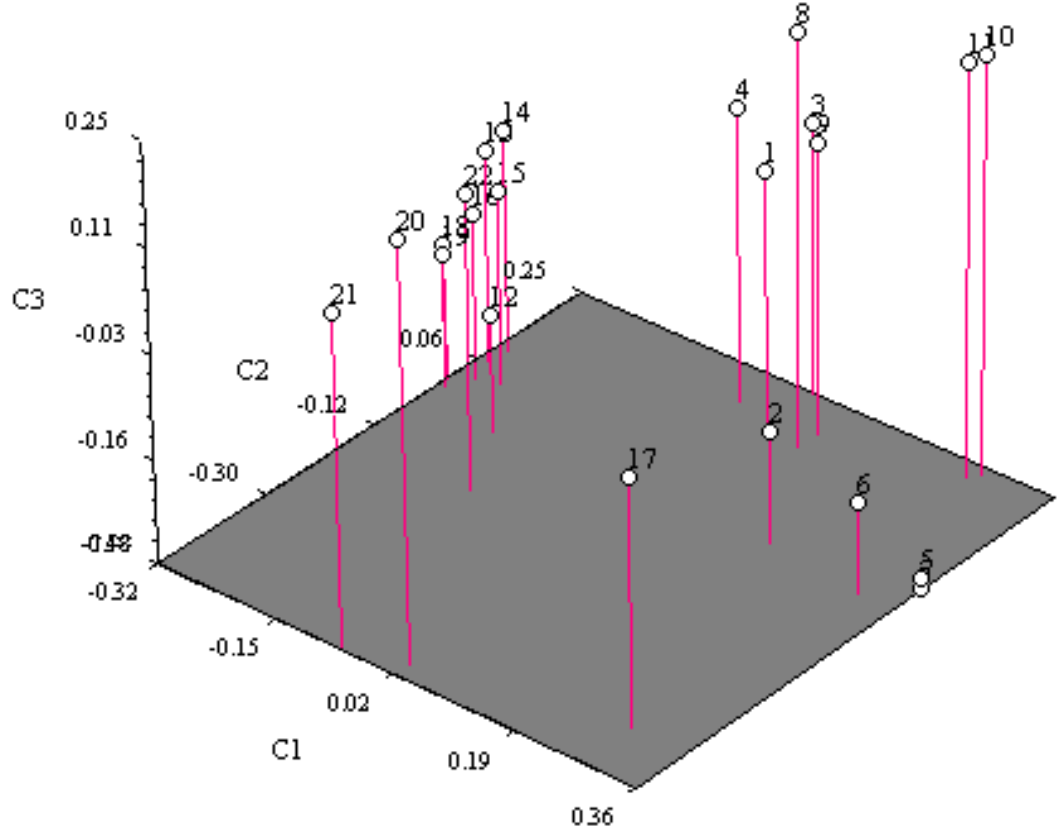
NTSYS-pc programı kullanılarak RGA primerleri ile elde edilen dendrogram sonucu türler arasındaki benzerliğin 0.62 ve 0.90 (0.76) arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Oluşturulan filogenetik ağaçta türler arasında dayanıklılık gen analogları bakımından yoğun bir polimorfizm göze çarpmaktadır. Bu şekil incelendiğinde mercimek cinsi içerisindeki türlerle kıyaslandığında *Vicia montbretii* türüne ait olan genotiplerin genetik ilişki ağacında uzak bir kol oluşturduğu görülmüştür. Kültür formu olan *Lens culinaris* subsp. *culinaris*'e atasal formu olan *Lens culinaris* subsp. *orientalis* türüne ait olan genotiplerin kısmen yakın bir kolda bulunduğu görülmektedir. Bu genotipler aynı kolda toplanmıştır. *Lens culinaris* subsp. *odemensis*'e ait olan genotipler aynı veya yakın kollarda bulunmaktadır. RGA markılarıyla oluşturulan 2 boyutlu temel bileşen analizine göre oluşturulan grafikte tek genotip olarak temsil edilen *Lens culinaris* subsp. *culinaris* diğer türlerden uzak bir bölgede bulunmaktadır. *Vicia montbretii*'ye ait olan 2 genotip diğer türlerden uzak bir küme meydana getirmiştir (Şekil 4.6). 3 boyutlu temel bileşen analizine göre oluşturulan grafik ve türlerin dağılımı Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.5. RGA markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia montbretii* taxonlarına ait genetik ilişki ağacı



Şekil 4.6. Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia montbretii* taksonlarına ait genetik ilişki



Şekil 4.7. Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia montbretii* taksonlarına ait genetik ilişki

4.2. *Lens* Miller Cinsinde Peroksidaz Genleri

Bulk DNA ile toplam 22 peroksidaz primer kombinasyonu denenmiş ve bunlar içerisinde en yüksek sayıda bant veren 7 primer kombinasyonu seçilmiştir. Seçilen primer kombinasyonları 32 genotipin her birinde tekrarlanmıştır. Seçilen primerler ve verdikleri bantların sayısı ve yaklaşık uzunlukları Çizelge 4.4’de verilmiştir. 1, 4, 10, 11, 16, 18, 20, 21, 23 ve 29 numaralı genotipler PCR sonucu iyi ürün vermediklerinden dolayı analizlere dahil edilmemiştir. Yeni genotip sırası EK 1’de verilmiştir.

Çizelge 4.4’e göre, kullanılan primerler yardımıyla elde edilen bantların uzunlukları genel olarak 150-1250 bp aralığında değişmektedir. POX 3 ve POX 5 primeri toplamda 11 ile en fazla bant sayısına ve POX 7 primeri ise 7 ile en az bant sayısına sahiptir. Bütün primerler toplamda 1221 bant meydana getirmiştir.

Çizelge 4.3. Seçilen peroksidaz primerlerinin polimorfizm oranları

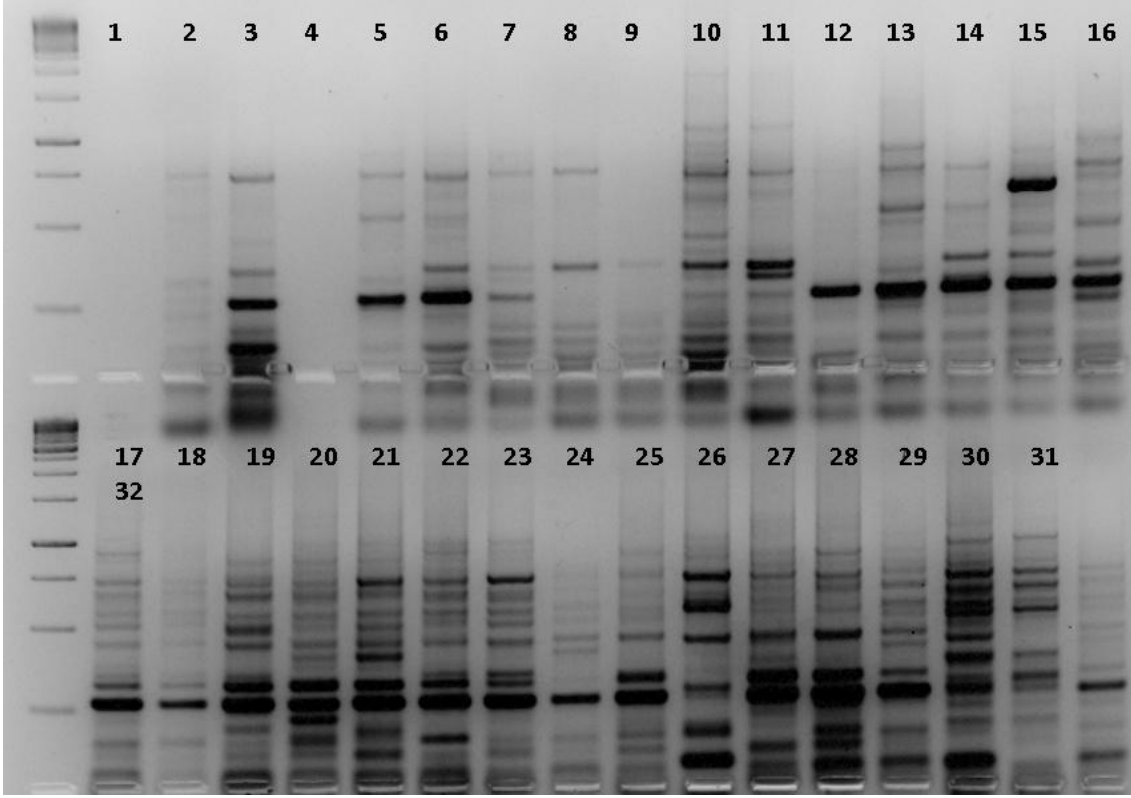
Sayı	Primer Kombinasyonu	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)
1	POX 1	1	8	9	89
2	POX 2	2	6	8	75
3	POX 3	1	10	11	91
4	POX 5	1	10	11	91
5	POX 7	0	7	7	100
6	POX 8c	2	8	10	80
7	POX 10	0	10	10	100
Toplam		7	59	66	89

Çizelge 4.4. Kullanılan peroksidaz primerleri ile elde edilen bant sayısı ve uzunlukları

Sayı	Primer Kombinasyonu	Bant Aralığı (bp)	Genotipler																															Polimorfizm Oranı (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	POX 1	150-1000	.	8	.	.	9	9	7	6	6	.	7	7	6	7	7	7	7	8	7	.	9	8	8	8	8	10	7	7	7	9	7	.
2	POX 2	270-1250	5	5	3	3	7	5	3	4	3	8	7	8	5	2	7	.	7	5	6	7	5	8	5	.	5	5	7	8	7	5	5	.
3	POX 3	230-1020	.	4	4	.	7	5	6	4	.	11	6	4	8	5	8	6	9	7	8	11	11	11	9	7	8	8	8	9	8	10	6	8
4	POX 5	230-1250	3	2	.	.	8	3	10	5	5	9	8	9	2	.	11	5	6	8	3	6	6	7	6	6	10	2	7	7	5	7	7	.
5	POX 7	210-920	3	.	4	.	6	.	2	6	6	7	8	.	3	3	2	.	2	3	3	2	4	3	1	3	4	3	2	2	3	7	7	2
6	POX 8c	210-1250	5	6	6	.	9	9	8	6	6	5	8	7	5	5	5	5	5	7	5	7	6	6	6	4	6	10	7	4	5	8	4	5
7	POX 10	200-1000	4	6	4	.	2	2	6	4	7	.	8	8	.	7	8	5	8	8	7	8	.	5	7	8	10	7	9	7	6	10	7	7

POX 1 primeri ile, 150-1000 bp aralığında 8'i polimorfik olmak üzere toplam 9 bant elde edilmiştir. 190 bp ve daha düşük bölgede 1 bandın tüm genotiplerde monomorfik olduğu görülmüştür. Diğer bantlarda ise polimorfizm saptanmıştır. Bu primer kombinasyonu için polimorfizm oranı %89 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

POX 2 primerinin kullanılmasıyla 270-1250 bp aralığında elde edilen toplam 8 banttan 6'sının polimorfik olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3).



Şekil 4.8. POX3 primerine ait bant görüntüsü

POX 3 primeri ile 230-1020 bp aralığından toplam 11 bant elde edilmiştir. 230 bp bölgesinde 1 bandın monomorfik olduğu gözlenmiştir. Diğer bantlarda ise polimorfizm saptanmıştır (Şekil 4.8).

POX 5 primeri ile 230-1250 bp aralığından toplam 11 bant elde edilmiştir. 230 bp bölgesinde bulunan 1 bandın monomorfik olduğu gözlenmiştir. Diğer 10 bantta ise polimorfizm saptanmıştır. Polimorfizm oranı ise %91'dir (Çizelge 4.3).

POX 10c primeri 200-1000 bp aralığında hepsi polimorfik olmak üzere toplam 10 bant vermiştir. Bu primer kombinasyonu için polimorfizm oranı %100'dür.

NTSYS-pc programı kullanılarak peroksidaz primerleri ile elde edilen dendrogram sonucu türler arasındaki benzerliğin 0.13 ve 0.62 (0.37) arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Şekilden anlaşıldığına göre türler arasında peroksidaz genleri bakımından yoğun bir polimorfizm vardır. Bu şekil incelendiğinde mercimek cinsi içerisindeki türlerle kıyaslandığında *Vicia montbretii* türüne ait olan genotiplerin genetik ilişki ağacında uzak bir kol oluşturduğu görülmüştür. Bu türe ait olan 2 genotip

aynı kolda çıkmıştır. *Lens culinaris* subsp. *odemensis* türüne ait olan genotipler yakın kollarda çıkmıştır. Bu genotiplerin *Lens lamottei* türüne ait olan genotiplere yakın bir kolda bulunduğu görülmektedir. Peroksidaz markırlarıyla oluşturulan 2 boyutlu temel bileşen analizi (PCA) grafiğinde kültür formu *Vicia montbretii* türüne ait olan genotiplere yakın bir bölgede bulunmaktadır. Aynı türü temsil eden genotipler birbiriyle aynı küme içinde fakat diğer türlerden uzak bir bölgede bulunmaktadır (Şekil 4.10). 3 boyutlu PCA grafiğine göre tüm genotiplerin oluşturduğu kümelenmeler şekil 4.11’de görülmektedir.

4.3. *Lens* Miller Cinsinde WRKY Genleri

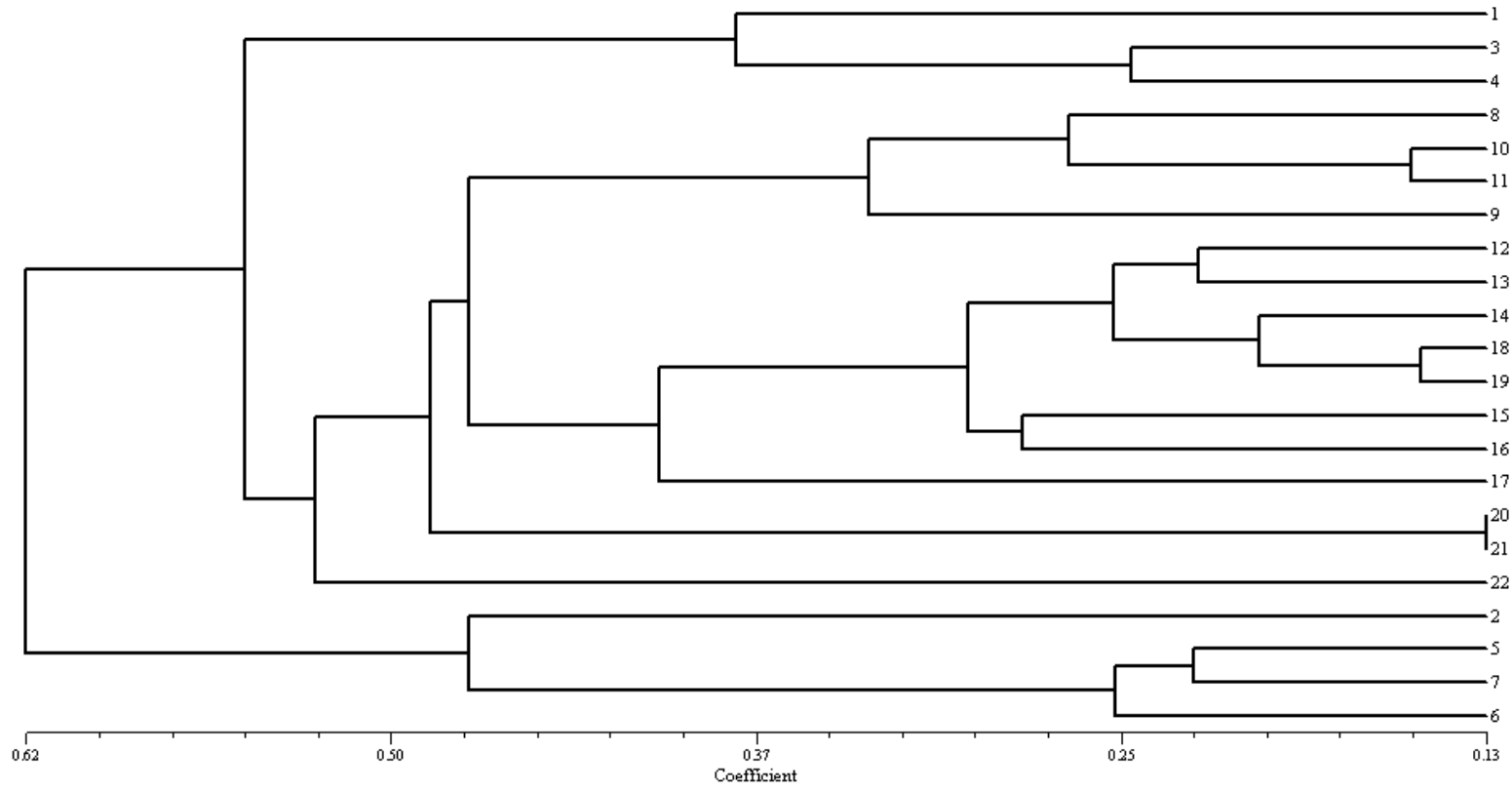
Bulk DNA ile toplam 10 WRKY primer kombinasyonu denenmiş ve bunlar içerisinde en yüksek sayıda bant veren 5 primer kombinasyonu seçilmiştir (Çizelge 4.5). 1, 4, 10, 11, 16, 18, 20, 21, 23 ve 29 numaralı genotipler PCR sonucu iyi ürün vermediklerinden dolayı analizlere dahil edilmemiştir. Yeni genotip sırası EK 1’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Seçilen WRKY primerlerinin polimorfizm oranları

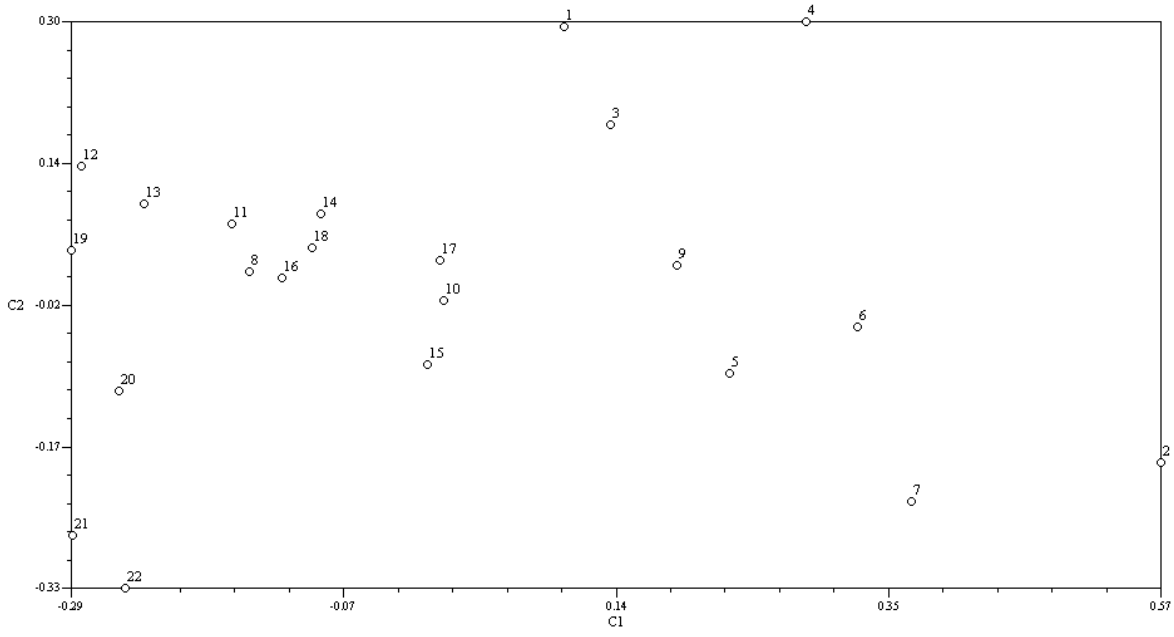
Sayı	Primer Kombinasyonu	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı (%)
1	G1	0	11	11	100
2	GII	2	10	12	83
3	GIII	2	10	12	83
4	WRKY 2-3	1	8	9	89
5	WRKY 3-3	0	8	8	100
Toplam		5	47	52	90

Çizelge 4.6. Kullanılan WRKY primerleri ile elde edilen bant sayısı ve uzunlukları

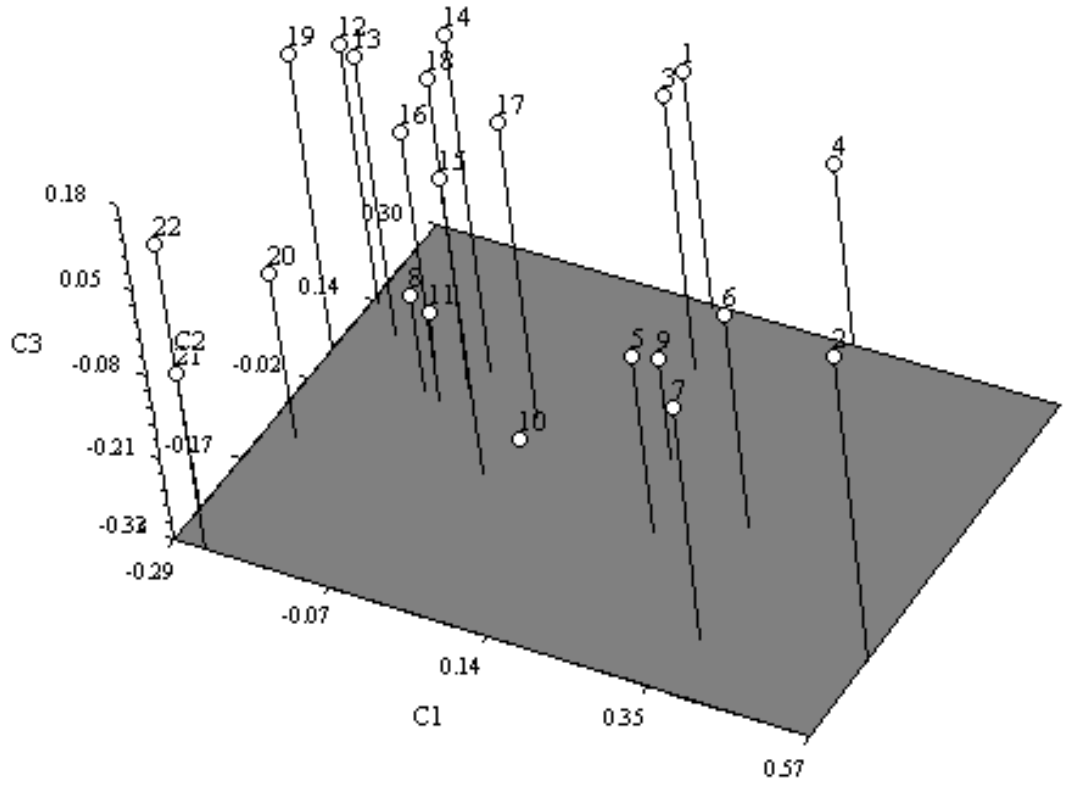
Primer		Bant Aralığı (bp)	Genotipler																															
Sayı	Kombinasyonu		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	GI	300-1450	1	7	6	0	3	3	5	5	8	11	9	1	6	8	7	5	1	8	1	5	6	9	7	7	3	6	6	7	0	7	6	8
2	GII	200-1100	3	2	7	4	5	5	8	6	7	8	9	9	7	4	2	7	3	6	5	10	12	10	2	7	5	9	6	6	7	9	9	5
3	GIII	250-1250	.	9	6	.	7	5	8	10	6	9	6	6	9	8	9	10	10	10	10	10	12	10	3	7	5	6	6	5	11	6	5	9
4	WRKY 2-3	250-1000	.	5	3	6	6	5	6	2	8	8	9	6	2	7	7	6	6	7	4	6	2	8	6	6	6	7	7	7	2	6	6	4
5	WRKY 3-3	270-1000	6	7	5	2	7	6	7	1	8	7	8	6	5	6	4	5	6	6	6	6	6	6	3	4	5	7	5	5	6	7	4	5



Şekil 4.9. Peroksidaz markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki ağacı



Şekil 4.10. Temel bileşenler analizine (PCA) göre peroksidaz markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki



Şekil 4.11. Temel bileşenler analizine (PCA) göre peroksidaz markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki

Çizelge 4.6’da görüldüğü gibi, kullanılan primerler yardımıyla elde edilen bantların uzunlukları genel olarak 200-1450 bp aralığında değişmektedir. GII ve GIII primerleri toplamda 12 ile en fazla bant sayısına ve WRKY 3-3 primer kombinasyonu ise 8 ile en az bant sayısına sahiptir. Bütün primerler toplamda 52 bant meydana getirmiştir (Çizelge 4.5).

GI primeri ile, 300-1450 bp aralığında hepsi polimorfik olmak üzere toplam 11 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı ise %100’dür (Çizelge 4.5).

GII primerinin kullanılmasıyla, 200-1100 bp aralığında toplam 12 bant elde edilmiştir. Bu bantların 2’si monomorfik, 10’u ise polimorfik olup polimorfizm oranı % 83 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12).

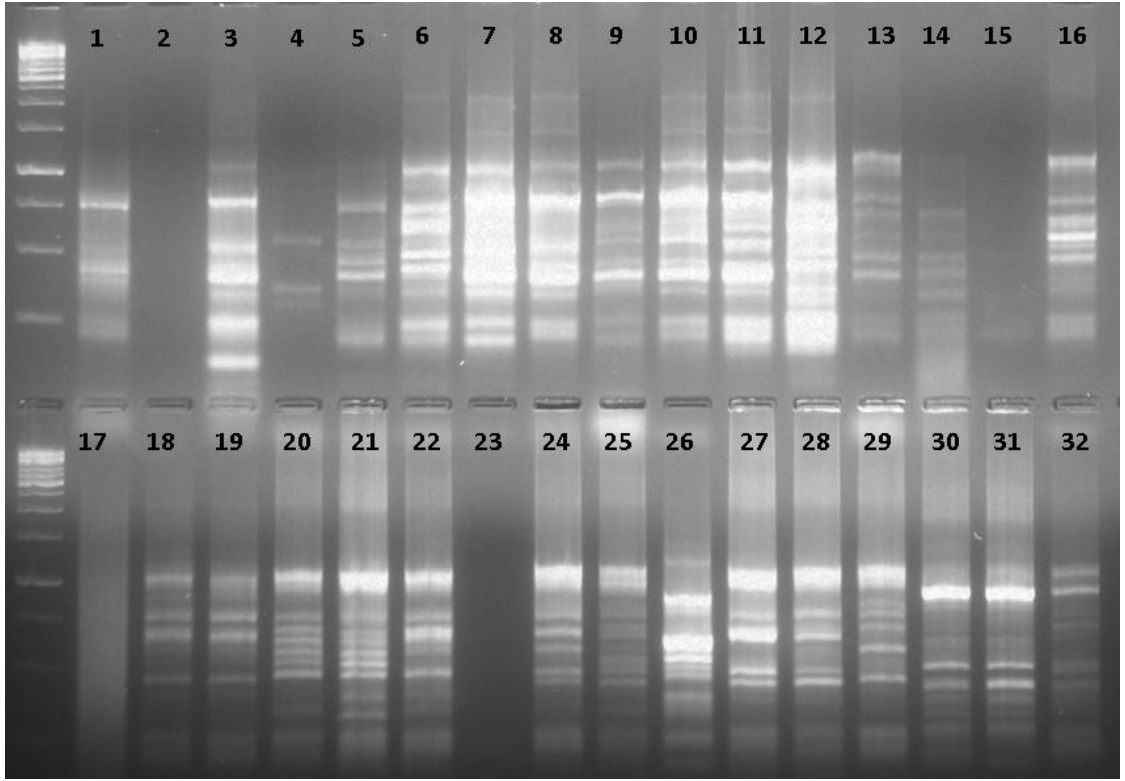
GIII primeri ile 250-1250 bp aralığında elde edilen toplam 12 banttan 10’unun polimorfik olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).

WRKY 2-3 primer kombinasyonu kullanılarak ile 250-1000 bp aralığından toplam 9 bant elde edilmiştir. 250 bp bölgesinde bulunan 1 bantın monomorfik olduğu gözlenmiştir. Diğer bantlarda ise polimorfizm saptanmıştır (Çizelge 4.6).

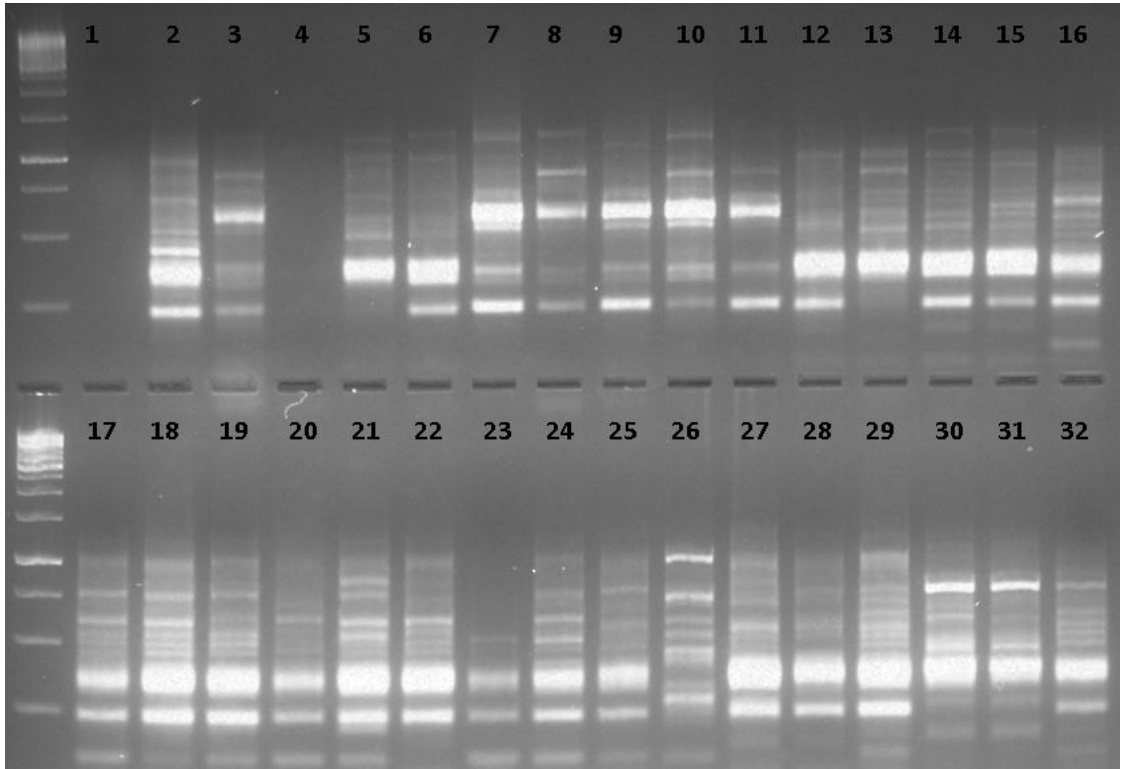
WRKY 3-3 primer kombinasyonu, 270-1000 bp aralığından toplam 8 bant vermiştir. Bu aralıkta elde edilen tüm bantların polimorfik olduğu gözlenmiştir. Polimorfizm oranı %100’dür.

NTSYS-pc programı kullanılarak WRKY primerleri ile elde edilen dendrogram sonucu türler arasındaki benzerliğin 0.07 ve 0.63 (0.35) arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.14). Dendrograma göre türler arasında WRKY genleri bakımından yoğun bir polimorfizm vardır. Kültür formu genotipine WRKY genleri bakımından en yakın genotiplerin *Vicia montbretii* türüne ait olan genotipler olduğu ortaya çıkmaktadır. WRKY markırlarıyla oluşturulan 2 boyutlu ve 3 boyutlu PCA grafiklerinde tüm genotiplerin oluşturduğu kümelenmeler ve türlerin diğer türlerle olan uzaklıkları Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da gösterilmiştir.

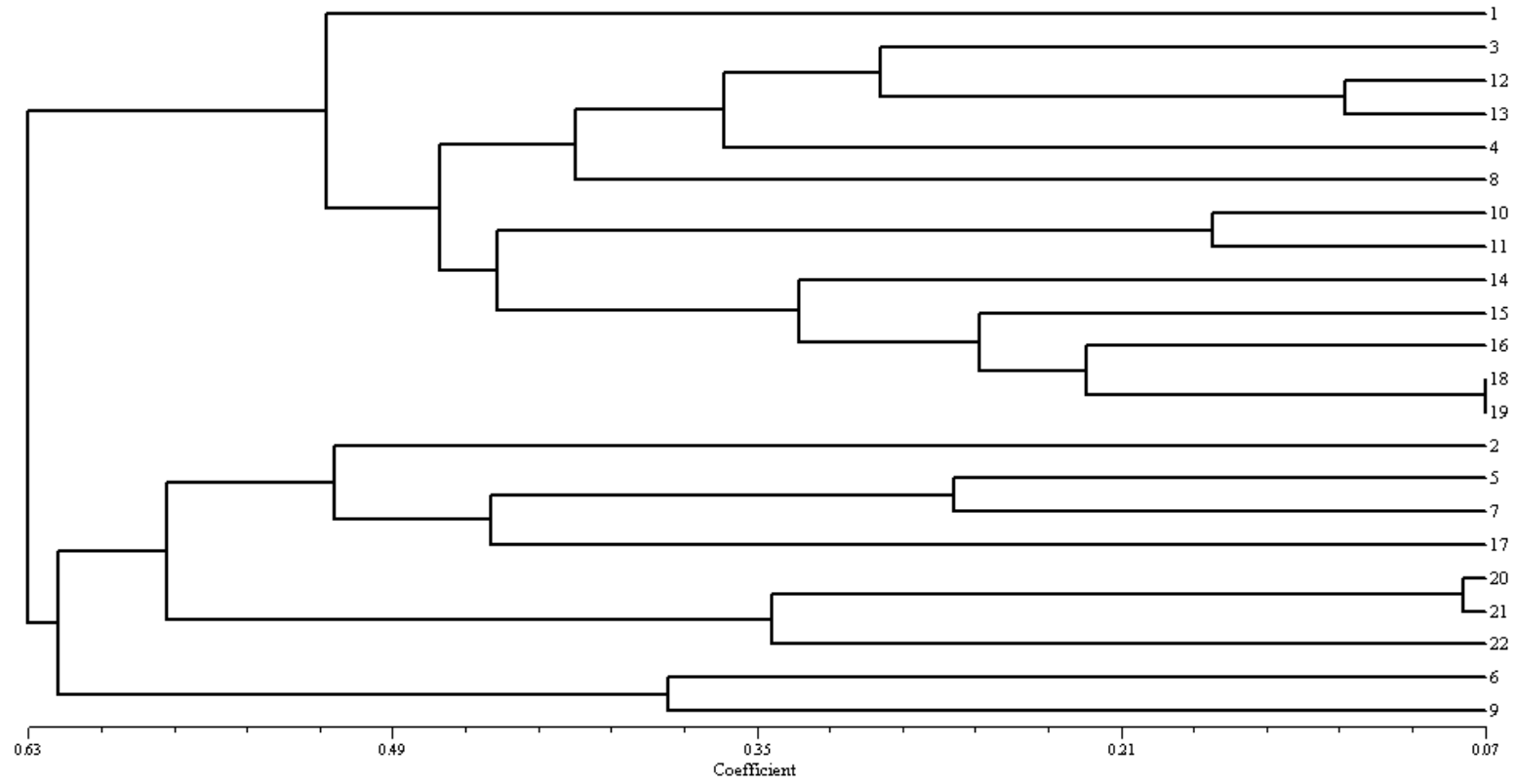
NTSYS-pc programında RGA, peroksidaz ve WRKY gen aileleri bütün olarak analizleri yapılmıştır. Bu filogenetik ağaç *Vicia montbretii* türüne ait olan genotipleri yine bir dış grup olarak değerlendirmiştir. *L. culinaris* subsp. *odemensis*, *L. culinaris* subsp. *tomentosus*, *L. nigricans* ve *L. ervoides* türlerine ait olan genotipler kendi içlerinde yakın dallarda bulunmaktadır (Şekil 4.17). Yine bu markırların hepsiyle oluşturulan 2 boyutlu ve 3 boyutlu PCA analizlerinde kültür formunu temsil eden genotip diğer türlerin oluşturduğu kümelerden bağımsız olarak tek başına yerleşmiştir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).



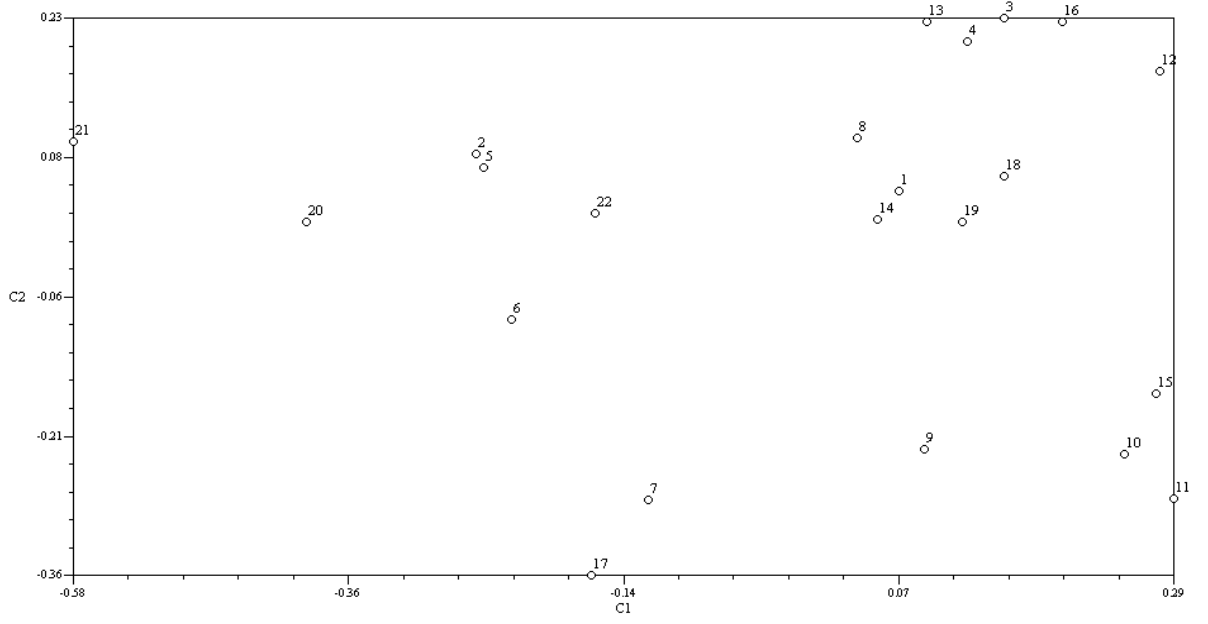
Şekil 4.12. GII primerine ait bant görüntüsü



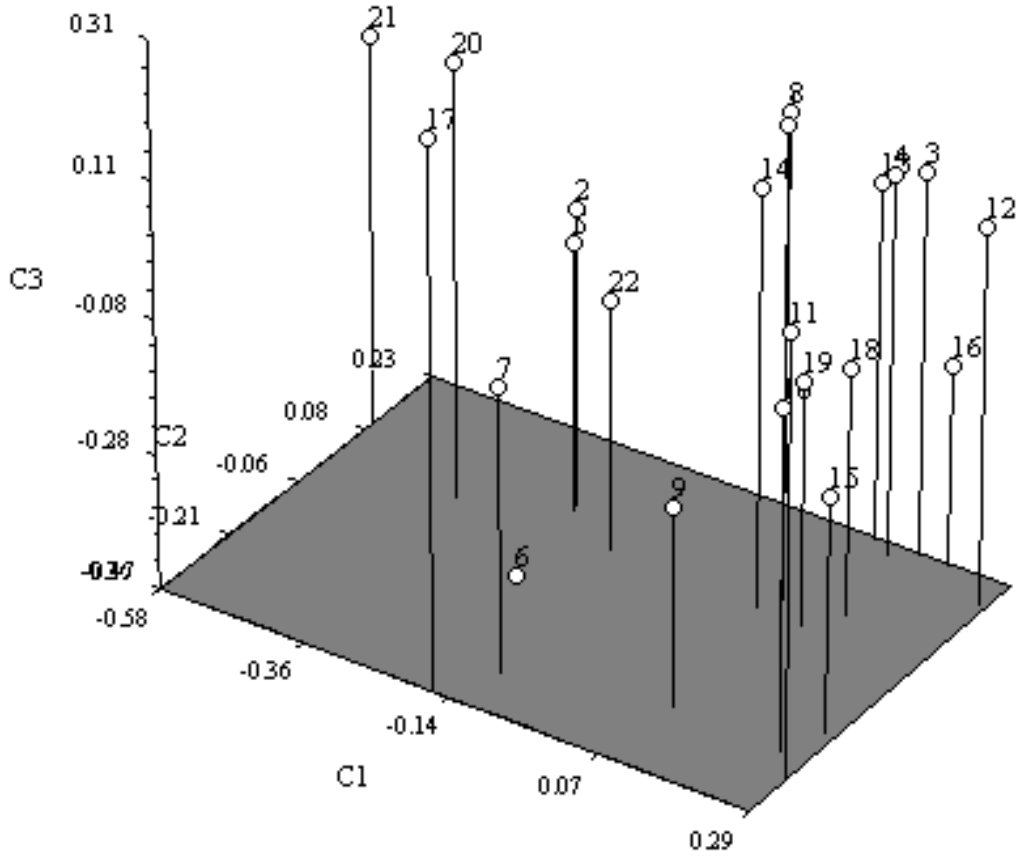
Şekil 4.13. GIII primerine ait bant görüntüsü



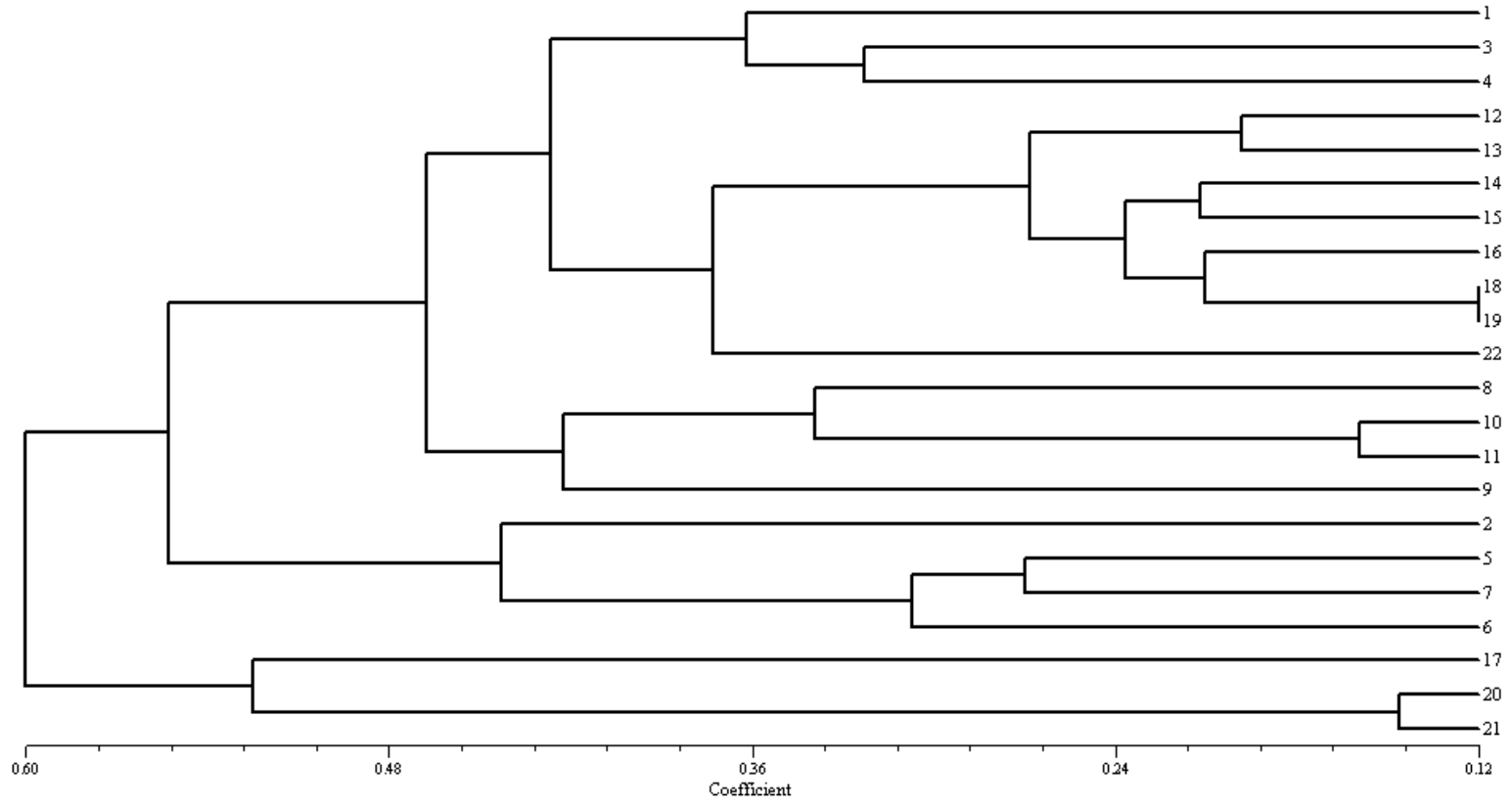
Şekil 4.14. WRKY markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki ağacı



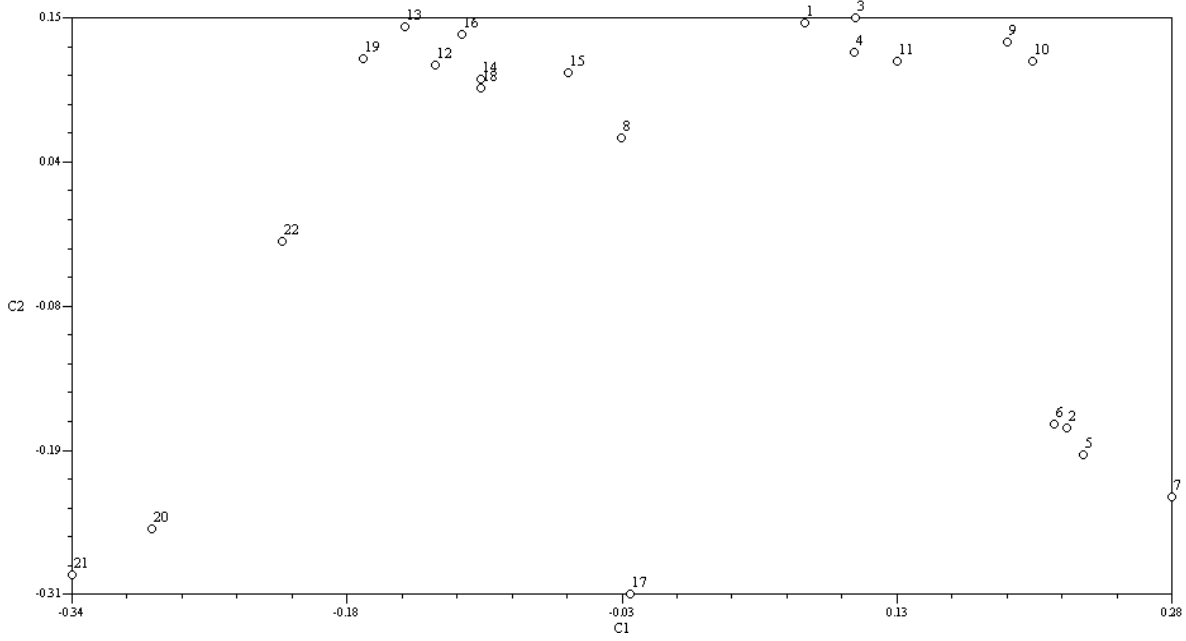
Şekil 4.15. Temel bileşenler analizine (PCA) göre WRKY markırları ile oluşturulan *Lens Mill.* ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki



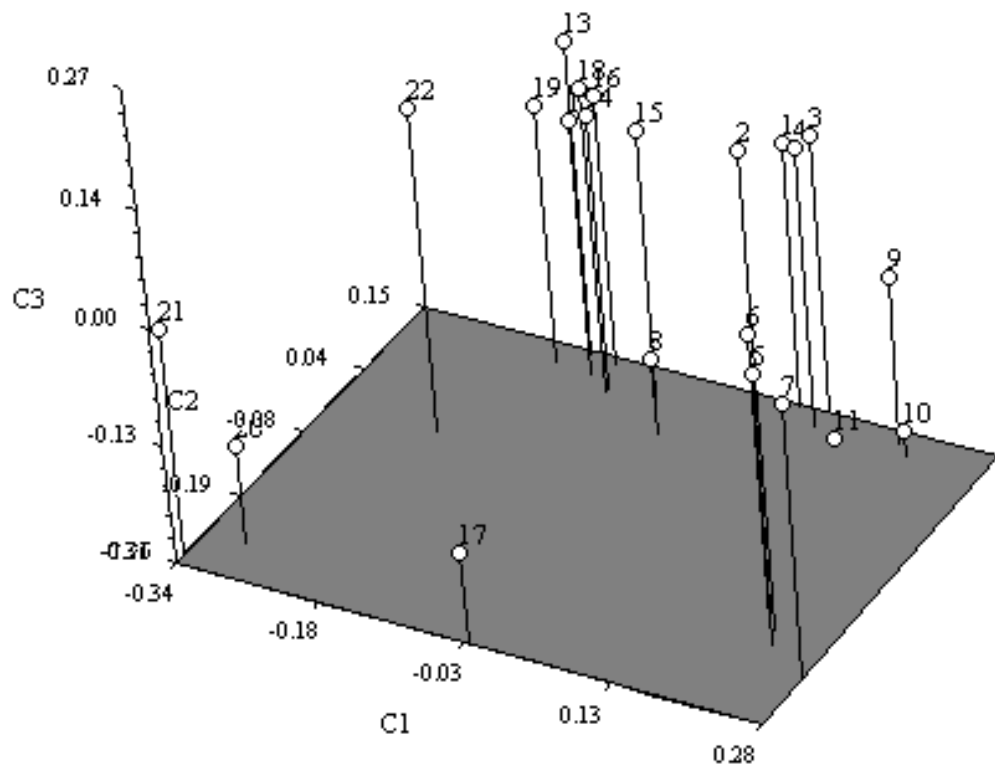
Şekil 4.16. Temel bileşenler analizine (PCA) göre WRKY markırları ile oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki



Şekil 4.17. RGA, peroksidaz ve WRKY markırlarının tümüyle oluşturulan *Lens* Mill. ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki ağacı



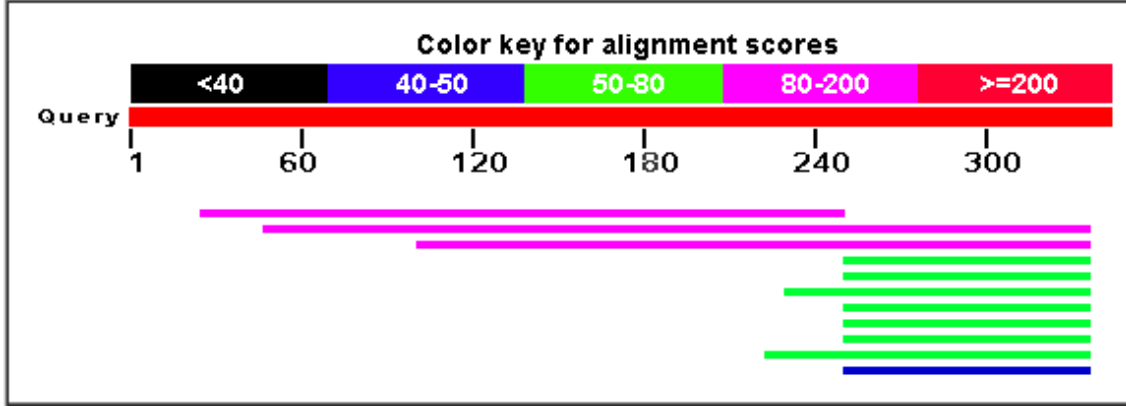
Şekil 4.18. Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA, peroksidaz ve WRKY markırlarının tümüyle oluşturulan *Lens Mill.* ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki



Şekil 4.19. Temel bileşenler analizine (PCA) göre RGA, peroksidaz ve WRKY markırlarının tümüyle oluşturulan *Lens Mill.* ve *Vicia monbretii* taksonlarına ait genetik ilişki

4.4. Sekans analizleri

Elde edilen markırların BLAST analizleri sonucu sekanslar akraba türlerde bulunan sekans bölgeleriyle benzerlikler bulundurduğu görülmüştür (Şekil 4.20 ve Çizelge 4.7).



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
☐ Lens culinaris microsatellite LcSSR329 sequence	179	179	65%	1e-41	78%	JF768494.1
☐ Pisum sativum transposon mariner-like transposon Psmar-2, complete sequence	93.3	93.3	84%	1e-15	67%	AY833551.1
☐ P. sativum DNA sequence from clone JICPSV-598E15, complete sequence	89.7	89.7	68%	2e-14	68%	CU655881.10

Download GenBank Graphics

Lens culinaris microsatellite LcSSR329 sequence

Sequence ID: [gb|JF768494.1](#) Length: 602 Number of Matches: 1

Range 1: 350 to 572 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
179 bits(198)	1e-41	175/224(78%)	1/224(0%)	Plus/Minus
Query 26	AGCTCCACTCGGTAGTATCCTCTTGCTGCGCCTGTTATGCTCCATCGTCTCTTGGACA	85		
Sbjct 572	AGTTCGACCCGATAGTATCCCAITGCTCCCTCATTATGATCCATAGTCTCTGTACA	513		
Query 86	CTGAACCAACCTTTTGGCGGTCAAACATCGTAACAAGATGTGTAGCTTTGGCCGAT	145		
Sbjct 512	CTGAATCAACTTTTATGACGGTCAAACATTGTAAACACATGTGTAGCTTTGGTTGAT	453		
Query 146	TCTCTCTTCAAAAACCTTGTGGCATGATTCACTATACACCTGGCCCGATTGTAAGACGGAA	205		
Sbjct 452	TCTCTCTTC-AATTTTITGATAACTTTCAATAAACCACTGCCCGATTGTAACACTAAA	394		
Query 206	CTCCATTTCAAAACGCTGGTTTCAAAAAGTGCCCCATCCTGAA	249		
Sbjct 393	CTCCATTTCGAACATCTGGTTGTGGAAAGTATCCCATCCTAAA	350		

Şekil 4.20. BLAST analizleri

Çizelge 4.7. Seçilen RGA, peroksidaz ve WRKY genlerinin BLAST analizleri

Marker	Benzer Olan Sekans Bölgesi	Benzerlik (%)
	<i>Lens culinaris</i> microsatellite LcSSR329 sequence	78
HD01	PREDICTED: <i>Cicer arietinum</i> uncharacterized LOC101490810 (LOC101490810), Mrna	76
	<i>Cicer arietinum</i> cultivar ICC4958 MW5_contig118978, whole genome shotgun sequence	74
K03	<i>Lens culinaris</i> microsatellite LcSSR329 sequence	77
	<i>Pisum sativum</i> transposon mariner-like transposon Psmar-2, complete sequence	65
K04	<i>Podospora anserina</i> S mat+ genomic DNA chromosome 4, supercontig 4	84
	<i>Lens culinaris</i> microsatellite LcSSR329 sequence	78
	<i>Pisum sativum</i> transposon mariner-like transposon Psmar-2, complete sequence	66
HD03	<i>Arachis ipaensis</i> voucher KG30076 retrotransposon B67_India_autonomous-Ty1-type, complete sequence	100
	<i>Triticum turgidum</i> UCW_Tt-k45_contig_77790 transcribed RNA sequence	100
	<i>Medicago truncatula</i> chromosome 5 clone mte1-40n1, COMPLETE SEQUENCE	100
HD06	<i>Lathyrus sativus</i> cultivar Cicerchia Marchigiana chloroplast, complete genome	99
	<i>Medicago truncatula</i> Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein (MTR_4g051150) mRNA, complete cds	97
	<i>Cicer arietinum</i> strain FLIP84-92C clone gl1-40c9, complete sequence	96
K06	<i>Lathyrus sativus</i> cultivar Cicerchia Marchigiana chloroplast, complete genome	98
	<i>Cicer arietinum</i> strain FLIP84-92C clone gl1-40c9, complete sequence	97
	<i>Pisum sativum</i> cultivar Feltham First chloroplast, complete genome	89
S2-INV	<i>Pisum sativum</i> PsIPT2 gene for adenylate isopentenyltransferase, complete cds	80
	<i>Vitis vinifera</i> , whole genome shotgun sequence, contig VV78X207656.22, clone ENTAV 115	79
POX2	<i>P.sativum</i> DNA sequence from clone JICPSV-297I9, complete sequence	81
	<i>Medicago truncatula</i> strain A17 clone mte1-1p23, complete sequence	80
	<i>M.truncatula</i> DNA sequence from clone MTH2-62K1 on chromosome 3, complete sequence	80
POX3	<i>Vicia pannonica</i> transposon Ty3/gypsy-like LTR retrotransposon sequence	70
	<i>Vicia melanops</i> genomic repetitive element, clone M36	70
WRKY 2F	<i>Cicer arietinum</i> cultivar ICC4958 MW5_contig127882, whole genome shotgun sequence	86
	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-29H14 in linkage group 16, complete sequence	85
	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-104N21 in linkage group 16, complete sequence	85

5. TARTIŞMA

RGA, peroksidaz ve WRKY genleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı türlerarası polimorfizmi saptamaya çalışma yönüyle bu tez ile paralellik gösterse de bu gen ailelerinin her birini kapsayan ortak bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca bugüne kadar bu konuyla ilgili yapılan çalışmaların çok azı mercimek bitkisini kapsamaktadır.

Bulgular kısmında yer alan veriler ışığında RGA, peroksidaz ve WRKY gen aileleri türlerarası yüksek oranda polimorfizm ortaya koymuştur.

123 RGA primeri kullanılan çalışma sonucunda 103 bant elde edilmiştir. Bu bantların 18'i monomorfik olup 85'i ise polimorfiktir. Polimorfizm oranı %83'dür. Mutlu vd (2006) yaptıkları çalışmada fasülyede RGA polimorfizmini incelemiş ve polimorfizm seviyesini %32 olarak ifade etmiştir. Yine fasülye bitkisinde 8 restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan çalışmada polimorfizm oranı %32 (Nodari 1992) ve 16 SSR'ın kullanıldığı başka bir çalışmada ise %43 (Yu vd 2000) bulunmuştur. Buna göre RGA polimorfizm oranının RFLP ile yakın, fakat SSR'dan daha düşük olduğu ifade edilmiştir.

PCR amplifikasyonu sonucu beklenen ürünlerin boyutlarının 510-520 bp arasında olması beklenmektedir. Çalışmamızda 500 bp'den daha düşük ve daha yüksek olan bantlar elde edilmiştir. Benzer şekilde Hunger vd (2003) şeker pancarında yaptıkları çalışmada ikiden daha fazla sayıda intron bölgesi içeren PCR ürünleri elde etmiştir. Böylece 500 bp veya daha büyük olan RGA markırlarının yapılarında intronların bulunduğu düşünülmektedir.

Yaish vd (2003) mercimek türlerinde mevcut olan NBS sekanslarını tanımlamış ve izole etmiştir. Kullandıkları dejenere primerler bizim çalışmamızda kullandıklarımızla aynı değildir. Fakat çalışmalarımızda ortak olan yabancı formlar mevcuttur. Çalışma sonucunda elde ettikleri PCR ürünleri 670 ve 820 bp aralığındadır.

Nohutta dayanıklılık gen analoglarının izolasyonu ve haritalandırılmasını Huettel vd (2002) 2 dejenere primer kombinasyonu ile çalışmıştır. P-loop ve kinase-3a korunmuş sekanslarından dizayn edilen primer kombinasyonu 340, 420, 550, 620 ve 900 bp uzunluğunda bantlar vermiştir. Bu bantların büyüklüğü bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumaktadır. P-loop ve GLPL (T/A) korunmuş bölgelerinden oluşturulan 2. primer kombinasyonu ise 540 bp uzunluğunda tek bir bant vermiştir.

Rubeena vd (2002) 3 RGA, 100 RAPD ve 11 ISSR markırını kullanarak yaptıkları ilk türler arası linkaj haritalamasında, 6 ve 18 arasında markırdan oluşan toplam 9 grup ortaya koymuştur. RGA analizlerinde ptokinaz primeri ile tarama yapılmıştır. Çalışma sonucunda bantların hepsi polimorfik bulunmuş ve 3 RGA markırı belirlenmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak tez çalışmasında birbirinden farklı korunmuş motiflerden dizayn edilen çok sayıda primer kombinasyonu kullanılarak daha fazla markır elde edilmiştir.

Peroksidaz gen ailesi ve transkripsiyon faktörlerinin WRKY ailesinin protein sekanslarında yer alan 2 veya 3 korunmuş domainin dejenere primerler ile çoğaltılmasını esas alan PCR yaklaşımlarından RGA analizlerinde olduğu gibi aynı metotlarla yararlanılmıştır.

22 peroksidaz primeri mercimek türleri içinde 66 bant meydana getirmiştir. Bu bantlardan 59'u polimorfik olup polimorfizm oranı %89 olarak hesaplanmıştır. Zhang vd (2001) peroksidaz gen ailesinin 25 çoklu gen ailesi içinde en düşük korunmuş sekanslara sahip olduğunu bildirmiştir. Bu, bizim sonuçlarımızla tutarlıdır.

Gulsen vd (2007) bu çalışmada kullanılan peroksidaz primerlerini çim bitkisinde denemiş ve POX 7 dışında diğer primerlerin bant verdiğini gözlemlemiştir. 44'ü polimorfik olmak üzere toplam 52 bant elde etmişlerdir. Bant büyüklükleri 100-750 bp aralığındadır. Elde edilen bantlar 0.13 ve 0.62 arasında benzerlik vermiştir. Gulsen vd (2000) aynı türlerde SRAP markırlarıyla yaptığı çalışmada polimorfizm oranını 0.70 ile 0.97 arasında bulmuştur.

Dejenere primerler yardımıyla genomik DNA'dan WRKY gen fragmentlerinin PCR ile çoğaltılması, WRKY genlerini belirlemek için kullanılan yaklaşımlardan biridir; fakat bununla ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Chen ve Chen (2000) korunmuş WRKYGQK motiflerinden dizayn edilmiş forward primerleri domaine özgü RT-PCR ile kullanmışlardır. Trognitz vd (2002) ligasyon-temelli PCR (LM-PCR) tekniği ile patatesin genomik DNA'sından WRKY genlerini çoğaltmıştır.

Bu tez çalışmasında 10 WRKY primer kombinasyonu kullanılmış ve elde edilen 52 banttan 47'sinin polimorfik olduğu gözlenmiştir. 200-1450 bp aralığında gözlenen bantların polimorfizm oranını %90 olarak hesaplanmıştır. Polimorfizm oranının yüksek olması WRKY genlerinin korunmuş sekanslarının azlığıyla ilişkilidir.

Borrone vd (2004) kakao bitkisinde WRKY lokuslarını izole etmek ve bu ailenin üyelerinden moleküler markır elde etmek amacıyla yaptıkları araştırmada bizim çalışmamızda kullandığımız 6 dejenere primer kombinasyonu (WRKY 1 FP, WRKY 2 RP, WRKY 2 FP, WRKY 3 FP, ve WRKY 3 RP) kullanmışlardır. Araştırma sonucunda sadece WRKY 1 FP/WRKY 2 RP kombinasyonundan verimli bantlar üretmişlerdir. Araştırma kapsamında bu primer kombinasyonu *Cocos nucifera*, *Persea americana*, *Sorghum bicolor*, *Pennisetum glaucum*, ve *Zea mays* türlerinde de denenmiş ve çoğaltılan WRKY genlerinin sayıları benzer bulunmuştur. Elde edilen bantların boyutları 250 bp ve 1.5 kb arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda da bant aralığı bu değerler arasındadır.

Jun-Jun ve Abul (2009) *Pinus*'da WRKY transkripsiyon faktörlerini tanımlamak ve izole etmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada AFLP/WRKY primer kombinasyonlarını kullanmışlar ve 60-800 bp aralığında PCR ürünleri elde etmişlerdir.

Ozugur (2011) aynı mercimek genotiplerini kullanarak AFLP tekniği ile tüm genomu taramış ve tür içi ve türler arası bir sınıflandırma ortaya koymuştur. 2 boyutlu ve 3 boyutlu şemaları çalışmamızla kıyasladığımızda birçok farklılık göze çarpmaktadır. Tüm genomu bakıldığında türler daha yakın kümeler oluşturmuşlardır. POX bakımından PCA grafikleri incelendiğinde *L. culinaris* subsp. *culinaris* diğer türlerden daha uzak bir bölgede bulunmaktadır. RGA ve WRKY ile oluşturulan PCA grafiğinde ise *L. culinaris* subsp. *odemensis* ve *L. culinaris* subsp. *tomentosus* türlerinin bulunduğu kümelenmeye daha yakın bir bölgededir. Bu grafik tüm genomla karşılaştırıldığında ise kültür formu yine aynı türlerin bulunduğu kümelere yakın fakat incelediğimiz gen aileleriyle bulunduğu noktadan daha uzaktır. Bu sonuçlar gen ailelerinin genomdan daha hızlı bir evrimsel süreç içinde olduğunu göstermektedir. Bu sayede genom

bakımından incelenen genlerin bulundukları bölgeler farklılıklar göstermektedir. Ayrıca bu gen bölgelerinde genomla göre daha yüksek bir polimorfizm mevcuttur.

6. SONUÇ

Bu çalışmada RGA, peroksidaz ve WRKY genlerine özgü spesifik dejenere primerler kullanılarak 31 *Lens* ile 2 *Vicia* türünde polimorfizm incelenmiştir.

RFLP, AFLP, SSR ve RAPD gibi moleküler markırlar türler arası polimorfizmi saptamak için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak RGA, peroksidaz ve WRKY genleri ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ayrıca bu markırların ayrı ayrı birbirleriyle karşılaştırılarak incelenmesi bu gen ailelerin evrimi hakkında da bilgi sunmaktadır.

123 RGA primeri kullanılan çalışma sonucunda 103 bant elde edilmiştir. Bu bantların 18'i monomorfik olup 85'i ise polimorfiktir. Polimorfizm oranı % 83'dür. Analiz sonucunda oluşturulan dendogram incelendiğinde türler arasındaki genetik benzerlik 0.62 ve 0.90 (0.76) arasındadır. Dendograma göre türler arasında dayanıklılık gen analogları bakımından yoğun bir polimorfizm vardır. Mercimek cinsi içerisindeki türlerle kıyaslandığında *Vicia montbretii* türüne ait olan genotiplerin genetik ilişki ağacında uzak bir kol oluşturmuştur. Kültür formu *Lens culinaris* subsp. *culinaris* türüne atasal formu olan *Lens culinaris* subsp. *orientalis* türüne ait olan genotipler kısmen yakın bir kolda bulunmaktadır.

22 peroksidaz primeri mercimek türleri içinde 66 bant meydana gelmiştir. Bu bantlardan 59'u polimorfik olup polimorfizm oranı %89'dur. Peroksidaz genleri çoklu gen aileleri içinde en düşük korunmuş sekanslara sahip ailelerden biri olduğu için polimorfizm oranının yüksek çıkması beklenildiği gibidir.

Peroksidaz primerleri ile oluşturulan dendogram sonucunda türler arasındaki benzerlik 0.13 ve 0.62 (0.34) arasındadır. Türler arasında yoğun bir polimorfizm gözlenmiştir. Dendograma göre mercimek cinsi içerisindeki türlerle kıyaslandığında *Vicia montbretii* türüne ait olan genotipler genetik ilişki ağacında uzak bir kol oluşturmuştur. Kültür formu *Lens culinaris* subsp. *culinaris* türüne peroksidaz genleri bakımından en yakın türler *Lens ervoides* ile *Lens lamottei* türleridir.

Bu çalışmada 10 WRKY primer kombinasyonu kullanılmıştır. Elde edilen 52 banttan 47'si polimorfik olup 200-1450 bp aralığında gözlenen bantların polimorfizm oranı %90'dır.

WRKY primerleri ile elde edilen dendogram sonucu türler arasındaki benzerliğin 0.07 ve 0.63 (0.37) arasında olduğu görülmüştür. Bu filogenetik ağaç *Vicia montbretii* türüne ait olan genotipleri yine bir dış grup olarak değerlendirmiştir. *L. culinaris* subsp. *odemensis*, *L. culinaris* subsp. *tomentosus*, *L. nigricans* ve *L. ervoides* türlerine ait olan genotipler kendi içlerinde yakın dallarda bulunmaktadır.

RGA, peroksidaz ve WRKY markırların hepsiyle oluşturulan 2 boyutlu ve 3 boyutlu PCA grafiklerinde kültür formunu temsil eden genotip diğer türlerin oluşturduğu kümelerden bağımsız olarak tek başına yerleşmiştir. Tüm genomla karşılaştırıldığında türler kendi içinde grup fakat diğer türlerden daha uzak bölgelerde bulunmaktadır.

Sonuç olarak RGA, peroksidaz ve WRKY transkripsiyon fakt6r6 gen aileleri biyotik ve abiyotik stres fakt6rleriyle s6rekli bir etkileşim halinde olan gen ailelerinden oluşmaktadır. Bu y6zden genomunkinden çok daha hızlı bir değişim içindedirler. Bu gen ailelerinin evrimsel hızı genomunun dinamiğinden farklıdır. Bu y6zden stres fakt6rlerine dayanıklılığın sağlanabilmesi için bu gen b6lgelerinin organizasyonunun ve evrimsel dinamiğinin anlaşılması oldukça 6nemlidir.

7. KAYNAKLAR

- AARTS, M.G.M., LINTEL-HEKKERT, B.T., HOLUB, E.B., BEYNON, J.L., STIEKEMA, W.J., PEREIRA, A. 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Int., 11: 251-258.
- ADAMS, J.B. 1978. The inactivation and generation of peroxidase in relation to the high temperature-short time processing of vegetables. Journal Food Technology, 13: 281-297.
- AMAYA, I., BOTELLA, M.A., de la CALLE, MEDINA, M.I., HEREDIA, A., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., QUESADA, M.A and VALPAESTA, V. 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants over expressing a cell wall peroxidase. FEBS Lett., 457: 80-84.
- ALEXANDROVA, K.S., CONGER, B.V. 2002. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). Plant Sci., 162: 301-307.
- ANDERSON PA, LAWRENCE GJ, MORRISH BC, AYLIFFE MA, FINNEGAN EJ, ELLIS JG 1997. Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. Plant Cell, 9: 641-651.
- ANONİM, 1988. Yaprak ve Toprak Analiz Metodları II. TC. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Zeytinlik Araştırma Enstitüsü, Bitki Besleme Bölümü, İzmir.
- ASADA K., 1994. Production and action of oxygen species in photosynthetic tissues, in: Foyer, Mullineaux P.M. (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, pp. 77-104, Boca Raton, FL.
- ASHIDA, Y., NISHIMOTO, M., MATSUSHIMA, A., WATANABE, J. and HIRATA, T. 2002. Molecular cloning and mRNA expression of geraniol-inducible genes in cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2511-2514.
- BAI, J.F., PENNILL, L.A., NING, J., LEE, S.W., JEGADEESAN, R., WEBB, C.R., ZHAO, B.Y., SUN, Q., NELSON, J.C., LEACH, J.E., HULBERT, S.H. 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. Genome Res., 12: 1871-1884.
- BAKER, B., ZAMBRYSKİ, P., STASKAWICZ, B., and DINESH-KUMAR, S.P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science (Washington, D.C.), 276: 726-733.
- BARULINA, H. 1930. Lentils of the USSR and other countries. Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding 40: 265-304. (in Russian with English summary)

- BHATTY, R.S., SLINKARD, A.E., SOSULSKI, F.W., 1976. Chemical composition and protein characteristics of lentils. *Lentil*, 4 (28): 32-35.
- BHAVANI S.G, MILLER, J.L., RUBIN S.S., SHARMA, D.R., TIMKO, M.P., 2002. Isolation, sequence analysis, and linkage mapping of resistance-gene analogs in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica* 126: 365–377.
- BENT, A.F., KUNKEL, B.N., DHALBECK, D., BROWN, K.L., SCHMIDT, R., GIRAUDT, J., LEUNG, J. and STASKAWICZ, B.J. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1860.
- BENT, A.F. 1996. Plant disease resistance genes, function meets structure. *Plant Cell*, 8: 1757-1771.
- BERGLUND GI, Carlsson GH, Smith AT, Szoke H, Henriksen A, Hajdu J (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* 417: 463-468.
- BERTIOLI DJ, LEAL-BERTIOLI SCM, Lion MB, SANTOS VL, PAPPAS G, CANNON SB, GUIMARAES PM 2003. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol Genet Genomics*, 270: 34-45.
- BEYER, K., BINDER, A., BOLLER, T. and COLLING, M. 2001. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.*, 2: 125–134.
- BLACK, C.A., 1965. *Methods of Soil Analysis. Part 2*, American Society of Agronomy Inc., Publisher Madison, pp. 1372-1376, Wisconsin, USA.
- BORRONE, J.W., KUHN, D.N., SCHNELL, R.J. 2004. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet.*, 109: 495-507.
- BOUYOUCOS, G.J., 1955. A Recalibration of the Hydrometer Method for Making Mechanical Analysis of the Soils. *Agronomy Journal*. 4: 434.
- CALDWELL, C.R., 2003. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4589-4595.
- CANNON, S.B., ZHU, H., BAUMGARTEN, A.M., SPANGLER, R., MAY, G., COOK, D.R., YOUNG, N.D. 2002. Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *J. Mol. Evol.*, 54: 548-562.
- CHEN, C.H. and CHEN, Z.X. 2000. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 42: 387-396.

- CHITTOOR, J.M., LEACH, J.E. and WHITE, F.F. 1999. *In* Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Datta, S.K. and Muthukrishnan, S. (Editors), CRC Press, pp. 171-193, Boca Raton, FL.
- CUBERO, JI. 1981. Origin, Taxonomy and domestication In: Webb C, Hawtin G (Editors), Lentils, pp. 15-38. CAB, Slough, UK.
- DALTON, D.A., LANGEBERG, L., TRENEMAN, N.C., 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol Plant*, 87: 365-370.
- DANGL, J.L. and JONES, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- DAVIS, P.H., Plitmann U. 1970. *Lens*. In: P.H. Davis (Ed.). *Flora of Turkey*. Edinburgh Univ. Press, pp. 325-328, Edinburgh, UK.
- DELLAGI, A., HELIBRONN, J., AVROVA, A.O., MONTESANO, M., PALVA, E.T., STEWART, H.E., TOTH, I.K., COOKE, D.E., LYON, G.D., BIRCH, P.R. 2000. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1092-1101.
- DESLANDES L, OLIVIER J, THEULIERES F, HIRSCH J, FENG DX, BITTNER-EDDY, P., BEYNON J, MARCO, Y. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2404-2409.
- DI GASPERO G, CIPRIANI K 2003. Nucleotide binding site/leucinerich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to diseases resistance in grapevine. *Mol Genet Genomics* 269:612–623.
- DODDS PN, LAWRENCE GJ, ELLIS JG 2001. Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax. *Plant J* 25: 439-453.
- DONG J, CHEN C, CHEN Z 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51: 21-37.
- DOWD PF, LAGRIMINI LM 1997. The role of peroxidase in host insect defenses. In: Carozzi N, Koziel M (eds) *Transgenic plants for control of insect pests*. Taylor and Francis, pp. 195-223, New York.
- DUARTE-VAZQUEZ, M.A., GARCIA-ALMENDAREZ, B., REGALADO, C., WHITAKER, J.R., 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1574–1579.
- EDMUND A.Q., HARPARTAP M., RACHEL S.M., ALESSANDRA, T., MARIA L.C., AMY, L., JAMES, M.B. 2012. Evolutionary meta-analysis of solanaceous resistance gene and solanum resistance gene analog sequences and a practical

- framework for cross-species comparisons. *Molecular plant-microbe interactions* 25: 603-612.
- ELIA M.R., BORRACCINO G., DIPIERRO S., 1992. Ascorbate peroxidase from potato tubers. *Plant Science*, 85: 17-21.
- ERSKINE, W. 1997. Lessons for breeders from land races of lentil. *Euphytica* 93, 107–112.
- ESHDAT Y., HOLLAND D., FALTIN Z., BEN-HAYYİM G., 1997. Plant glutathione peroxidases, *Physiologia Plantarum*, 100: 234–240.
- ESPELIE, K.E., FRANCESCHI, V.R. and KOLATTUKUDY, P.E. 1986. *Plant Physiology*, 81: 487-492.
- EUJAYL, I., BAUM, M., ERSKINE, W., PEHU, E. and MUEHLBAUER, F.J. 1997. The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F2 segregation. *Euphytica*, 96: 405-412.
- EULGEM, T., RUSHTON, P.J., ROBATZEK, S. and SOMSSICH, I.E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199–206.
- EULGEM, T., SOMSSICH, I.E. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 366-371.
- EVERDEEN, D. S., KIEFER, S., WILLARD, J.J., MULDOON, E.P., DEY, P.M., LI, X.B., and LAMPORT, D.T.A. 1988. Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors in vitro. *Plant Physiol.* 87: 616-621.
- FAO, 2012, Statistical database of food and agriculture organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/faostat/>.
- FERGUSON, M.E., FORD-LLOYD, B.V., ROBERTSON, L.D., MAXTED, N. and NEWBURY, H.J. 1998. Mapping of geographical distribution of genetic variation in the genus *Lens* for enhanced conservation of plant genetic resources. *Molecular Ecology*, 7: 1743-1755.
- FERGUSON, M.E., MAXTED, N., VAN SLAGEREN, M. and ROBERTSON, L.D. 2000. A reassessment of the taxonomy of *Lens* Miller (Leguminosae, Papilionoideae, Viciae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 41–59.
- FLOR, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- FLOTT, B.E., MOERSCHBACHER, B.M. and REISNER, H. 1989. Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytol.* 111:413-421.
- FRY, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:165-186.

- FURMAN, B.J. and BAUM, M. 2006. Genotyping a composite germplasm set of lentil, ICARDA activities under the generation Challenge Programme, (www.icarda.org), Syria.
- GAJHEDE, M., SCHULLER D.J, HENRIKSEN, A., SMITH, A.T., POULOS, T.L. 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4:1032–1038.
- GALASSO, I., SCHMIDT, T., PIGNANE, D., 2001, Identification of *Lens culinaris* ssp. *culinaris* chromosomes by Physical mapping of repetitive DNA sequences, *Chromosome Research*, 9: 199-209.
- GONG, W., SHEN, Y.P., MA, L.G., PAN, Y., DU, Y.L., et al. 2004. Genome wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes. *Plant Physiol.* 135: 773–782.
- GRAHAM, M.Y., and GRAHAM, T.L. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. *Plant Physiol.* 97: 1445-1455.
- GRANT, M.R., GODIARD, L., STRAUBE, E., ASHFIELD, T., LEWALD, J., SATTLER, A., INNES, R.W. and DANGL, J.L. 1995. Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269: 843-846.
- GRISEBACH, H. 1981. Lignins. In: *The Biochemistry of Plants*. E. E. Conn, ed. Academic Press, pp. 457-478, New York.
- GROSS, G.G. 1980. The biochemistry of lignification. *Adv. Bot. Res.* 8: 25-63.
- GULSEN, O., SHEARMAN, R.C., HENG-MOSS, T.M., MUTLU, N., LEE, D.J., SARATH, G., 2007. Peroxidase gene polymorphism in buffalograss and other grasses. *Crop Sci.* 47: 767-772.
- GULSEN, O., KAYMAK S., OZONGUN, S., UZUN, A. 2010. Genetic analysis of Turkish apple germplasm using peroxidase gene-based markers. *Scientia Horticulturae* 125: 368-373.
- GULSEN, O., EICKHOFF, T., HENG-MOSS, T., SHEARMAN, R., BAXENDALE, F., SARATH, G., LEE, D., 2010a. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turfgrasses challenged by *Blissus occiduus*. *J. Arthropod–Plant Interact.* 4: 45-55.
- GUO, A., REIMERS, P.J. and LEACH, J.E. 1993. Effect of light on incompatible interactions between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 413-425.
- GUO, A., HE, K., LIU, D., BAI, S., GU, X., WEI, L. and LUO, J. 2005. DATF: a database of Arabidopsis transcription factors. *Bioinformatics* 21: 2568-2569.

- GUS-MAYER, S., NATON, B., HAHLBROCK, K., SCHMELZER, E. 1998. Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci.*, 95: 8398– 8403.
- GUTSCHE, A., HENG-MOSS, T., SARATH, G. et al. 2009. Gene expression profiling of tolerant barley in response to *Diuraphis noxia* (*Hemiptera: Aphididae*) feeding. *Bull Entomol Res.*, 99: 163-173.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., and JONES, J.D.G. 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 575-607.
- HARA, K., YAGI, M., KUSANO, T., SANO, H. 2000. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol Gen Genet.*, 263: 30-37.
- HENG-MOSS, T.M., SARATH, G., BAXENDALE, F.P., NOVAK, D., BOSE, S., XINHI, N. and QUISENBERRY, S. 2004. Characterization of oxidative enzyme changes in buff aloprasses challenged by *Blissus occiduus*. *J. Econ. Entomol.* 97: 1086-1095.
- HENRIKSEN, A., WELINDER, K.G., GAJHEDE, M. 1998a. Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. *J Biol Chem.*, 273: 2241-2248.
- HENRIKSEN, A., MIRZA, O., INDIANA, C., TEILUM, K., SMULEVICH, G., WELINDER, K., GAJHEDE, M. 2001. Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Sci.*, 10: 108-115.
- HILDEBRAND, D.F., RODRIGUEZ, J.G., BROWN, G.C., LUU, K.T. and VOLDEN, C.S. 1986. Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by twospotted spider mites (Acari: *Tetranychidae*). *J. Econ. Entomol.* 79: 1459-1465.
- HINMAN, R.L. and LANG, J. 1965. *Biochemistry* 4: 144-158.
- HUANG, T., DUMAN, J.G. 2002. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol.*, 48: 339-350.
- HULBERT, S.H., WEBB, C.A., SMITH, S.M., and SUN, Q. 2001. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 285-312.
- IIDA, K., SEKI, M., SAKURAI, T., SATOU, M., AKIYAMA, K., TOYODA, T., KONAGAYA, A. and SHINOZAKI, K. 2005. RARTE: database and tools for complete sets of arabidopsis transcription factors. *DNA Res.*, 12: 247-256.
- INZE D., VAN MONTAGU M. 1995 Oxidative stress in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 153-158.

- ISHIGURO, S. and NAKAMURA, K. 1994. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 50 upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.*, 244: 563–571.
- CHITTOOR, J.M., LEACH, J.E. and WHITE, F.F. 1997. Differential Induction of a Peroxidase Gene Family During Infection of Rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *MPMI* 10: 861-871.
- CORMACK, R.S., EULGEM, T., RUSHTON, P.J., KOCHNER, P., HAHNBROCK, K. and SOMSSICH, I.E. 2002. Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576: 92-100.
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.
- HUETTEL, B., SANTRA, D., MUEHLBAUER, F.J., and KAHL, G. 2002. Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. *Theor. Appl. Genet.* 105: 479-490.
- JACKSON, M.L. 1967. Soil Chemical analysis. Prentice Hall of India, Pvt. Ltd., New Delhi, 498 p.
- JIMENEZ, A., HERNANDEZ, J.A., DEL RÍO, L.A., SEVILLA, F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114: 275-284.
- KACAR, B., 1995. Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri, III. Toprak Analizleri. A.Ü. Ziraat Fak. Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları No:3, Ankara, 704 s
- KALEFETOGLU, T., EKMEKCI, Y. 2005. The Effect of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms. *G. U. Journal Of Science*, 18 (4): 723-740.
- KANAZIN, V., MAREK, L.F. and SHOEMAKER, R.C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11746-11750.
- KAPUT, J., GOLTZ, S., BLOBEL, G. 1982. Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor. *J Biol Chem.*, 257: 15054-15058.
- KATO, N., DUBOUZET, E., KOKABU, Y., YOSHIDA, S., TANIGUCHI, Y., DUBOUZET, J.G., YAZAKI, K. and SATO, F. 2007. Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.* 48: 8-18.
- KEILIN, D., MANN, T. 1937. On the haematin compound of peroxidase. *Proc R Soc Lond* 122: 119-133.
- KIM, C.Y., LEE, S.H., PARK, H.C., BAE, C.G., CHEONG, Y.H., CHOI, Y.J., HAN C.D., LEE, S.Y., LIM, C.O., CHO, M.J. 2000. Identification of rice blast fungal

- elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 470-474.
- KIM, H.J., LEE, H.R., HAN, J.H., YEOM, S., HARN, C.H., and KIM, B.D. 2007. Marker Production by PCR Amplification with Primer Pairs from Conserved Sequences of WRKY Genes in Chili Pepper. *Mol. Cells*. 25: 196-204.
- KIM Y.H., KIM C.Y., SONG W.K., PARK D.S., KWON S.Y., LEE H.S., BANG J.W., KWAK S.S. 2008. Overexpression of sweetpotato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta* 227:867–881
- LADIZINSKY, G, SAKAR, D. 1982. Morphological and cytogenetical and characterization of *Vicia montbretii* Fisch and Mey (Synonym *Lens montbretii* (Fisch and Mey) Davis and Plitmann. *Bot J Linn Soc* 85: 209-212.
- LADIZINSKY, G. 1993. Wild lentils. *Critical Reviews in Plant Science* 12: 169-184.
- LADIZINSKY, G. 1997. A new species of *Lens* from south-east Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society* 123: 257-260.
- LALOUE, H., WEBER-LOTFI, F., LUCAU-DANILA, A., GUILLEMAUT, P., 1997. Identification of ascorbate and guaiacol peroxidases in needle chloroplasts of spruce trees, *Plant Physiology and Biochemistry*, 35: 341–346.
- LAWRENCE, G.J., FINNEGAN, E.J., AYLIFFE, M.A., ELLIS, J.G. 1995. The L6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *Plant Cell*, 7: 1195-1206.
- LEE, D.H. and LEE, C.B. 2000. Chilling stress induced changes of antioxidant enzymes in leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 59: 75-85.
- LEISTER, D., BALLVORA, A., SALAMINI, F. and GEBHARDT, C. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet.*, 14: 421-428.
- LEISTER, D., KURTH, J., LAURIE, D.A., YANO, M., SASAKI, T., DEVOS, K., GRANER, A. and SCHULZE-LEFERT, P. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc Natl AcadSci USA* 95: 370–375.
- LINDSAY, W.L. and NORVELL, W.A., 1978. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese and Copper. *Soil Sci. Amer. Jour.* 42: 421-428.
- HE, L., DU, C., COVALEDA, L., XU, Z., ROBINSON, A.F., YU, J.Z., KOHEL, R.J., ZHANG, H.B. 2004. Cloning, Characterization, and Evolution of the NBS-LRR-Encoding Resistance Gene Analogue Family in Polyploid Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17: 1234-1241.
- MAHAJAN, S., TUTEJA, N. 2005. Cold, Salinity and Drought Stresses. An Overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.

- MALECK, K., LEVINE, A., EULGEM, T., MORGEN, A., SCHMID, J., LAWTON, K., DANGL, J.L., DIETRICH, R.A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Natur. Genet.* 26: 403-410.
- MALHOTRA, R.S., SINGH, K.B. and SINGH, J.K. 1974. Genetic variability and genotype environmental interaction studies in lentil. *Journal of Research Punjab Agricultural University*, 10: 17-21.
- MANTRI, N.L., FORD, R., CORAM, T.E. and PANG, E.C.K. 2007. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics*. 8: 303.
- MARCHIVE, C., MZID, R., DELUC, L., BARRIEU, F., PIRRELLO, J., et al. 2007. Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, VvWRKY1, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 58: 1999-2010.
- MATSUI, A., ISHIDA, J., MOROSAWA, T., MOCHIZUKI, Y., KAMINUMA, E., ENDO, T.A., OKAMOTO, M., NAMBARA, E., NAKAJIMA, M., KAWASHIMA, M., SATOU, M., KIM, J.M., KOBAYASHI, N., TOYODA, T., SHINOZAKI, K., SEKI, M. 2008. Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array, *Plant and Cell Physiology*, 49: 1135-1149.
- US-MAYER, S., NATON, B., HAHLBROCK, K., SCHMELZER, E. 1998. Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8398-8403.
- MEYERS, B.C., DICKERMAN, A.W., MICHELMORE, R.W., SIVARAMAKRISHNAN, S., SOBRAL, B.W., YOUNG, N.D. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.*, 20: 317-332.
- MICHELMORE, R.W. and MEYERS, B.C. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and birth-and-death process. *Genome Res.* 8: 1113–1130.
- MILLIGAN, S.B., BODEAU, J., YAGHOobi, J., KALOSHIAN, I., ZABEL, P. and WILLIAMSON, V.M. 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307–1319.
- MIRZA, O., HENRIKSEN, A., ØSTERGAARD, L., WELINDER, K.G., GAJHEDE, M. 2000. Arabidopsis thaliana peroxidase N: structure of a novel neutral peroxidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 56: 372-375.
- MITAL, S.H., MAATHEWS, J.A., MCKEE, R.A. 1975. Principles of Plant Biotechnology Blackwell Scientific Pub., Boston, 130-157.
- MITTLER, R., ZILINSKAS, B.A. 1992. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem.*, 267: 21802-7.

- MORGENSTERN, I., KLOPMAN, S., HİBBETT, D.S. 2008. Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. *J. Mol. Evol.*, 66: 243-257.
- MUEHLBAUER, F.J., CHO, S., SARKER, A., Mcphee, K.E., COYNE, C.J., RAJESH, P.N., and FORD, R., 2006, Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress, *Euphytica*, 147: 149-165.
- MUTLU, N., MIKLAS, P.N., COYNE, D.P. 2006. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease-resistance genes and QTL in common bean. *Mol Breeding*, 17: 127-135.
- NATH, M.C., NATH, N., 1965. Effet of methionine, Vitamin B12 and hydrolyse glucose cycloacetoacetate on protein nutritive valme of *Lens esculanta* (Lentil). *Ind. Med. Res.*, 37: 101-1013.
- OHYA, T., MORIMURA, Y., SAJI, H., MIHARA, T., IKAWA, T. 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish, *Plant Science*, 125: 137-145.
- OPİİK, H. and ROLFE, S.A. 2005. *The Physiology of Flowering Plants*. Cambridge University Pres, New York, 375 p.
- ØSTERGAARD, L., TEILUM, K., MIRZA, O., MATTSSON, O., PETERSEN, M., WELINDER, K.G. et al. 2000. Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol.*, 44: 231-243.
- PASSARDI, F., LONGET, D., PENEL, C. et al. 2004. The Class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65: 1879-1893.
- PASSARDI, F., COSIO, C., PENEL, C., DUNAND, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24: 255-265.
- DE PATER, S., GRECO, V., PHAM, K., MEMELINK, J., KIJNE, J. 1996. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4624-4631.
- PNUELI, L., HALLAK-HERR, E., ROZENBERG, M., COHEN, M., GOLOUBINOFF, P., KAPLAN, A., MITTLER, R. 2002. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.*, 31: 319-330.
- PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., MARTİN, B.A. and STEWART, C.R. 1994. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulating role for hydrogen peroxidase. *Plant Cell*, 6: 65-74.
- PUTTER, J., BECKER, R., 1987, *Methods of enzymathic analysis: Peroxide*. Bergmeyer, Third Edition, VCH, Newyork, 286. p.

- QUINT, M., MIHALJEVIC, R., DUSSLE, C.M., XU, M.L., MELCHINGER, A.E., LUBBERSTEDT, T. 2002. Development of RGA-CAPS markers and genetic mapping of candidate genes for sugarcane mosaic virus resistance in maize. *Theor Appl Genetic*, 105: 355-363.
- RAJESH, P.N., TULLU, A., GIL, J., GUPTA, V.S., RANJEKAR, P.K. and Muehlbauer, F.J. 2002. Identification of an STMS marker for the double-podding gene in chickpea. *Theor Appl Genet.*, 105: 604-607.
- RAMAMOORTHY, R., JIANG, S.Y., KUMAR, N., VENKATESH, P.N. and RAMACHANDRAN, S. 2008, A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments, *Plant Cell Physiol.*, 49: 865-79.
- RAO, M.K.V., RAGHAVENDRA, A.S. and REDDY, J.K. 2006. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands, 335 p.
- REDDEN, B., MAXTED, N., FURMAN, B., COYNE, C. 2007. *Lens* biodiversity. In: Yadaw SS, McNeil DL, Stevenson PC (Eds), *Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*. Springer, pp. 11-22, AA Dordrecht,
- REIMERS, P.J., and LEACH, J.E. 1991. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice *Oryza sativa* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 38: 39-55.
- REIMERS, P.J., GUO, A., and LEACH, J.E. 1992. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol.*, 99: 1044-1050.
- RIAÑO-PACHÓN, D.M., RUZICIC, S., DREYER, I., MUELLER-ROEBER, B. 2007. PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database, *BMC Bioinforma.* 8 42 s.
- RIDE, J.P. 1983. Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology*. J. A. Callow, ed. Wiley-Interscience, pp. 215-23, New York.
- RIECHMANN, J.L., HEARD, J., MARTIN, G., REUBER, L., JIANG, C.Z., KEDDIE J., ADAM, L., PINEDA, O., RATCLIFFE, O.J., SAMAHA, R.R., CREELMAN, R., PILGRIM, M., BROUN, P., ZHANG, J.Z., GHANDEHARI, D., SHERMAN, B.K., YU, G.L. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among Eukaryotes. *Science*, 290: 2105-2110.
- RUBENNA, R., FORD, P., Taylor, W.J., 2003, Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*), *Theor. Appl. Genet.*, 107: 910-916.
- RUSHTON, P.J., MACDONALD, H., HUTTLY, A.K. et al 1995. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol Biol.*, 29: 691-702.

- RUSHTON, P.J., TORRES, J.T., PARNISKE, M., WERNET, P., HAHLBROCK, K. and SOMSSICH, I.E. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15: 5690-5700.
- RUSHTON P.J. and SOMSSICH, I.E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1: 311-315.
- SALZWEDEL, J.L. and DAZZO, F.B. 1993. pSym *nod* gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6: 127-134.
- SANDHU, J.S. and SINGH, S. 2007. History and origin. In: Yadav, S.S., McNeil, D.L. and Stevenson, P.C. (Editors) *Lentil: an Ancient Crop for Modern Times*. Springer, Dordecht, The Netherlands, pp. 1-9.
- SARASTE, M., SIBBALD, P.R. and WITTINGHOFER, A. 1990. The P-loop: a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 430-434.
- SCANDALIOS, J.G. 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Editors.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, pp. 275-316, Boca Raton, FL.
- SCHENK, P.M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J.P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S.C., MANNERS, J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 11655-11660.
- SCHMID, P.S., and FEUCHT, W. 1980. Tissue-specific oxidative browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. *Gartenbauwissenschaft* 45: 68-73.
- SCHULLER, D.J., BAN, N., HUYSTEE, R.B., Mcpherson, A., POULOS, T.L. 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4: 311-321.
- SCHWEIZER, P., HUNZIKER, W., and MOSINGER, E. 1989. cDNA cloning, in vitro transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Mol. Biol.* 12: 643-654.
- SEAH, S., SIVASITHAMPARAM, K., KARAKOUSIS, A. and LAGUDAH, E.S. 1998. Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley. *Theor Appl Genet* 97: 937-945.
- SHEN, W., NADA, K. and TACHIBANA, S. 1999. Oxygen radical generation in chilled leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars with different tolerance to chilling temperature. *J. Japan Soc. Hort Science*, 68: 780-787.
- SIMONS, G., GROENENDIJK, J., WIJBRANDI, J., REIJANS, M., GROENEN J. et al. 1998. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell*, 10: 1055-1068.

- SMITH, A.T., VEITCH, N.C. 1998. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol.*, 2: 269-278
- SUMMERFIELD, R.J., ROBERTS, E.H., ERSKINE, W. and ELLIS, R.H. 1985. Effects of temperature and photoperiod on flowering in lentils (*Lens culinaris* Medic.). *Annals of Botany* 56: 659-671.
- SUN, C., PALMQVIST, S., OLSSON, H., BOREN, M., AHLANDSBERG, S. and JANSSON, C. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugarresponsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 15: 2076-2092.
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J, ELLIS, J.G. and JONES, J.D.J. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* (Washington, D.C.), 268: 661-667.
- ŞEHİRALİ, S. 1988. Yemeklik Dane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1089, Ders Kitabı, Ankara, 314 s.
- TIBURZY, R., and REISENER, H. J. 1990. Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*: Association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin-like material and callose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 109-120
- TIMMERMAN-VAUGHAN, G.M., FREW, T.J. and WEEDEN, N.F. 2000. Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.) *Theor Appl Genet.*, 101: 241-247.
- TOKER, C., YADAV, S.S. and SOLANKI, I.S. 2007. Mutation breeding. In: Yadav, S.S., McNeil, D.L. and Stevenson, P.C. (Editors) *Lentil: an Ancient Crop for Modern Times*. Springer, pp. 1-24, Dordrecht, The Netherlands.
- TÖR, M. 1998. *Tr. J.of Biology*, 22, 271.
- TRAUT, T.W., 1994. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotidebinding sites. *Eur J Biochem.*, 222: 9-19.
- TROGNITZ, F., MANOSALVA, P., GYSIN, R., NINIO-LIU, D., SIMON, R., DEL HERRERA, M.R., TROGNITZ, B., GHISLAIN, M., NELSON, R. 2002. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 587-597.
- TUİK, 2012. http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=57
- VAN HUYSTEE, R.B., 1987. Some molecular aspect of plant peroxidase biosyntheticstudies. *Annual Review in Plant Physiology*, 38, 205.
- WALTER, M. H. 1992. Regulation of lignification in defense. In: T. Boller and F. Meins (Editors), *Genes Involved in Plant Defense*, Springer-Verlag, pp. 327-352, New York.

- WANG, Z.P., YANG, P.Z., FAN, B.F. and CHEN, Z.X. 1998. An oligo selection procedure for identification of sequence-specific DNA-binding activities associated with the plant defence response. *Plant J.*, 16: 515-522.
- WANG, X., Wu, W., JIN, G., ZHU, J. 2005. Genome-wide identification of R genes and exploitation of candidate RGA markers in rice. *Chinese Science Bulletin*, 50: 1120-1125.
- WANG, Q., WANG, M., ZHANG, X., HAO, B., KAUSHIK, S.K., PAN, Y. 2011. WRKY gene family evolution in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica*, 139: 973-983.
- WEI K.F., CHEN J., CHEN Y.F., WU L.J., XIE D.X. 2012. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY Transcription factor family in maize. *DNA RESEARCH*, 19: 153–164.
- WELINDER, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struc Biol.*, 2: 388-393.
- WELINDER, K.G., JUSTESEN, A.F., KJAERGAARD, R.D. IV., JENSEN, R.B., RASMUSSEN, S.K., JESPERSEN, H.M., DUROUX, L. 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem.*, 269: 6063-6081.
- WHITAKER, J.R. 1994. Catalase and peroxidase. In *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Whitaker, J. R. (Editor), Dekker, pp. 565-578, New York.
- WHITHAM, S., MCCORMICK, S., BAKER, B. 1996. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci.*, 93: 8776-8781.
- WILLEKENS, H., LANGEBAERTS, C., TIRÉ, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., VAN CAMP, W. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana glauca* (L.). *Proc Natl Acad Sci.*, 91: 10450-10454.
- WILSON, V.E. and TEARE, I.D. 1972. Effect of between and within row spacing on components of lentil yield. *Crop Science* 12: 507-510.
- WU, K., JONES, R., DANNEBERGER, L., and SCOLNIK, P.A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.*, 22: 3257-3258.
- WU, K.L., GUO, Z.J., WANG, H.H. and LI, J. 2005. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins, *DNA Res.*, 12: 9-26.
- XIE, Z., ZHANG, Z.L., HANZLIK, S., COOK, E. and SHEN, Q.J. 2007. Salicylic acid inhibits gibberellin-induced α -amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. *Plant Mol. Biol.*, 64: 293-303.

- XIONG, Y., LIU, T., TIAN, C., SUN, S., LI, J. and CHEN, M. 2005. Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Mol. Biol.*, 59: 191-203.
- YAISH, M.W.F., SÁENZ DE MIERA, L.E. and PÉREZ DE LA VEGA, M. 2004. Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species. *Genome*, 47: 650-659.
- YAMASAKI, K., KIGAWA, T., WATANABE, S., INOUE M., YAMASAKI, T., SEKI, M., SHINOZAKI, K. and YOKOYAMA, S. 2012. Structural Basis for Sequence-specific DNA Recognition by an Arabidopsis WRKY Transcription Factor THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 287: 7683-7691.
- YE, X., PAN, S., KUC, J. 1990. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 80: 1295-1298.
- YODA, H., OGAWA, M., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T., SANO, H. 2002. Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, 267: 154-161.
- YOSHIMURA, S., YAMANOUCHI, U., KATAYOSE, Y., TOKI, S., WANG, Z.X., KONO, I., KURATA, N., YANO, N., IWATA, N. and SASAKI, T. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight- resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci.*, 95: 1663-1668.
- YOUNG, S.A., GUO, A., GUIKEMA, J.A., WHITE, F.F., and LEACH, J.E. 1995. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Physiol.*, 107: 1333-1341.
- YURI C., SILKE S., THOMAS, B. 1999. A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). *FEBS Letters*, 459: 33-38.
- ZHANG, L., POND, S.K. and GAUT, B.S. 2001. A survey of the molecular evolutionary dynamics of twenty-five multigene families from four taxa. *J. Mol. Evol.*, 52: 144-156.
- ZOHARY, D. 1972. The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil *Lens* *Econ Bot.*, 26: 326-332

8. EKLER

EK 1. Analizlerde kullanılan yeni genotip listesi

No	Latince Adı	Kökeni (Orijin)
1	<i>Lens ervoides</i>	Turkey
2	<i>Lens ervoides</i>	Italy
3	<i>Lens lamottei</i>	Spain
4	<i>Lens lamottei</i>	Turkey
5	<i>Lens lamottei</i>	France
6	<i>Lens nigricans</i>	Italy
7	<i>Lens nigricans</i>	Crotia
8	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Turkey
9	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Syrian Arab Republic
10	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Israel
11	<i>Lens culinaris subsp. odemensis</i>	Israel
12	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Syrian Arab Republic
13	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Iran
14	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Uzbekistan
15	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Lebanon
16	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Turkey
17	<i>Lens culinaris subsp. orientalis</i>	Turkey
18	<i>Lens culinaris subsp. tomentosus</i>	Turkey
19	<i>Lens culinaris subsp. tomentosus</i>	Turkey
20	<i>Vicia montbretii</i>	Turkey
21	<i>Vicia montbretii</i>	Turkey
22	<i>Lens culinaris subsp. culinaris</i>	Turkey

EK 2. RGA markırları için tüm genotiplere ait temel bileşen analizi (PCA)

Genotype	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	1.26072079	19.6210	19.6210
2	0.92658398	14.4207	34.0417
3	0.56760242	8.8338	42.8755
4	0.44649785	6.9490	49.8245
5	0.40458867	6.2967	56.1212
6	0.36308137	5.6508	61.7720
7	0.32302466	5.0273	66.7993
8	0.30072631	4.6803	71.4796
9	0.24961505	3.8848	75.3645
10	0.20933912	3.2580	78.6225
11	0.19701940	3.0663	81.6888
12	0.18329250	2.8526	84.5414
13	0.17521453	2.7269	87.2683
14	0.19503625	2.1509	89.6516
15	0.13189785	2.0528	91.7044
16	0.11939198	1.8581	93.5625
17	0.11317275	1.7613	95.3239
18	0.09947931	1.5482	96.8721
19	0.07999170	1.2449	98.1171
20	0.06601850	1.0275	99.1445
21	0.05496777	0.8555	> 100%
22	0.00000000	0.0000	> 100%
Sum of eigen values =			6.425364

EK 3. Tüm genotipler arasında RGA markıları bakımından genetik benzerliği gösteren matris

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1.00																					
2	0.87	1.00																				
3	0.76	0.69	1.00																			
4	0.76	0.69	0.79	1.00																		
5	0.74	0.77	0.66	0.68	1.00																	
6	0.80	0.76	0.69	0.66	0.71	1.00																
7	0.69	0.67	0.71	0.69	0.64	0.65	1.00															
8	0.66	0.67	0.67	0.64	0.64	0.66	0.80	1.00														
9	0.70	0.68	0.76	0.76	0.63	0.66	0.78	0.75	1.00													
10	0.62	0.60	0.74	0.68	0.64	0.63	0.77	0.73	0.76	1.												
11	0.67	0.66	0.69	0.62	0.65	0.69	0.71	0.76	0.73	0.80	1.00											
12	0.73	0.72	0.67	0.68	0.69	0.76	0.65	0.69	0.64	0.63	0.71	1.00										
13	0.70	0.72	0.66	0.66	0.76	0.69	0.67	0.63	0.63	0.68	0.69	0.73	1.00									
14	0.69	0.68	0.67	0.71	0.68	0.71	0.68	0.68	0.68	0.67	0.71	0.75	0.69	1.00								
15	0.74	0.74	0.70	0.72	0.69	0.70	0.69	0.67	0.68	0.67	0.70	0.76	0.69	0.89	1.00							
16	0.75	0.72	0.69	0.77	0.70	0.75	0.69	0.67	0.69	0.69	0.68	0.75	0.73	0.86	0.87	1.00						
17	0.76	0.74	0.71	0.73	0.71	0.71	0.67	0.65	0.69	0.64	0.69	0.68	0.68	0.65	0.69	0.73	1.00					
18	0.80	0.73	0.72	0.66	0.72	0.76	0.63	0.67	0.59	0.65	0.65	0.70	0.68	0.61	0.64	0.68	0.87	1.00				
19	0.79	0.75	0.70	0.66	0.71	0.78	0.60	0.63	0.60	0.59	0.65	0.72	0.68	0.67	0.65	0.70	0.84	0.89	1.00			
20	0.77	0.77	0.67	0.68	0.73	0.80	0.61	0.63	0.62	0.58	0.67	0.75	0.70	0.67	0.67	0.71	0.86	0.87	0.91	1.00		
21	0.77	0.73	0.72	0.72	0.71	0.75	0.62	0.66	0.61	0.62	0.63	0.70	0.70	0.67	0.67	0.72	0.84	0.85	0.88	0.89	1.00	
22	0.78	0.76	0.69	0.66	0.72	0.78	0.59	0.63	0.60	0.57	0.65	0.75	0.68	0.65	0.65	0.67	0.82	0.84	0.88	0.86	0.88	1.00

EK 4. Peroksidaz markırları için tüm genotiplere ait temel bileşen analizi (PCA)

Genotype	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	1.26367720	43.2586	43.2586
2	0.54903683	18.7948	62.0533
3	0.43511183	14.8949	76.9482
4	0.35139899	12.0292	88.9774
5	0.32969869	11.2863	> 100%
6	0.19685444	6.7388	> 100%
7	0.16599798	5.6825	> 100%
8	0.12083349	4.1364	> 100%
9	0.10018093	3.4294	> 100%
10	0.04257062	1.4573	> 100%
11	0.02837431	0.9713	> 100%
12	0.02245131	0.7686	> 100%
13	0.00112200	0.0384	> 100%
14	0.00000000	0.0000	> 100%
15	-0.01072023	-0.3670	> 100%
16	-0.02720007	-0.9311	> 100%
17	-0.04967144	-1.7004	> 100%
18	-0.07198517	-2.4642	> 100%
19	-0.08471407	-2.9000	> 100%
20	-0.11962497	-4.0950	> 100%
21	-0.12201822	-4.1770	> 100%
22	-0.20015574	-6.8518	> 100%
Sum of eigen values =			2.921219

EK 5. Tüm genotipler arasında peroksidaz markıları bakımından genetik benzerliği gösteren matris

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1.00																					
2	0.71	1.00																				
3	0.78	0.68	1.00																			
4	0.84	0.53	0.92	1.00																		
5	0.57	0.65	0.60	0.50	1.00																	
6	0.69	0.79	0.71	0.50	0.78	1.00																
7	0.61	0.60	0.67	0.65	0.66	0.65	1.00															
8	0.69	0.66	0.77	0.65	0.62	0.69	0.78	1.00														
9	0.65	0.64	0.74	0.69	0.61	0.68	0.81	0.82	1.00													
10	0.56	0.58	0.58	0.36	0.65	0.57	0.65	0.71	0.73	1.00												
11	0.52	0.49	0.62	0.50	0.52	0.55	0.64	0.74	0.68	0.78	1.00											
12	0.58	0.56	0.53	0.53	0.62	0.58	0.55	0.58	0.48	0.57	0.67	1.00										
13	0.69	0.76	0.73	0.61	0.61	0.73	0.69	0.76	0.73	0.61	0.61	0.64	1.00									
14	0.68	0.68	0.65	0.69	0.56	0.68	0.69	0.69	0.60	0.56	0.58	0.75	0.85	1.00								
15	0.59	0.58	0.51	0.57	0.55	0.57	0.61	0.58	0.49	0.58	0.52	0.75	0.72	0.86	1.00							
16	0.70	0.67	0.64	0.56	0.58	0.67	0.60	0.66	0.61	0.53	0.58	0.75	0.77	0.79	0.75	1.00						
17	0.59	0.67	0.53	0.57	0.66	0.57	0.59	0.56	0.50	0.58	0.48	0.62	0.64	0.66	0.68	0.72	1.00					
18	0.64	0.71	0.56	0.53	0.66	0.64	0.61	0.62	0.58	0.70	0.55	0.58	0.61	0.66	0.61	0.61	0.82	1.00				
19	0.69	0.73	0.59	0.61	0.62	0.62	0.53	0.59	0.58	0.55	0.49	0.58	0.66	0.66	0.62	0.73	0.80	0.80	1.00			
20	0.60	0.59	0.56	0.63	0.62	0.57	0.54	0.59	0.53	0.65	0.51	0.63	0.66	0.65	0.67	0.67	0.78	0.79	0.82	1.00		
21	0.56	0.60	0.54	0.50	0.64	0.59	0.60	0.55	0.68	0.70	0.53	0.56	0.62	0.59	0.58	0.68	0.74	0.77	0.80	0.85	1.00	
22	0.61	0.65	0.56	0.50	0.61	0.61	0.59	0.65	0.58	0.71	0.57	0.58	0.60	0.57	0.61	0.66	0.77	0.79	0.80	0.85	0.84	1.00

EK 6. WRKY markırları için tüm genotiplere ait temel bileşen analizi (PCA)

Genotype	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	1.18478121	34.8840	34.8840
2	0.68939546	20.2981	55.1821
3	0.62286157	18.3391	73.521
4	0.47466180	13.9756	87.4969
5	0.45231887	13.3178	> 100%
6	0.25022664	7.3675	> 100%
7	0.24001278	7.0668	> 100%
8	0.15438537	4.5456	> 100%
9	0.09242358	2.7213	> 100%
10	0.07744356	2.2802	> 100%
11	0.05342788	1.5731	> 100%
12	0.02870650	0.8452	> 100%
13	0.00000000	0.0000	> 100%
14	-0.01186767	-0.3494	> 100%
15	-0.03075920	-0.9057	> 100%
16	-0.04645899	-1.3679	> 100%
17	-0.06093210	-1.7940	> 100%
18	-0.07728016	-2.2754	> 100%
19	-0.09030527	-2.6589	> 100%
20	-0.15042141	-4.4289	> 100%
21	-0.18977136	-5.5875	> 100%
22	-0.26649872	-7.8466	> 100%
Sum of eigen values =			3.396350

EK 7. Tüm genotipler arasında WRKY markıları bakımından genetik benzerliği gösteren matris

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1.00																					
2	0.78	1.00																				
3	0.63	0.56	1.00																			
4	0.73	0.56	0.52	1.00																		
5	0.86	0.70	0.59	0.52	1.0																	
6	0.84	0.61	0.66	0.64	0.7	1.00																
7	0.57	0.51	0.72	0.54	0.5	0.64	1.00															
8	0.63	0.51	0.72	0.66	0.5	0.58	0.70	1.00														
9	0.50	0.46	0.51	0.47	0.5	0.53	0.72	0.59	1.000													
1	0.36	0.46	0.58	0.37	0.4	0.46	0.66	0.53	0.838	1.00												
1	0.42	0.46	0.51	0.43	0.5	0.53	0.62	0.53	0.838	0.80	1.00											
1	0.73	0.54	0.56	0.66	0.6	0.74	0.58	0.54	0.500	0.37	0.50	1.00										
1	0.63	0.62	0.51	0.54	0.6	0.59	0.46	0.72	0.548	0.51	0.51	0.53	1.00									
1	0.63	0.59	0.48	0.52	0.6	0.66	0.46	0.56	0.645	0.54	0.61	0.66	0.70	1.00								
1	0.76	0.66	0.58	0.62	0.5	0.66	0.43	0.53	0.548	0.58	0.61	0.62	0.61	0.83	1.00							
1	0.76	0.66	0.61	0.56	0.6	0.62	0.56	0.56	0.516	0.51	0.48	0.69	0.67	0.64	0.74	1.00						
1	0.94	0.70	0.69	0.66	0.8	0.70	0.58	0.58	0.500	0.40	0.40	0.67	0.56	0.62	0.62	0.69	1.00					
1	0.68	0.66	0.58	0.47	0.6	0.62	0.56	0.53	0.516	0.51	0.45	0.56	0.51	0.54	0.54	0.64	0.82	1.00				
1	0.89	0.67	0.62	0.66	0.7	0.77	0.64	0.61	0.500	0.40	0.37	0.70	0.59	0.56	0.56	0.69	0.90	0.82	1.00			
2	0.65	0.62	0.51	0.56	0.6	0.66	0.53	0.53	0.483	0.41	0.54	0.66	0.58	0.51	0.48	0.61	0.72	0.70	0.72	1.00		
2	0.57	0.58	0.59	0.50	0.6	0.61	0.54	0.61	0.467	0.50	0.43	0.61	0.66	0.56	0.50	0.66	0.67	0.69	0.70	0.82	1.00	
2	0.55	0.62	0.51	0.52	0.6	0.62	0.46	0.43	0.483	0.48	0.58	0.59	0.51	0.61	0.61	0.64	0.59	0.67	0.59	0.80	0.75	1.00

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Niğde’de doğdu. İlköğretimin ilk 6 yılını Niğde’de, son 2 yılını ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2006 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2010 yılında mezun oldu.

2010-2011 eğitim-öğretim yılı Güz Dönemi’nde Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Bölümü Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. 2011 yılında bu bölüme araştırma görevlisi olarak atandı. Halen aynı kurumda eğitime devam etmektedir.