

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**NOHUTTA (*Cicer arietinum* L.) GENOM TABANLI SSR MARKERLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE YAKIN AKRABA TÜRLERE
AKTARILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu SARI YOL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**NOHUTTA (*Cicer arietinum* L.) GENOM TABANLI SSR MARKERLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE YAKIN AKRABA TÜRLERE
AKTARILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu SARI YOL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2019

ANTALYA

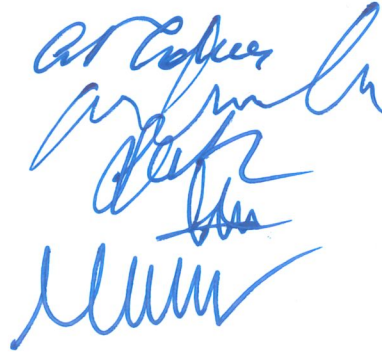
T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NOHUTTA (*Cicer arietinum* L.) GENOM TABANLI SSR MARKERLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE YAKIN AKRABA TÜRLERE
AKTARILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu SARI YOL
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez / / 201..... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cengiz TOKER (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Satı UZUN
Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN
Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NOHUTTA (*Cicer arietinum* L.) GENOM TABANLI SSR MARKERLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE YAKIN AKRABA TÜRLERE
AKTARILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu SARI YOL
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez / / 201..... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cengiz TOKER (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Satı UZUN

Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN

Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR

ÖZET

NOHUTTA (*Cicer arietinum* L.) GENOM TABANLI SSR MARKERLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE YAKIN AKRABA TÜRLERE AKTARILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu SARI YOL

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Aralık 2019; 100 sayfa

Önemli agronomik karakterleri kontrol eden gen veya QTL'lerin belirlenebilmesi ve harita konumlarının tespit edilebilmesi için yüksek çözünürlükte genotipleme oldukça önemlidir. Dolayısıyla, uygun maliyetli, kullanımı kolay analizler için geliştirilen etkili SSR (Simple Sequence Repeats) markerler var olan linkaj haritaların iyileştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada *Cicer arietinum* L. CA 2969 ve *Cicer reticulatum* Ladiz. AWC 602 türlerinin genomik verileri tüm genom-yeniden sekanslama (WGRS) ile elde edilmiştir. İki genomdan toplam 1650 In/Del bölgesi belirlenmiştir. Tekrarlı bölgeler üzerinde belirlenen In/Del bölgeleri iki genom arasında karşılaştırılarak polimorfik olduğu gözlenen toplam 133 SSR bölgesi belirlenmiştir. Bunların içinden seçilen 58 SSR için primer sentezi yapılmıştır. Başarılı şekilde amplifiye olan 40 marker, 4'ü kabulü ve 4'ü desi tipte olmak üzere 8 adet *C. arietinum*, 8 adet *C. reticulatum*, 8 adet *C. echinospermum* P.H. Davis ve *C. anatolicum* Alef., *C. canariense* A.Santos & G.P.Lewis, *C. microphyllum* Benth., *C. multijugum* Maesen, *C. oxyodon* Boiss. & Hohen. ve *C. songaricum* DC.'a ait 6 adet uzak akraba yabani türlerden oluşan toplam 30 genotipte analiz edilerek genetik çeşitlilik değerleri hesaplanmıştır. Analiz sonuçlarına göre markerler ortalama allel sayısı Na: 2,36 olmak üzere toplam 374 allel meydana getirmiştir. Gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değerleri sırasıyla 0,08 ve 0,34 olarak belirlenmiştir. Polimorfik bilgi içeriği (PIC) ortalaması 0,73 olarak hesaplanmıştır. Temel bileşenler analizi (PCA) kültür ve yabani genotipleri beklenen şekilde ayrı gruplarda toplamıştır. Aynı zamanda, çalışma kapsamında geliştirilen markerlerin *C. arietinum* (♀) × *C. reticulatum* (♂) melezlerinden elde edilmiş F₆ aşamasına gelmiş rekombinant kendilenmiş hatlarda kullanılabiliirliği test edilmiştir. Ki-kare (χ^2) analizine göre SSR20 dışındaki tüm markerlerde beklenen Mendel kalıtımıyla örtüşen 1:1 oranı gözlenmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre geliştirilen markerlerin nohutun diğer yabani akrabalarında etkin olarak çalışması bunların karşılaştırmalı genomik çalışmalarında ve yabani türlerdeki gen aktarılabiliirliği ve evrimsel analizlerinde kullanılabiliir olduğunu göstermektedir. İlaveten, bu markerler ileride yapılacak marker destekli ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: *Cicer arietinum* L., *Cicer reticulatum* Ladiz., genomik, marker, nohut, SSR, WGRS

JÜRİ: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Satı UZUN

Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN

Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF GENOME-BASED SSR MARKERS IN CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) AND INVESTIGATION OF TRANSFERABILITY TO NEAR-RELATIVE SPECIES

Duygu SARI YOL

PhD Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz TOKER

December 2019; 100 pages

Construction of a high-resolution genotyping assays is considerably important in order to identify and map useful genes or QTLs controlling important agronomic traits. In the perspective of excellent genetic attributes of SSR (Simple Sequence Repeats) markers with the basic requirement of a simple, cost-effective agarose gel-based assay for their efficient genotyping applications, to enhance the resolution of the existing genetic linkage map is always desirable. In the present study, the genome data belonging *Cicer arietinum* L. CA 2969 and *Cicer reticulatum* Ladiz. was obtained by using whole genome re-sequencing (WGRS). Totally, 1650 In/Dels were obtained from all genome reads. When the In/Del regions are compared among two genomes, 133 polymorphic SSR regions were identified and 58 primer sets were successfully designed. We tested primer sets for measures of genetic diversity in 30 genotypes including eight accessions of *C. arietinum* (four kabuli types and four kabuli types), eight accessions of *C. reticulatum*, eight accessions of *C. echinospermum* P.H. Davis and six accessions of *C. anatolicum* Alef., *C. canariense* A.Santos & G.P.Lewis, *C. microphyllum* Benth., *C. multijugum* Maesen, *C. oxyodon* Boiss. & Hohen. and *C. songaricum* DC. The studied SSRs revealed a total of 374 alleles with an average of 2,36 alleles with mean values of observed heterozygosity (Ho: 0,08), expected heterozygosity (He: 0,34) and polymorphism information content (PIC: 0,73). Principal component analysis (PCA) revealed clearly four groups in the analyzed accessions. The SSR markers developed in this study were also tested in 30 genotypes of F₆ population derived from an interspecific cross between *C. arietinum* (♀) × *C. reticulatum* (♂). According to chi-square (χ^2) analysis, an expected 1:1 segregation ratio was observed in all markers except for SSR20.

The results of this study will provide essential information for further studies in comparative genomic studies and gene introgressions and evolutionary analyses in wild species. Also, these markers can be useful for the marker assisted breeding research in chickpea.

KEYWORDS: *Cicer arietinum* L., *Cicer reticulatum* Ladiz., genomic, marker, chickpea, SSR, WGRS

COMMITTEE: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Satı UZUN

Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

Asst. Prof. Dr. Melike BAKIR



ÖNSÖZ

Nohut, gıda güvenliği ve değişen iklim koşulları dikkate alındığında gerek kurak koşullara dayanıklı olması, gerekse yüksek protein içeriği bakımından insan beslenmesinde oldukça değerli bir yemeklik baklagil bitkisidir. Nohutta yüksek verim, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılık gibi istenilen özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilmesi ise yürütülen ıslah çalışmalarının ana eksenini oluşturmaktadır. Bu çalışmalara moleküler verilerin dahil edilmesi ise daha kısa sürede ve daha doğru sonuçların elde edilmesine büyük katkı sağlamaktadır. Özellikle moleküler markerler son yıllarda nohut ıslah çalışmalarının ivmelenmesinde büyük rol oynamıştır. SSR markerler ko-dominant yapısından dolayı en çok tercih edilen markerler arasında yer almaktadır. Ayrıca bu markerler geniş ölçekli genotipleme çalışmalarına uygun olduğundan yüksek çözünürlükte genom haritalarının oluşturulması, gen/OTL haritalama ve marker yardımcı seleksiyon gibi birçok uygulamada yer almaktadır. Bu kapsamda yürütülen bu tez çalışması ile nohut ıslah çalışmalarına katkıda bulunmak amacıyla yeni SSR markerleri geliştirilmiştir. Bu markerlerin nohutun diğer yabancı akrabalarında etkin olarak çalışması bunların karşılaştırmalı genomik çalışmalarında ve yabancı türlerdeki gen aktarılabilirliği ve evrimsel analizlerinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışması sırasında her konuda bilgi ve tecrübelerini paylaşan, tavsiye ve yapıcı eleştirileri ile bana her zaman yol gösteren, destek ve moral veren, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Cengiz TOKER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar geçen her aşamada bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve her türlü laboratuvar imkanını kullanma fırsatı veren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Cengiz İKTEN'e, bilgi ve desteğini eksik etmeyen sayın hocam Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım. Tez savunma sınavımda yer alarak beni şerefliendiren, değerli paylaşımları ve önerileri ile tezime değer katan sayın Doç. Dr. Satı UZUN ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike BAKIR hocalarıma en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. Bu süreçte manevi desteğini her zaman hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN hocama ve başta Nuray SARI ve Pelin SARIKAYA olmak üzere diğer tüm viroloji ekibine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte en zor zamanlarımda manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Candan AYKURT hocama, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve bilgisini her zaman paylaşan ve manevi desteğini eksik etmeyen arkadaşım Hilal Şule TOSUN'a, beni daima cesaretlendiren ve moral veren sevgili arkadaşım Hatice SARI'ya ve yanımda olan diğer tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca ilgi, sabır ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Dilek SARI, babam Durmuş SARI ve canım kardeşim Doğan Berk SARI'ya, destek ve sevgisini her zaman hissettiğim, her zaman olduğu gibi bu süreçte de beni yalnız bırakmayan eşim Engin YOL'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Nohut (<i>Cicer L.</i>) Cinsi İle İlgili Genel Bilgiler.....	4
2.2. <i>Cicer reticulatum</i> Ladiz.	8
2.3. Kültürü Yapılan Nohutta Tür İçi ve Türler Arası Melezlemeler	8
2.4. Genomda SSR Bölgeleri (Simple Sequence Repeats)	10
2.5. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri (NGS)	11
2.6. SSR Markerlerinin Kullanımıyla İlgili Yapılan Çalışmalar.....	12
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Bitki Materyali	20
3.2. Metod	22
3.2.1. DNA izolasyonu.....	22
3.2.2. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi	23
3.2.3. Kütüphane hazırlanması, genom sekanslama	23
3.2.4. SSR lokuslarının belirlenmesi ve primer dizaynı.....	23
3.2.5. PCR amplifikasyonu	24
3.2.6. Poliakrilamid jel hazırlanması.....	26
3.2.7. Poliakrilamid jele örneklerin yüklenmesi ve Li-Cor cihazında koşturulması	26
3.2.8. Filogenetik analizler.....	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1. SSR Lokusların Belirlenmesi ve Primer Dizaynı.....	32
4.2. DNA İzolasyonu.....	41

4.3. Genomik SSR Bölgelerinin Amplifikasyonu.....	41
4.4. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jelde Yürütülmesi.....	43
4.5. Geliştirilen SSR primerlerinin RIL Populasyonunda Analizi	55
5. SONUÇLAR	59
6. KAYNAKLAR	60
7. EKLER.....	70
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Nohutta (*Cicer arietinum* L.) Genom Tabanlı SSR Markerlerin Geliştirilmesi ve Yakın Akraba Türlerine Aktarılabiliirliğinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değ rlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

26/12/2019

Duygu SARI YOL

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	: Adenin
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
cm	: Santimetre
da	: Dekar
ddH ₂ O	: Distile-Deiyonize Su
dk	: Dakika
g	: Gram
G	: Guanin
ha	: Hektar
HCl	: Hidroklorik asit
Kb	: Kilobaz
M	: Molar
Mb	: Megabaz
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
P	: Önemlilik düzeyi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
T	: Timin
U	: Ünite
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP	: Amplified Fragment Length Polimorfizm
CTAB	: Cetyl Trimethyl Amonyum Bromide
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GBS	: Genotyping By Sequencing
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeats
NGS	: New generation sequencing (Yeni nesil dizileme)
PCA	: Temel bileşenler analizi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIC	: Polimorfizm Bilgi İçeriği
RAPD	: Random Amplified Length Polimorfizm
RFLP	: Restriction Fragment Length Polimorfizm
RIL	: Rekombinant kendilenmiş hat
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Regions
SRAP	: Sequence-related amplified polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat
TBE	: Tris/Borik asit/EDTA Tampon çözeltisi
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
QTL	: Kantitatif Özellik Lokusu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. I. ve II. gen havuzundaki nohut türleri (Soldan sağa: <i>C. reticulatum</i> , <i>C. echinospermum</i> , <i>C. bijugum</i> ve <i>C. pinnatifidum</i>).....	5
Şekil 2.2. “Kabuli” ve “desi” nohutlar.....	6
Şekil 2.3. Kültürü yapılan nohutta basit (üst), normal (sol) ve çok parçalı (sağ) yapraklar.....	7
Şekil 2.4. Kültürü yapılan nohutta beyaz (sol), mor (orta) ve mavi (sağ) renkli çiçekler.....	8
Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında viyollerde yetiştirilen nohut bitkisi resimleri	21
Şekil 3.2. a) Poliakrilamid jel bileşenleri; b) Poliakrilamid jel bileşenlerinin eklenmesiyle elde edilen karışımın camların arasına enjekte edilmesi; c) Tarak yerleştirilmiş şekilde polimerizasyonunun beklenmesi	27
Şekil 3.3. a) Denatüre edilmiş PCR ürünlerinin poliakrilamid jele..... yüklenmesi b) Markerin jele yüklenmesi.....	28
Şekil 4.1. Dizayn edilen primerlerinde CA 2969 ve AWC 602 genotipleri arasında polimorfik olan di-nükleotid tekrarların sayısı	33
Şekil 4.2. Dizayn edilen SSR bölgelerinin nohut kromozomlarına dağılımı.....	38
Şekil 4.3. AWC 602’de bulunan 10 nükleotid delesyon bölgesi	38
Şekil 4.4. AWC 602’de bulunan 4 nükleotid delesyon bölgesi	39
Şekil 4.5. AWC 602’de bulunan 2 nükleotid delesyon bölgesi	39
Şekil 4.6. CA 2969’da bulunan 2 nükleotid delesyon bölgesi.....	40
Şekil 4.7. AWC 602’de bulunan 2 farklı insersiyon.....	40
Şekil 4.8. Çalışmada kullanılan a) Kültür ve yabani popülasyondan; b) RIL popülasyonundan elde edilen DNA’ların agaroz jel görüntüleri	41
Şekil 4.9. CA 2969 ve AWC 602 genotipleri ile a) SSR1-SSR36 no’lu primerlerin; b) SSR37-SSR58 no’lu primerlerin amplifikasyonu	42
Şekil 4.10. Oluşturulan 4 ayrı bulk DNA ile 58 primere ait agaroz jel görüntüsü	42
Şekil 4.11. Kültür ve yabani popülasyonlardaki allelik çeşitliliğin şematize edilmesi	45
Şekil 4.12. Kültür ve yabani popülasyonda SSR3 markerine ait Li-cor görüntüsü.....	50

Şekil 4.13. Kültür ve yabani popülasyonda SSR4 markerine ait Li-cor görüntüsü.....	50
Şekil 4.14. Kültür ve yabani popülasyonda SSR56 markerine ait Li-cor görüntüsü.....	51
Şekil 4.15. Kültür ve yabani popülasyonda SSR39 markerine ait Li-cor görüntüsü.....	51
Şekil 4.16. Kültür ve yabani popülasyonda SSR11 markerine ait Li-cor görüntüsü.....	52
Şekil 4.17. 30 nohut genotipine ait PCA grafiği.....	55
Şekil 4.18. RIL popülasyonunda SSR5 markerine ait jel görüntüsü	56
Şekil 4.19. RIL popülasyonunda SSR10 markerine ait jel görüntüsü	56
Şekil 4.20. RIL popülasyonunda SSR14 markerine ait jel görüntüsü	57
Şekil 4.21. RIL popülasyonunda SSR18 markerine ait jel görüntüsü	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kültürü yapılan nohutun sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2. Nohut türlerine ilişkin gen havuzları	5
Çizelge 3.1. Genom analizinde kullanılan anaçlar ve temel özellikleri.....	20
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kültür ve yabani nohut genotipleri	20
Çizelge 3.3. CTAB solüsyonu bileşenleri.....	23
Çizelge 3.4. SSR-1 PCR bileşenleri.....	25
Çizelge 3.5. SSR-2 PCR bileşenleri.....	25
Çizelge 3.6. SSR PCR protokolü	25
Çizelge 3.7. Licor jel matriks bileşenleri	26
Çizelge 3.8. Poliakrilamid jel bileşenleri	26
Çizelge 4.1. CA 2969 ve AWC 602 genotipleri arasında polimorfik olan SSR bölgeleri, dizayn edilen forward ve reverse primer sekansları, polimorfizm tipi	34
Çizelge 4.2. 30 genotipte her lokusta gözlenen min-max allel büyüklükleri.....	43
Çizelge 4.3. Kültür ve yabani populasyonlara ait genetik çeşitlilik parametreleri	45
Çizelge 4.4. Markerlere ait 30 genotip için ki-kare değerleri	58

1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer* L.) Fabaceae familyasının Fabaoideae (Papilionoideae) alt familyası ve Cicereae Alef. oymağında sınıflandırılmaktadır (Smykal vd. 2015). Cinsine ait 9 tek yıllık ve 40 çok yıllık olmak üzere toplam 49 takson olduğu bildirilmiştir (van der Maesen vd. 2007; Dönmez 2011; Öztürk 2011; Öztürk vd. 2013; Toker vd. 2014a, b; Smykal vd. 2015). Cins içinde tarımsal üretimi yapılan tek tür (*Cicer arietinum* L.) bulunmaktadır (van der Maesen 1972).

Tarımsal üretimi yapılan nohut tek yıllık, $2n=2x=16$ kromozomlu ve büyük ölçüde kendine döllen bir türdür. Nohut, dane ve bitkisel özelliklerine göre “kabuli” (*macrosperma*; pigmentless ya da antosiyaninless gövdeye, beyaz çiçeklere ve iri-krem renkli danelere sahiptir) ve “desi” (*microsperma*; pigmentli ya da antosiyaninli gövdeye, mor/mavi çiçeklere ve siyah, kahve ve yeşil renkli danelere sahiptir) olarak ikiye ayrılmaktadır (van der Maesen 1972; Zohary ve Hopf 2000). Değişik kaynaklara dayanarak en eski arkeolojik nohut kalıntılarının M.Ö. 7500–6800, Çayönü, Türkiye (Cubero 1981) ve M.Ö. 7260, Tell-el-Kerkh, Suriye (Tanno and Willcox 2006) kazılarında bulunduğu rapor edilmiştir. Kültürü yapılan nohutun köken merkezi Güney-Doğu Türkiye ve Suriye’nin kuzeyidir (Ladizinsky 1975; van der Maesen 1987). Nohutun ilkel formu (atası ya da progenitörü) *Cicer reticulatum* Ladiz. olarak kabul edilmektedir (Ladizinsky ve Adler 1976a).

Nohutun besin içeriği iklim, toprak yapısı, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir. Yaklaşık olarak 100 g nohut danesi 367 kcal enerji içermektedir (Acharjee ve Sarmah 2013). Kültürü yapılan nohut daneleri ortalama %19-22 protein, %38-59 karbonhidrat, %4,8-5,5 yağ ve %3 lif içermektedir (Hulse 1991; Iqbal vd. 2006). Genel olarak, nohut diğer baklagillere göre daha fazla miktarda yağ ve lif içermektedir (Acharjee ve Sarmah 2013). Baklagillerin protein seviyeleri ve aminoasit içerikleri %10–30 arasında değişmektedir. İyi bir protein kaynağı olup içinde esansiyel aminoasitleri de bulunduran 100 g nohut danesi, 5,2 g serin, 4,3 g prolin, 16 g glutamik asit, 11,7 g aspartik asit, 4,1 g alanin, 6,6 g valin, 7,6 g lösin, 4,4 g izolösin, 7,2 g lisin, 1,4 g metionin, 8,8 g arjinin, 4 g glisin, 2,3 g histidin içermektedir (Duke 1981; Huisman ve van der Poel 1994; Muehlbauer ve Tullu 1997). Nohut ayrıca önemli metabolik reaksiyonlar için elzem olan vitamin B-kompleksi, vitamin C, vitamin A ve vitamin K gibi zengin bir vitamin içeriğine sahiptir (Woods ve Grusak 2007). Bunun yanında önemli bir mineral, kalsiyum, fosfor, çinko ve demir kaynağıdır (Hulse 1991; Iqbal vd. 2006; Akibode ve Maredia 2011).

Nohut, Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü 2017 yılı istatistiklerine göre dünyada 14,6 milyon ha alanda yetiştirilmekte ve 14,8 milyon ton üretimi yapılmaktadır (FAOSTAT 2019). Aynı istatistikler incelendiğinde nohut ekim alanı baklagiller içinde fasulyeden sonra ikinci sıradadır. Türkiye de ise 2017 yılında 393 bin ha alanda nohut ekimi yapılmış ve 470 bin ton üretim sağlanmıştır (FAOSTAT 2019). 2017 yılında nohut ithalatı için 130 milyon \$ harcanırken, dış ticaretimiz miktar bazında yaklaşık 67 bin ton açık vermiştir. Oysa, Türkiye’nin daha önceki üretim sezonlarında dünyada nohut ihracat şampiyonu bir ülke olduğu bilinmektedir (FAOSTAT 2019).

Genetik varyasyonun tespit edilmesi ve kullanılması her zaman bitki ıslahının yapıtaşı olmuştur. DNA-tabanlı moleküler markerler germplasm koleksiyonlarındaki

ve/veya ıslah hatlarındaki genetik varyasyonun ortaya çıkartılması için oldukça faydalıdır. Moleküler markerler bitki tür ve genotiplerin tanımlanmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda en temel bitkisel ürünlerde çok sayıda moleküler marker geliştirilmiştir. Kullanılan mevcut moleküler markerler arasında DNA hibridizasyonuna dayalı olan RFLP gibi markerler ve PCR tabanlı olan RAPD, AFLP, ISSR, SSR ve SNP gibi markerler bulunmaktadır. Özellikle RAPD ve ISSR gibi dominant yapıdaki markerler tür içi ve türler arası genetik çeşitliliği belirleme çalışmalarında tercih edilmektedir. Ancak dominant markerler hem tür içi hem de türler arası genetik ilişkilerin belirlenmesinde, hem de filogenetik analizlerde yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla araştırmacılar çoğunlukla ko-dominant DNA markerleri kullanmayı tercih etmektedirler. Mikrosatellit (Simple Sequence Repeats, SSR) markerler ko-dominant yapısından dolayı en çok tercih edilen markerler arasında yer almaktadır. Mikrosatellitler bitki genomlarında kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde bulunan 1-6 nükleotid uzunluğunda DNA motiflerinden oluşan ardışık tekrarlı dizilerdir (Li vd. 2004; Parida vd. 2009). Mikrosatellitlerin tekrar sayılarındaki varyasyonlar bireyler arasında farklı boyutta ürünlere yol açtığından bu durum mikrosatellitlerin PCR tabanlı genetik marker olarak kullanılmasına yol açmaktadır (Beckmann ve Soller 1990). Mikrosatellit markerler genomdaki bolluğu, polimorfizm oranlarının yüksek oluşu, çok allelik yapısı, kodominant karakterli oluşu ve tekrarlanabilirliğinden dolayı genetik analizlerde diğer marker sistemlerine göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu markerler geniş ölçekli genotipleme çalışmalarına uygun olduğundan yüksek çözünürlükte genom haritalarının oluşturulması, gen/OTL haritalama ve marker destekli seleksiyon (Marker Assisted Selection, MAS) gibi birçok uygulamada yer almaktadır (Winter vd. 2000; Kujur vd. 2013). Nohutta, şu anda hem desi ve hem kabuli tipleri içeren draft genomların sekansları mevcut olup sırasıyla 30000 ve 81000 in silico mikrosatellit marker oluşturulmuştur (Jain vd. 2013; Varshney vd. 2013). Ancak bu kadar çok sayıdaki mikrosatellit markerin test edilmesi ve bunların arasından nohutta başarılı bir amplifikasyon ve polimorfizm meydana getirecek daha az sayıda setlerin seçilmesi oldukça iş gücü gerektiren ve yorucu bir iştir. Ayrıca nohutta türler arası polimorfizm oranının düşük olması geniş ölçekli (~%70) marker tanımlamalarını sınırlandırmaktadır (Sethy vd. 2006; Nayak vd. 2010; Bharadwaj vd. 2011; Gaur vd. 2011; Gujaria vd. 2011; Hiremath vd. 2011; Choudhary vd. 2012). Daha sonra kalan ~%30'luk etkin polimorfik markerlerin seçimi de maliyetli ve zaman alıcı olmaktadır. İstenilen polimorfizm potansiyeline ulaşmak ve etkin marker sayısını zenginleştirmek için günümüzde kullanılmaya başlanan yüksek ölçekli genotipleme çalışmaları marker allel boyutunu tahmin etmeye ve nohut genotipleri arasında türler arası allelik varyasyonları değerlendirmeye olanak tanımaktadır. Hızlı ve düşük maliyetli olarak milyonlarca (50–150 bp) DNA sekans okumaları üretebilme kapasiteli yeni nesil sekanslama teknolojileri (NGS) genomda SSR markerlerinin tanımlanması için sekans bilgisi kullanımına yol açmaktadır (Mardis 2008; Metzker 2010; Park vd. 2013).

Nohut, yaklaşık 740 Mb büyüklükte geniş bir genoma sahiptir. Önemli agronomik karakterleri kontrol eden gen veya QTL'lerin belirlenebilmesi ve harita konumlarının tespit edilebilmesi için yüksek çözünürlükte genetik haritaların çıkarılması oldukça önemlidir. Nohutun geniş genomu kullanışlı ve genom boyunca iyi dağılmış olan çok sayıda genomik veya transkript orijinli SSR markerler gerektirmektedir. Nohutta, uluslararası tanımlı haritalama populasyonlarından elde edilmiş 300 genomik ve genik SSR bulunduran linkage haritaları mevcuttur (Winter vd.

2000; Nayak vd. 2010; Gaur vd. 2011; Gujaria vd. 2011; Thudi vd. 2011; Choudhary vd. 2012). Oldukça uygun maliyetli, kullanımı kolay genotipleme analizleri için etkili SSR markerlerin bu mükemmel genetik katkılarının ışığında nohutta var olan linkaj haritaların iyileştirilmesi talep edilir bir özelliktir. Bu yüzden nohuttaki mevcut haritalara kazandırılacak yeni SSR markerler oldukça önemlidir. Bu markerlerin nohutun diğer yabani akrabalarında etkin olarak çalışması bunların karşılaştırmalı genomik çalışmalarında ve yabani türlerdeki gen aktarılabilirliği ve evrimsel analizlerinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. İlaven, bu markerlerin *C. arietinum* (♀) × *C. reticulatum* (♂) melezlerinden elde edilmiş F₆ aşamasına gelmiş rekombinant kendilenmiş hatlarda kullanılabilir olmasının test edilmesi ileride yapılacak marker destekli ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Nohut (*Cicer L.*) Cinsi İle İlgili Genel Bilgiler

Kültürü yapılan nohut (*Cicer arietinum L.*) Fabaceae (Leguminosae) familyasının, Fabaoideae (Papillionideae) alt familyasında yer almaktadır (Çizelge 2.1). Cicereae Alefeld oymağının *Cicer L.* cinsine ait olan bir türdür (van der Maesen 1972, 1984; Smykal vd. 2015). *Cicer* cinsi 9 tek yıllık ve 40 çok yıllık olmak üzere 49 takson içermektedir (Dönmez 2011; Ozturk 2011; Smykal vd. 2015).

Çizelge 2.1. Kültürü yapılan nohutun sınıflandırılması

Takım	Fabales
Aile	Fabaceae
Alt Aile	Fabaoideaea
Oymak	Cicereae Alef.
Cins	<i>Cicer L.</i>
Tür	<i>Cicer arietinum L.</i>

Nohut için, ülkemizde toplam 17 takson yayılış göstermektedir (Toker vd. 2014a, b). Nohut bitkisinin atası *Cicer reticulatum* Ladiz. olarak kabul edilmektedir (Ladizinsky ve Adler 1976a). Bu tür ülkemize özgü endemik bir tür olup sadece ülkemizde yayılış göstermektedir (Toker vd. 2014). *C. reticulatum* ilk defa Dereici, Savur, Mardin’de keşfedilmiş (Şekil 2.1) ve bilim dünyasına tanıtılmıştır (Ladizinsky 1975). Kültürü yapılan nohut *C. reticulatum* türünün doğal bir mutantıdır (Toker 2009, van Oss vd. 2015) ve yaklaşık 10 binyıl önce kültüre alınmıştır (Tanno ve Willcox 2006). En eski nohut örnekleri Suriye Tell-el-Kerkh’de bulunmuştur ve bulunan örnekler M.Ö. 7260 yılına aittir (Tanno ve Willcox 2006). *C. reticulatum* türünün ülkemize ait olması, en eski kazılardan bazılarının ülkemiz adresli olması, kültür nohutunun ülkemizdeki genetik varyasyon göz önüne alınırsa, nohut bitkisinin köken merkezinin Türkiye olduğunu göstermektedir.

Harlan ve de Wet (1971) tarafından verilen gen havuzları temel alınarak, nohut türleri kendi aralarında melezlenme durumlarına göre Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. *C. arietinum* ile *C. reticulatum* melezleri kısırlık sorunu göstermemektedir. *C. arietinum* ile *C. echinospermum* melezleri kısmen kısırlık sorunu göstermekte olup F₂ neslinde oldukça kısır bitkiler olduğu bildirilmiştir (Ladizinsky ve Adler 1976b; van der Maesen 1984; Jaiswal vd. 1986; Ladizinsky vd. 1988; Pundir ve Mengesha 1995; Singh ve Ocampo 1997; Gaur ve Gour 2002). *C. arietinum* ile *C. judaicum* (Verma vd. 1995) ve *C. arietinum* ile *C. pinnatifidum* (Mallikarjuna 1999) arasında melezlemelerden fidecikler embriyo kurtarma teknikleri yardımıyla elde edilmiştir. *C. arietinum* ile *C. bijugum* arasında yapılan melezlemelerden de embriyo kurtarma ile fidecikler elde edildiği bildirilmiştir (Lulsdorf vd. 2005; Clarke vd. 2006).

Çizelge 2.2. Nohut türlerine ilişkin gen havuzları

Bitki	Birinci gen havuzu	İkinci gen havuzu	Üçüncü gen havuzu
Nohut	<i>C. arietinum</i>	<i>C. judaicum</i>	Diğerleri
	<i>C. reticulatum</i>	<i>C. pinnatifidum</i>	
	<i>C. echinospermum</i>	<i>C. bijugum</i>	

**Şekil 2.1.** I. ve II. gen havuzundaki nohut türleri (Soldan sağa: *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. bijugum* ve *C. pinnatifidum*)

Kültürü yapılan nohutlar bitki ve dane özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır “Kabuli” ya da *Macroserma* nohutlar (dilimize iri daneli nohutlar olarak çevrilebilir) diğer gruba göre daha iri, krem ve krem-beyaz renkli daneli, beyaz çiçekli ve pigmentless bitkilerden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Bu tip nohutların danelerinde lif miktarı azdır. “Desi” ya da *Microserma* nohutlar (dilimize küçük daneli nohutlar olarak çevrilebilir) ise daha küçük, değişik renklerde daneli, pembe-mor ile mavi çiçekli ve pigmentli bitkilerden meydana gelmektedir (Muehlbauer ve Singh 1987; van der Maesen vd. 2007). “Desi” nohutlar “kabuli” nohutlara göre daha çok dallanıp daha çok bakla meydana getirmektedir (van der Maesen 1972; Auckland ve van der Maesen 1980). Bunlar Hindistan başta olmak üzere Uzak Doğu ülkelerinde nispeten kurak alanlara uyum sağlamışlardır (Saxena 1987) ve bu özelliklerinden dolayı kuraklığa daha dayanıklıdır (Canci ve Toker 2009).



Şekil 2.2. “Kabuli” ve “desi” nohutlar

Kültürü yapılan nohut 20-100 cm boylanabilen, 100-dane ağırlığı 8-70 g arasında (van der Maesen 1972; Auckland ve van der Maesen 1980; Cubero, 1987; Singh 1991), bitkinin tüm yeşil dokuları (çiçeğin taç yaprakları ve kökü dışında) tüylü ve tüycükleri özel bir salgı üreten bir türdür. Bitki oksalik, malik, süksinik, quinik ve citrik asit bulundurmaktadır (Toker vd. 2006). Bu salgı tuzlu bir tat verir. Gövdesi hafif dört köşeli bir görünüm arz eder. Gövde dik, yatık ya da yarı yatık formlarda az ya da çok dallanmaktadır (Knight 1993).

Yapraklar genellikle bileşik yaprak şeklinde olmakla beraber, basit ve çok yaprakçıklı (multipinnate) yaprak şekilleri de mevcuttur. Yaprakçıkların uçları dişli olup, bitkide alternatif bir şekilde yerleşmişlerdir. Yaprakların uç kısmı yaprakçıkla sonlanmaktadır. Yaprak sapının gövdeye bağlandığı yerde sağ ve solunda genellikle dişli üçgen şeklinde kulakçık bulunmaktadır. Muehlbauer ve Singh (1987) genelde 5 farklı yaprak ve yaprakçık şekli, Pundir vd. (1981) 4 yaprak şekli olduğunu (bipinnate, basit, dar ve bileşik) ve Pundir vd. (1990) ise 3 yaprak şeklinin olduğunu ifade etmiştir. Kültürü yapılan nohutta bulunan 3 yaprak şekli Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kültürü yapılan nohutta basit (üst), normal (sol) ve çok parçalı (sağ) yapraklar

Çiçekler yaprak koltuklarından çıkar ve “kabuli” nohutlar beyaz, “desi” nohutlar ise genelde mor ve nadiren mavi renklidir (Şekil 2.4). Çiçek salkımı (pedinkula) genelde 1 ve bazı mutant nohutlarda 2 (ender olarak 3 ve 9’a kadar) çiçek taşımaktadır (Şekil 2.3). Çanak yapraklar 7-10 mm kadardır. Taç yapraklar 1 bayrak yaprağı, 2 kanatçık ve alttan birleşik 2 kayıkçık yapraktan meydana gelmiştir. 9+1 erkek organ ve 1 adet dişi organ bulunmaktadır. Kapalı çiçek yapısından dolayı kültürü yapılan nohut büyük ölçüde kendine döllenmektedir. Yumurtalık 4’e kadar yumurta hücresi taşımaktadır (van der Maesen 1987; Cubero 1987).

Meyveler bakla ya da çakıldak olarak bilinmektedir. Baklalar 14-29 mm uzunluğunda ve 8-20 mm enindedir. Baklaların uçlarında gaga şeklinde bir çıkıntı vardır. Tek dikişli ve içi hava dolu olan baklalar salgı tüyleriyle kaplıdır. Bitkide bakla sayısı genotip, ekim zamanı, yetiştirme koşullarına ve kullanılan girdiye göre 1000’e kadar çıkabilmektedir (van der Maesen 1972; Aucland ve van der Maesen 1980). 100-dane ağırlıkları 3.8-59.1 gr aralığında farklılık göstermektedir (Pundir vd. 1988).



Şekil 2.4. Kültürü yapılan nohutta beyaz (sol), mor (orta) ve mavi (sağ) renkli çiçekler

2.2. *Cicer reticulatum* Ladiz.

Kültürü yapılan nohut gibi *C. reticulatum* türü de kendine döllen ve $2n=2x=16$ kromozom sayısına sahip bir türdür (Ladizinsky ve Adler 1976b; Ohri ve Pal 1991; Ocampo vd. 1992). Genom büyüklüğü 416 Mb'dir (Gupta vd. 2017). *C. reticulatum* ilk bakışta 'desi' ya da '*microsperma*' nohutlara benzemektedir. *C. reticulatum* ve 'desi' nohutlar pigmentli bitkilere sahiptir.

Yapraklar normal, yaprakçıklar küçük, çiçekler mor renkli (Şekil 2.1), baklalar küçük 1-4 daneli ve daneler kahverengi, siyahımsı kahverengi ve yeşilimsi kahverengi renklerindedir (Robertson vd. 1997; Abbo vd. 2014; Talip vd. 2018). *C. reticulatum* türü tohum kabuğunun ağsı (*reticulate*) bir tabaka ile kaplı olması (Şekil 2.4) ve büyüme habitusunun sürünücü, yatık, yarı-yatık olması, baklalarını çatlatması, danelerini dökmesi, soğuklama (Abbo vd. 2002; Samineni vd. 2016) ihtiyacı gibi özelliklerinden dolayı 'desi' nohutlardan farklıdır (Toker vd. 2014). *C. reticulatum* 3-5 (7) çift ile "desi" nohutlardan daha az yaprakçıklı ve daha kısa (1 mm'den kısa) kılçıklıdır. *C. reticulatum* yaprak koltuğundan tek çiçek meydana getirirken (Ozturk 2011; Ladizinsky ve Abbo 2015), oysaki bazı "desi" nohutlar iki, ender olarak üç çiçek taşımaktadır (Gaur ve Gour 2002; Srinivasan vd. 2006; Ozturk 2011; Ladizinsky ve Abbo 2015). Çiçek sayısı bazı mutantlarda 9'a kadar çıkabilmektedir (Srinivasan vd. 2006). *C. reticulatum* türünün çoğu genotipinin (aksesyonu) canlı ve cansız streslere dayanıklı olduğu bilinmektedir (Robertson vd. 1995; Singh vd. 1998; Toker vd. 2014a, b).

2.3. Kültürü Yapılan Nohutta Tür İçi ve Türler Arası Melezlemeler

Singh (1987) "kabuli" ve "desi" tipteki nohutlar arasında karşılıklı (resiprokalleri de dâhil) olacak şekilde yapılan melezler sayesinde nohut ıslah programlarındaki önceliklerin ilk defa ICRISAT (The International Crop Research Institute for Semi Arid Tropics=Yarı-Kurak Bölgeler İçin Uluslararası Bitki Araştırma Enstitüsü) tarafından düzenlenen nohut ıslah çalıştayında yapıldığını rapor etmiştir. Bu

çalıştayda nohut ıslah çalışmalarındaki öncelikler şu şekilde sıralanmıştır: (i) bazı önemli özellikler “kabuli” tipteki nohutlardan “desi” tipteki nohutlara aktarılması (iri tohum özelliği, uzun bitki boyu, soğuk toleransı, ve yanıklık hastalığına dayanıklılık) (ii) bazı özelliklerin “desi” tipteki nohuttan “kabuli” tipteki nohutlara aktarılması (daha fazla ikincil dal, bakla, dane sayısı, kuraklığa tolerans ve solgunluk [*Fusarium oxysporum* Schlecht. & Emnds. f. *Snyd. Hans. sp. ciceri* (Padwick) Snyd. & Hans] hastalığına dayanıklılık). (iii) üstün (transgrasif) açılmalar (iv) geri melezler sayesinde çeşitli verim öğelerinin aktarılması ve erkenciliğin sağlanması (v) “desi” tipteki nohutların kalite bakımından iyileştirilmesi ve (vi) “desi” × “kabuli” ve “kabuli” × “desi” melezlerinde önemli genlerin aktarılması olarak özetlenmiştir.

Nohutta yapılan melezleme ıslahı çalışmaları sonucu dünya genelinde 2005 yılında 350’den fazla nohut çeşidi tescil ettirilmiştir (Gaur vd. 2007). Bu sayı ülkemizde 46 çeşittir (TTSM 2019). Yine diğer geleneksel ıslah çalışmalarından mutasyon ıslahı ile elde edilen mutant nohut çeşidi sayısı 25 olarak verilmiştir (Toker 2014). Mutant nohut ülkemizde 1 adettir (TTSM 2019).

Nohutta ilk türler arası melezleme Ladizinsky ve Adler (1976b) tarafından yapılmıştır. Bu çalışma sonucu *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* türlerinin kültürü yapılan nohutla melezlenebildiği diğer tek yıllık birçok yabancı nohutun melezlenemediği görülmüştür (Ladizinsky ve Adler 1976b; van der Maesen 1980; Pundir vd. 1983; Jaiswal vd. 1986; Singh ve Ocampo 1993, 1997; Ahmad ve Slinkard 2004; Singh vd. 2005; Abbo vd. 2005; Toker vd. 2013). Bu ilk türler arası melezleme çalışmasından sonra değişik amaçlar için kültür nohutu ile *C. reticulatum* melezlenmiştir. Bu çalışmaların çoğu moleküler çalışmalarda gen haritalaması amacıyla yapılmıştır (Winter vd. 1999; Santra vd. 2000; Winter vd. 2000; Rajesh vd. 2002; Tekeoglu vd. 2002; Pfaff ve Kahl 2003; Toker vd. 2014). Oysaki yabancı nohutlar, kültürü yapılan nohuta göre canlı ve cansız streslere daha dayanıklıdır (Robertson vd. 1995; Singh vd. 1998; Toker 2005; Toker vd. 2007; Canci ve Toker 2009).

Singh ve Ocampo (1997) yapmış oldukları çalışmada ILC 482 nohut hattını *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* türleri ile melezlemişlerdir. Yapılan melezlemeler; [ILC 482 (*C. arietinum*) × ILWC 179 (*C. echinospermum*)] ve [ILC 482 × ILWC 124 (*C. reticulatum*)] ve karşılıklı melezlemelerdir. F₁ populasyonunda heterosis değerleri bulunmuştur ve ayrıca F₂ populasyonunda tek bitki düzeyinde de dane verimi bakımından üstün ebeveynler rapor edilmiştir. Bu çalışmanın devamında ise seçilen genotipler bulk olarak F₅ neslinde yetiştirildikten sonra F₆ neslinde 96 tane genotipten dane verimi özelliği bakımından üstün olan 22 tane hat seçilmiş bu hatlar 14 farklı tarımsal özellik bakımında değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda yabancı olarak kullanılan *C. echinospermum* ve *C. reticulatum* verim artışı için nohutta türler arasında kullanılabilecek önemli yabancı kaynaklar olarak vurgulanmıştır.

Thompson vd. (2011) yapmış olduğu çalışmada Avusturalya kültürü yapılan nohut çeşitlerinin bazı nematot türlerine karşı dayanıklılığın arttırılması için *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* yabancı türleri ile melezlemeler yapmıştır. ‘Top cross’ melezlemeler ile F₄ neslinde bazı hatların nematot hastalığına karşı kültürü yapılan çeşitlerden daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Singh vd. (2005) yapmış oldukları çalışmada kültürü yapılan nohut ile *C. reticulatum* melezlenmiş ve sonra geri melez yapılarak türler arası melezlemelerden gelen istenmeyen özellikler arındırılmıştır. Türler arası melezlemeler ile F₇ nesline kadar gelen hatlar kontrol grubuna göre %16.9 verim artışı sağlamıştır. Bu çalışma sonunda türler arası melezleme sonunda elde edilen 22 genotip ayrıca solgunluk, kök ve gövde çürüklük hastalıklarına da dayanaklı olduğu tespit edilmiştir.

Singh vd. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada dört farklı türler arası melez kombinasyonu kullanmıştır. Buna göre F₁ neslinde bitkide bakla sayısı ve bitkide tohum verimi bakımından heterosis bulduklarını belirtmişlerdir. Yapılmış olan ‘Pusa 1103’ × ILWC 46 (*C. reticulatum*), ‘Pusa 256’ × ILWC 46 ve ‘Pusa 256’ × ILWC 239 (*C. echinospermum*) melezleri ise ölçülen birçok verim bileşeni bakımından daha iyi olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda ise melezlemelerde kullanılan bu nohut yabancı türlerin dane verimi bakımından olduğu gibi geniş adaptasyon özelliği kazanılması bakımından da değerlendirilebileceği vurgulanmıştır (Adak vd. 2017; Koseoglu vd. 2017).

2.4. Genomda SSR (Simple Sequence Repeats) Bölgeleri

Moleküler markerler genetik çeşitlilik, karakterle ilişkili QTL haritalaması ve evrimsel çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Moose ve Mumm 2008). Bitki ıslahı programlarında genom seviyesindeki çok sayıda marker çeşitliliğine rağmen, mikrosatellitler veya basit tekrarlı diziler (SSRs) genomdaki bolluğu, çok allelik yapısı, yüksek tekrarlanabilirliği ve ko-dominant özelliğinden dolayı en etkili markerlerden sayılmaktadır (Sunnucks 2000; Choudhary vd. 2009; Dutta vd. 2011). SSR’lar tüm ökaryot genomlarında bulunan ard arda dizilmiş 1-6 nükleotid tekrarlarından oluşmaktadır (Tautz ve Renz 1984; Lagercrantz vd. 1993; Ellegren 2004; Thomson 2014). SSR markerlerinin kullanımı pratik ve kolaydır. Bu özel bölgeler genom boyunca dağılmış olup oldukça yüksek polimorfizm oranına ve aktarılabilirlik özelliğine sahiptir (Saha vd. 2006; Wang vd. 2010). Aynı zamanda SSR markerleri bitkilerde sınıflandırma ve genetik çeşitlilik çalışmalarında oldukça etkili birer araçtır (Liu vd. 2014). Geliştirilmiş bu moleküler araçlar ise moleküler marker yardımcı ıslah çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Varshney ve Tuberosa 2007).

SSR markerlerin geliştirilmesinde, oligonükleotid tekrarlı genomik kütüphaneler, DNA veri bankaları, bakteriyal yapay kromozom klonları (BAC), var olan SSR markerlerinin türler ya da cinsler arasındaki transferi ve rastgele seçilmiş primerlerle tekrarlı bölgelerin taranması gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Nohutta başlangıçta di-, tri-, ve tetra oligonükleotid tekrarlı problemleri içeren küçük insert’li genomik kütüphanelerin taranmasıyla 16 SSR rapor edilmiştir (Hüttel vd. 1999). Daha sonraki bir çalışmada ise genomik kütüphanelerden boyut seçimi ile 174 SSR belirlenmiştir (Winter vd. 1999). İlerleyen zamanlarda ise Lichtenzweig vd. (2005) tarafından BAC kütüphanelerinden geliştirilen SSR markerleri rapor edilmiştir. Yine bunlara ilaveten ICRISAT tarafından, mikrosatellit bakımından zengin kütüphanelerden ve BAC klonlarından 311 SSR geliştirilmiştir (Nayak vd. 2010). Thudi vd. (2011) yaptığı çalışmada sekanslanan 55.680 BAC klonu içinden 6.845 SSR motifi belirlemiş ve 1.344 SSR markeri dizayn etmiştir. Son yıllarda transkriptomların anlaşılmasına başlanması ile stres koşullarında bitki dokularında EST bölgeleri ıslah uygulamalarında kullanılmaya başlanılmıştır (Buhariwalla vd. 2005; Hiremath vd. 2011; Garg vd. 2011a, b; Singh vd. 2013; Afonso-Grunz vd. 2014; Kudapa vd. 2014).

Yine bunun başka bir örneği olarak, kuraklık ve tuzluluğa yanıt oluşturan EST bölgelerinden 177 yeni EST-SSR geliştirilmiştir (Varshney vd. 2009).

2.5. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri (NGS)

Genetik varyasyonun tespit edilmesi ve kullanılması bitki ıslahı çalışmalarının önemli bir parçası olmuştur. DNA-tabanlı moleküler markerler germplasm koleksiyonlarındaki ve/veya ıslah hatlarındaki genetik varyasyonun ortaya çıkarılması adına oldukça faydalıdır. Son 20 yıl içinde dünya üretiminde etkili olan önemli bitkilerde çok sayıda moleküler marker geliştirilmiştir. Bu markerler ekonomik öneme sahip karakterleri kontrol eden belirli bir gen veya OTL bölgelerinin genetik veya fiziksel haritalarının oluşturulması için yoğun olarak kullanılmaktadır (Varshney vd. 2005b). Ayrıca bi-parental populasyonlar kullanılarak gen veya QTL haritalamanın yanında, ilişki haritalaması (Ersoz vd. 2007), ileri ve geriye melezlemeli QTL analizleri (Tanksley ve Nelson 1996), fonksiyonel genomik çalışmaları (Schena 1998), allel belirleme (Varshney vd. 2005a), TILLING ve EcoTILLING (Till vd. 2007) gibi yeni yaklaşımlar son zamanlarda popüler olmuştur. Genomik yardımcı ıslah farklı genomik stratejileri ve araçları kullanan bütünsel bir yaklaşımdır (Varshney vd. 2005b). Farklı araçları kullanarak genotipten fenotip tahmini genomik yardımcı ıslahın temelini oluşturmaktadır. Genotipten fenotipin belirlenmesinin doğruluğu ve etkin kullanımı, biyotik ve/veya abiyotik streslere dayanıklı, aynı zamanda yüksek agronomik performansa sahip ürünlerin daha kısa sürede geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Çok sayıda bitki türünde genomik yardımcı ıslahın başarılı örnekleri bulunmaktadır (Varshney vd. 2007).

Genomik yardımcı ıslah çalışmaları çok sayıda model bitki türü ve ürün grubunun ulaşılabilir genom ve transkriptom sekans verilerinin elde edilmesiyle önemli bir ivme kazanmıştır. Tamamlanmış veya draft genom sekansları çeltik (Barry 2001; Yu vd. 2002; Goff vd. 2002; International Rice Genome Sequencing Project 2005), sorgum (<http://www.phytozome.net/sorghum>) (Bedell vd. 2005; Paterson vd. 2009), kavak (<http://www.phytozome.net/poplar.php>) (Tuskan 2006), asma (<http://www.phytozome.net/grape.php>) (Jaillon vd. 2007), papaya (Ming vd. 2008), yonca (<http://www.medicago.org/genome>) ve soya (<http://www.phytozome.net/soybean>) gibi birçok bitkide mevcuttur. Mısır (<http://www.maizegenome.org>), buğday (<http://www.wheatgenome.org>), arpa (<http://www.public.iastate.edu/imagefpc/IBSC%20Webpage/IBSC%20Template-home.html>), domates (http://sgn.cornell.edu/about/tomato_sequencing/) ve cin darı (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/99178.html>) gibi ürünlerde tüm genom sekanslama çalışmaları ise devam etmektedir. Bu çalışmaların yanında etkin olarak kullanılmakta olan transkriptom analizleri, ekonomik öneme sahip bitkilerin ifade edilen sekans dizilerinin (EST) elde edilmesine olanak sağlamaktadır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Önceleri genom ve transkriptom dizileme projeleri Sanger sekanslama ile yapılmakta iken (Sanger vd. 1977) insan genom projesindeki gelişmelerle birlikte yeni nesil dizileme teknolojileri (NGS) ortaya çıkmıştır. Bu teknolojiler DNA sekans verisini geleneksel teknolojilere göre daha uygun bütçeyle ve hızlı bir şekilde oluşturmaya olanak tanımaktadır. Sekanslama teknolojilerindeki ilerlemeler, düşük bütçeyle yapılması ve daha önceliklerle kıyaslandığında çok yüksek oranda okuma kapasitesiyle tüm genomu yeniden sekanslamaya imkan tanımaktadır (Hudson 2008; Gupta 2008; Mardis 2008).

Sanger sekanslama teknolojisi (Sanger vd. 1977) ve onun modifikasyonları (Smith vd. 1986; Prober vd. 1987; Madabhushi vd. 1998) yaklaşık 30 yıldır kullanılmaktadır. Son 10 yılda Sanger okuma uzunlukları 450 bazdan 1 kb'ın üzerine çıkarılmıştır. Halen tüm genom sekanslama projelerinde Sanger teknolojisinde mevcut olan *E. coli* yardımcı klonlama kullanılmasına rağmen PCR tabanlı metodların gelişmesiyle teknolojinin kullanılabilirliği kolaylaşmıştır. Azalan reaksiyon hacimleri ile tek reaksiyon maliyeti oldukça düşmüştür (Smailus vd. 2005). Ancak maliyetin azalmasıyla ortaya çıkan temel kısıtlamalar teknolojik sınırlamaları da yanında getirmiştir. Teknoloji temelli bu darboğaz arayüzler, nanoteknoloji ve biyoinformatik alanlarındaki ilerlemeler ile aşmaya çalışılmıştır. NGS terimi, Sanger sekanslamanın dışındaki ticari olarak mevcut olan veya geliştirilmekte olan diğer teknolojiler ile kullanılmaktadır (Shendure vd. 2004; Kling 2005). Bu teknolojiye bakteri ve virüs genomları için geliştirilen ilk ticari platform Roche/454 (<http://www.454.com/>) olmuştur. Daha sonra insan, bitki ve fare gibi kompleks genomlar için kullanılan Illumina genome analyzer (<http://www.illumina.com/>), ABI SOLiD (http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologiesSOLiDSyste mSequencing/index.htm), Pacific Bioscience (<http://www.pacb.com/>), Ion Torrent (<http://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html/>), Oxford Nanopore (<http://www.nanoporetech.com/>), ve Qiagen Gene Reader (<http://www.genereaderngs.com/>) gibi ticari platformlar bulunmaktadır (Egan vd. 2012; Mardis 2017).

Yeni nesil dizileme teknolojileri tüm genom sekanslama (Whole genome sequencing, WGS), de novo assembly sekanslama, yeniden sekanslama (WGRS), DNA ve RNA seviyesinde transkriptom sekanslama gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Bilinen bir genomun yeniden sekanslanmasına dayanan WGRS, genotip ve fenotip arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına ve referans sekanslar arasındaki farklılıkların ortaya çıkarılmasına olanak tanımaktadır (Lee vd. 2013). Daha az genotip sayısı içeren ebeveynler, kültüre alınmış populasyon veya yabani türlerde genom varyasyonlarını daha detaylı incelemek için oldukça elverişlidir (Li vd. 2011). Bu güne kadar çeltik (Huang vd. 2012; Wang vd. 2014), sorgum (Mace vd. 2013), domates (Lin vd. 2014), ve nohut gibi bitkilerde (Lake vd. 2016; Sadras vd. 2016; Thudi vd. 2016) birçok WGRS çalışması rapor edilmiştir.

2.6. SSR Markerlerinin Kullanımıyla İlgili Yapılan Çalışmalar

Lichtenzweig vd. (2005) büyük girdili BAC ve bitki-transformasyon komponentli binari BAC (BIBAC) kütüphaneleri oluşturmanın ve buralardan geliştirilen SSR markerlerin genomik araştırmalarda oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada nohutun nükleer DNA'sından BAC ve BIBAC kütüphaneleri oluşturmuşlardır. BAC kütüphanesi 14 976 klon içerip ortalama insert büyüklüğü 121 kb'dır. BIBAC kütüphanesi ise 23 040 klondan oluşup ortalama insert büyüklüğü 145 kb'dır. Çalışmada BAC kütüphanesini 8 sentetik SSR oligoları (GA)₍₁₀₎, (GAA)₍₇₎, (AT)₍₁₀₎, (TAA)₍₇₎, (TGA)₍₇₎, (CA)₍₁₀₎, (CAA)₍₇₎, ve (CCA)₍₇₎ ile taramışlardır. Pozitif olan BAC'lar seçilmiş ve SSR marker gelişimi için sekanslanmıştır. 233 yeni SSR markeri geliştirilmiştir. Bu markerler PCR ile karakterize edilmiş ve nohut genotiplerinde denenmiştir. Çalışmada BAC'ların SSR markerlerini geliştirmek için oldukça önemli birer kaynak olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu

çalışmada nohut genomundaki SSR lokuslarının dağılımları incelenmiştir. (TAA)(n) ve (GA)(n) motiflerinin diğerlerine göre daha fazla oldukları rapor edilmiştir.

Choudhary vd. (2009) çalışmalarında nohutun 3. önemli baklagil bitkisi olmasına rağmen türe özgü geliştirilen genomik kaynakların oldukça sınırlı olduğunu vurgulamıştır. Çalışmalarında 1309'u nohutun EST veri bankasından ve 822'si olgun olmayan tohumlardan toplamda 2131 EST-SSR kullanılmıştır. 246 SSR motifi belirlenmiş olup bunlardan 183 primer çifti dizayn edilmiş ve bunlardan 60'ı işlevsel marker olarak doğrulanmıştır. 30 nohut genotipi ile yapılan genetik çeşitlilik analizlerinde toplam 29 allel üreten 10 polimorfik marker bulmuşlardır. Analizlerde gözlenen heterozigotluk ortalaması 0.16 olup türler arası polimorfizm oranı oldukça düşük seviyelerdedir. Ancak markerler yüksek oranda (%68.3 ve %96.6 arasında) tür içi ve türler arasında transfer edilebilir özelliktedir. Oluşturulan filogenetik dendrogram kültür genotiplerini yabancı nohut türlerinden ayırmıştır. Bu yüzden bu çalışma nohut transkript bölgelerinde bulunan SSR'ların dağılımının anlaşılmasına ve bunların kullanımına olanak tanımıştır.

Gupta vd. (2009) yaptıkları çalışmada bir tür yonca olan *Medicago truncatula* Gaertn. türü için EST-SSR markerleri geliştirmiş ve bu markerlerin diğer türlere geçiş etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada 198 642 *M. truncatula* EST sekanslarından 36 847 gen belirlenmiştir. 11 750 SSR bölgesi bulunduran EST'lerden 14 637 EST-SSR ortaya çıkarılmış ve 4636 primer çifti (%39.5) başarılı bir şekilde dizayn edilmiştir. 14 637 SSR'ın (%82.6) mononükleotid tekrarları olup kalanının ise di-, tri-, tetra ve pentanükleotid ve tekrarlarından oluştuğu gösterilmiştir. Rastgele seçilen 41 primer test edilmiş ve 3 baklagil türü ve 3 baklagil olmayan farklı türlerde denenmiştir. Çalışmanın bulgularına göre markerler yüksek oranda baklagil (%53-%71) ve baklagil olmayan (%33-%44) türlerde geçiş etkinliği göstermiştir.

Datta vd. (2010) hint bezelyesi [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] bitkisinde polimorfik markerların yetersiz oluşunun moleküler uygulamaları sınırlayıcı bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Mikrosatellit marker geliştirmenin zaman alıcı, uzmanlık ve altyapı gerektiren bir süreç olduğunu ifade etmelerinden dolayı bunun yerine yakın akraba cinslerden marker transferinin farklı bir alternatif olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla nohut bitkisine spesifik 100 korunmuş SSR bölgesinin markerlarını 5 yabancı ve 1 kültür *Cajanus* türünde çalışmışlardır. Nohut mikrosatellitlerinin bu türe aktarılabilirlik oranı %46 olarak bulunmuştur. Bu oran kültür genotiplerinde %38-39, yabancı türler arasında ise %26 ile %40 arasında değişmiştir. Çalışmada her marker için ortalama allel sayısı 4.11 olarak bulunmuştur.

Nayak vd. (2010) çalışmalarında nohutta SSR ve SNP markerleri geliştirmişlerdir. Çalışmada *Cicer arietinum*, ICC 4958 × *C. reticulatum*, PI 489777 melezlerinden meydana gelen haritalama populasyonunu kullanılmışlardır. Araştırmacılar ICC 4958'in genomik kütüphanesinden elde ettikleri 311 SSR markerini 48 nohut genotipinde taramışlardır. Bunlardan 147'si polimorfik olup allel sayısı 2-21 arasında değişmektedir. PIC değeri 0.04-0.92 olarak hesaplanmıştır. Bu markerlerden 52'si haritalama populasyonunun ebeveynleri arasında polimorfik bulunmuştur. Çalışmada ayrıca daha önceden bulunmuş 233 SSR marker analiz edilmiştir. Buna ilaveten nohut ve ona yakın akraba *Medicago truncatula* türünün yüksek oranda korunmuş transkript sekanslarından elde edilmiş 71 SNP markeri geliştirilmiştir. Bu üç

yaklaşım ile 175 yeni marker lokusu ve 407 önceden rapor edilmiş marker lokusları birleştirilerek genetik harita oluşturulmuştur. Bu harita, ortalama markerlar arası uzaklık 4.99 cM, toplamda 8 linkaj grubu içinde 2.602 cM mesafede olacak şekildedir. Çalışmanın sonucunda gen tabanlı markerlerin *Medicago* ve nohut türünün genomlarını karşılaştırmak için önemli bağlantı noktaları oluşturduğunu vurgulamışlardır.

Thudi vd. (2011) yaptıkları çalışmada BAC-sonlu sekanslardan (BESs) SSR markerları aynı zamanda DArT markerları geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Elde edilen markerlarla ICC 4958 (*C. arietinum*) ve PI 489777 (*C. reticulatum*) ebeveynlerinden meydana gelen RIL populasyonunda yüksek çözünürlükte bir genetik harita oluşturmak amaçlanmıştır. Çalışmada, 55 680 klondan oluşan bir BAC kütüphanesi oluşturulmuş ve 46 270 BES üretilmiştir. BES'lerden 6845 SSR elde edilmiş ve bunların 1344'ü için primer dizayn edilmiştir. Aynı zamanda 15 000 klondan DArT markerları geliştirilmiş 5397 klon testlenen 94 genotip arasında polimorfik bulunmuştur. RIL populasyonunun ebeveynleri arasında testlenen markerlardan 253 BES-SSR ve 675 DArT markerının polimorfik olduğu belirtilmiştir. Bu markerlarla birlikte daha önceki yapılmış çalışmalardan derlenen 494 marker genetik harita oluşturmak için kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda 8 linkaj grubu üzerinde toplamda 845.56 cM uzaklıkla yerleşen 1291 markerdan oluşan genetik harita meydana getirilmiştir (<http://cmap.icrisat.ac.in/cmap/sm/cp/thudi/>). Her linkaj grubundaki marker sayıları 68 (LG 8) ve 218 (LG 3) arasında değişmekte olup her markerın birbirine uzaklığı ortalama 0.65 cM'dır.

Sefera vd. (2011) çalışmalarında köken merkezleri 9 farklı ülke olan ve ICRISAT ve Etiyopya ıslah programlarında yoğun olarak kullanılan 48 nohut genotipini 48 SSR markerı kullanarak değerlendirmişlerdir. Genotipler arasında toplam 504 allel meydana gelmiş ve her lokustaki allel sayısı 3 ile 22 arasında (ortalama: 105) dağılım göstermiştir. PIC değeri 0.37 ile 0.91 arasında (ortalama: 0.77) değişkenlik göstermiştir. Sadece 3 SSR (TA176, TA2, TA180) 48 genotipin tam ayrışmasına olanak vermiştir. UPGMA metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçta 48 genotipin desi ve kabulü olarak ayrıştığı 2 büyük grup gözlenmiştir. Sonuç olarak, SSR'ların nohutta genetik çeşitlilik ve akrabalık analizlerinde etkili birer marker olduklarını ve bu yolla ıslah programlarında doğru ebeveynlerin seçilmesinde etkili birer araç olduklarını vurgulamışlardır.

Atalay ve Babaoglu (2012) 13 SSR markeri kullandıkları çalışmalarında 29 nohut genotipi arasındaki genetik ilişkiyi araştırmışlardır. Markerlardan elde ettikleri PCR ürünlerini Beckman Coulter CEQ-8000 cihazını kullanarak kapiler elektroforez ile ayırtmışlar ve bantları var (1) ve yok (0) olarak skorlamışlardır. Primerler toplam 134 allel meydana getirmiş ve bunlardan 122 tanesinin polimorfik olduğu gözlenmiştir. Heterozigotluk oranı 0.23 ile 0.42 arasında ve PIC değeri 0.70 ile 0.89 arasında dağılım göstermiştir. Genetik benzerlik indeksi 0.45 ile 0.87 arasında değişmiştir. UPGMA metoduna göre oluşturulan filogenetik ağaçta nohut genotipleri arasında yüksek oranda benzerlik olduğu gözlemlendiği için Türk nohut çeşitlerinin oldukça dar bir genetik tabanı olduğu ifade edilmiştir.

Choudhary vd. (2012) nohutun birinci gen havuzu üyelerinden olan 38 genotip *C. arietinum*, 6 genotip *C. reticulatum* ve 4 genotip *C. echinospermum* arasındaki genetik yapıyı ve akrabalık ilişkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 100 SSR

markeri kullanmışlardır. Her lokustaki allel sayısı 2 ile 11 arasında (ortalama: 4.8), PIC değeri 0.040 ile 0.803 arasında (ortalama: 0.536) dağılım göstermiştir. Genetik çeşitlilik büyük oranda PIC değeri ve heterozigotluk oranı daha yüksek olan yabani türler etrafında toplanmıştır. Bunun nedeninin kültürü yapılan nohutun dar genetik tabanından dolayı olduğunu vurgulamışlardır. Oluşturdukları filogenetik ağaç, PCA ve popülasyon analizleri ile genotipler arasındaki ilişkiyi göstermiştir.

Mishra vd. (2012) EST bölgelerinden geliştirilen SSR markerlerinin yeni genlerin tanımlanması ve aynı zamanda haritalama çalışmalarında oldukça kullanışlı olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında EST tabanlı SSR markerleri geliştirmiş ve bu markerlerin haritalama çalışmalarındaki etkinliğini ve türler arası aktarılabilişliğini değerlendirmişlerdir. 18 522 bezelye EST sekansından 10 800 gen belirlenmiştir. MISA ile bu genlerin incelenmesi ile 2395 mikrosatellit içeren EST bölgesinden 2612 SSR tanımlanmış ve buradan 577 primer çifti dizayn edilmiştir. EST-SSR'larda en çok bulunan tekrarlı motif mononükleotidler (%85.2) olup bunu trinükleotidler (%10.6) ve dinükleotidler (%2.8) izlemiştir. Rastgele seçilen 108 primer çifti arasından 40'ı haritalamada ve 68'i 6 baklagil türü arasındaki geçiş etkinliğini test etmek amacıyla denenmiştir. Primerlerin %85'i başarılı bir şekilde bant meydana getirmiş, %60'ı polimorfizm göstermiş ve %47.5'i ise haritalanmıştır. Her lokustaki allel ortalaması ise 3.8'dir.

Liu vd. (2013) çalışmalarında 15 farklı yonca bitkisinin doku örneklerinden Illumina paired-end sekanslama ile 28 milyondan fazla sekans okuması elde etmişlerdir. Ortalama 803 bp uzunluğunda toplam 40 433 gen de novo assembly ile elde edilmiştir. Bilinen potteinlerle sekans benzerlikleri analizlerine göre 36 684 (%90.73) gen bildirilmiştir. Ayrıca 1649 EST-SSR potansiyel marker olarak tanımlanmıştır. Rastgele 100 primer çifti markerlerin doğrulaması için seçilmiştir. 82 primer ile amplifikasyon gerçekleştirilmiş ve 27'si 10 yonca genotipi arasında polimorfizm göstermiştir. Bu çalışma ile autotetraploid yonca bitkisi için önemli bir sekans verisi oluşturulmuş ayrıca Illumina platformunun kullanılmış olması EST-SSR markerleri geliştirmek için hızlı ve etkili bir yaklaşım oluşturmuştur. Yine transkriptom verilerinin kullanılmasıyla yonca bitkisinin genom çalışmalarına önemli bir bilgi platformu sunulmuştur.

Sudupak (2013) yaptığı çalışmada 21 kabuli ve 1 desi tip tescilli nohut çeşitleri arasındaki genetik varyasyonu değerlendirmek için lokus spesifik 9 primer kullanmıştır. Her bir primer çifti spesifik bir mikrosatellit lokusunu çoğaltmaktadır. Her lokustaki allel ortalaması 10.7 olmak üzere toplamda 97 allel meydana gelmiştir. Lokuslardaki allel sayısı 2 ve 18 arasında dağılım göstermektedir. Nei's genetik uzaklık değerlendirmesine göre genotiplerin ikili eşleşmeleriyle hesaplanan genetik uzaklık 0.156 ve 2.981 arasındadır. Oluşturulan UPGMA dendrogramına göre Kusmenoglu99 ve Isik05 genotipleri bir arada ayrı bir grupta gözlenirken desi tipteki nohut çeşiti diğer genotiplerle bir arada grup meydana getirmiştir.

Suresh vd. (2013) bakla bitkisinde yaptıkları çalışmada transkript sekanslarından polimorfik SSR markerleri geliştirmişlerdir. Çalışmada 81 333 tekli sekans okumalarından 1729 SSR lokusu belirlenmiş ve 240 primer çifti dizayn edilmiştir. 32 genotipte primer testlemesinden sonra 55 primer çifti polimorfik bulunmuştur. Allel sayısı 2 ile 15 arasında, lokustaki major allellerin sıklığı 0.17 ile 0.91 arasında ve

ortalama PIC değeri 0.16 ile 0.88 arasında dağılım göstermiştir. Gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleri sırasıyla 0.00 ile 0.44 ve 0.17 ile 0.89 arasında değişmektedir.

Zhuang vd. (2013) çalışmalarında EST-SSR markeri geliştirmiş ve bezelye linkaj haritasını geliştirmek için 23 bezelye genotipindeki polimorfizmi değerlendirmiştir. 454 Pyrosequencing platformu ile sekanslaması yapılmış ‘Lifter’ kültür tipinin transkriptom sekanslarının EST bölgelerinden 46 SSR belirlenmiş ve primer dizayn edilmiştir. 37 marker ile başarılı amplifikasyon sağlanmış ve bunların 11’i (%30’u) 23 genotip içinde ve aynı zamanda mevcut RIL populasyonunun ebeveynleri arasında da polimorfizm meydana getirmiştir. Allel sayısı 2 ile 4 arasındadır. Gözlenen ve beklenen heterozigotluk sırasıyla 0 ile 0.43 ve 0.31 ile 0.83 arasında değişmektedir.

El-Rodeny vd. (2014) bakla bitkisinde yüksek çözünürlükte linkaj haritası geliştirmek için 5090 EST’lerden SSR markeri geliştirmiştir. Haritalama çalışmalarında ‘Nubaria 2’ × ‘Misr 3’ melezlerinden elde edilmiş F₂ populasyonundaki 109 bitki kullanılmıştır. Haritalanan markerler ile toplam uzunluğu 684.7 cM ve 552 lokustan oluşan 6 linkaj grubu oluşturulmuştur. Markerlerin %47’si çoklu lokus belirleyici markerlerden (MLD) meydana gelmiştir. Polimorfizm analizleri 10 bakla varyetesi arasında yapılmış ve %78.9 (384/487) polimorfizm elde edilmiştir.

Agarwal vd. (2015) transkript sekanslarından elde edilen SSR motiflerinin yetersizliğinin bitki genom analizlerinde aynı zamanda ıslah uygulamaları için sınırlayıcı bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Bu amaçla kabulü tipte nohutun (CDC Frontier) draft genom sekansından ve varolan transkript sekanslarından in siliko SSR motifleri geliştirilmiştir. Nohutun referans genomu üzerinde ICCV2 nohut genotipinde 566 SSR’ın incelenmesi sonucunda 300 bp uzunluğunda komşu SSR motifleri tanımlanmıştır. Dizayn edilen 507 primer çiftinden mevcut SSR markerleri ile benzerlik bulundurmayan 202 genik SSR geliştirilmiştir. Daha sonra nohutun genomunda eşit şekilde dağılım gösteren 40 SSR, 41 *C. arietinum* ve 3 *C. reticulatum*’dan oluşan 44 nohut genotipinde taranmıştır. Yine aynı çalışmada genik SSR markerlerin 16 farklı haritalama populasyonunun ebeveyn hatlarında test edilmesiyle markerların haritalama ve ıslah uygulamalarındaki etkinliği vurgulanmıştır.

Chen vd. (2015a) adzuki fasülyesinin [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi] transkriptom sekansını elde etmişler ve 65950 gen belirlemişlerdir. Çalışmada 53 SSR marker seti geliştirilmiş, ayrıca 57 mevcut SSR’da dahil edilerek toplam 110 SSR marker 261 genotipte kullanılmıştır. Oluşturulan dendrogram genotipleri coğrafik bölgelerine göre anlamlı olacak şekilde kümelenmiştir. Genomik SSR’ların ortalama PIC değeri 0.51, EST-SSR’ların ise 0.24 olarak hesaplanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre genomik SSR’ların EST-SSR’larına göre daha polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Chen vd. (2015b) maş fasülyesinde [*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek] yaptıkları çalışmada transkriptom ve genom sekanslarından 500 EST-SSR ve genomik SSR geliştirmişlerdir. Farklı lokasyonlardan toplanan kültür ve yabani 157 genotipte denenilen markerlerden sadece 58’i polimorfizm meydana getiren amplifikasyona neden olmuştur. Her lokusta ortalama 2.66 allel gözlenmiş ve polimorfizmin düşük olduğu belirtilmiştir. Ortalama PIC değeri genomik SSR’larda EST-SSR’lara göre daha yüksek bulunmuştur. Polimorfik olan genomik SSR’ların çoğu di- ve tri- nükleotid tekrarlarından oluşmuş

olup bu da tüm lokusların sırasıyla %52.4 ve %38.1'ini kapsamaktadır. Oluşturulan dendogramda yabancılarla kültür genotiplerinin anlamlı bir şekilde ayrıldığı gözlenmiştir.

Yang vd. (2015) bezelye bitkisinde güvenilir ve kullanılabılır SSR markeri geliştirmenin bu bitkide marker yardımcı seleksiyon çalışmalarına katkı sağlayacağını ifade etmişlerdir. Bu amaçla Illumina HiSeq 2500 sistemleri ile 8899 SSR belirlenmiş ve bunlardan 3.275 primer dizayn edilmiştir. Primer doğrulaması için 1644 SSR rastgele seçilmiş ve 841 primer kültür ve yabancı bezelye türlerinden oluşan 24 genotip arasında güvenilir amplifikasyon sağlamıştır. Her lokustaki allel sayısı 2 ile 10 arasında değişmiş, PIC değeri 0.08 ile 0.82 arasında (ortalama: 0.38) dağılım göstermiştir. Belirlenen 1644 SSR markeri ayrıca G0003973 × G0005527 haritalama popülasyonunun ebeveynleri arasında da test edilmiş ve bu haritalama popülasyonunun genetik linkaj haritasında 33 polimorfik SSR tanımlanmıştır.

Verma vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum* L.) türünde SSR primerleri geliştirmek için GA/CT motiflerince zengin genomik bir kütüphane oluşturmuşlardır. Bu amaçla 667 SSR primer çifti geliştirilmiş ve 111'i *T. alexandrinum* cv. Warden s-99-1 türünde doğrulanmıştır. Bunların arasından 45 primer çifti 86 *Trifolium* genotipinde analiz edilmiştir. Her lokustaki ortalaması 4.88 olacak şekilde toplam 220 allel elde edilmiştir. PIC değeri 0.040 ile 0.819 arasında değişmiş olup gözlenen ve beklenen heterozigotluk değeri sırasıyla 0.39 ile 0.89 ve 0.368 ile 0.80 arasında dağılım göstermiştir. Bu markerler %93.33 oranında *T. resupinatum* türüne ve %40.0 oranında ise *T. balansae* türüne transfer edilebilme özelliği taşımaktadır. Filogenetik analizler *Trifolium* türleri arasında anlamlı kümeler oluşturmuştur, dolayısıyla bu markerlerin yakın akraba türleri ayırmada başarılı bir şekilde kullanılabirliği ifade edimiştir.

Ashwani vd. (2016) kültürü yapılan nohut ve yabancı akrabaları arasındaki genetik çeşitlilik ve akrabalık ilişkileri bilgisinin nohut ıslah programlarında oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Bu amaçla SSR'ların tanımlanması için EST bölgelerinin önemini vurgulamışlardır. Bu amaçla 20 nohut genotipindeki genetik çeşitliliği araştırmak için 20 EST-SSR primerinin etkinliğini çalışmışlardır. Bu primerlerin 17'si çalışılan materyalde amplifikasyon göstermiş, 13'ü polimorfik (%76.5) ve 4'ü monomorfik (%23.5) bantlar meydana getirmiştir. PIC değeri ortalaması 0.47 olup, 0.05 (lokus ICCeV0006) ile 0.99 (lokus ICCeV0008) değerleri arasındadır. UPGMA filogenetik ilişki analizine göre oluşturulan ağaçta genotipler tahmini köken merkezlerine ve bulunduğu bölgelere göre farklılık gösteren 3 ana gruba ayrılmıştır.

Liu vd. (2016) çalışmasında Illumina paired-end sequencing ile 3 farklı maş fasüyesinin transkriptom analizini yapmışlardır. Toplamda 73 bp'lik uzunlukta 38,3-39,8 milyon paired-end okuma oluşturulmuştur. 3 kütüphanenin okumalarından 56 471 transkript elde edilmiştir. Bu analizi takiben 739 bp'lik ortalama uzunluk ve 1176 bp'lik N50 uzunluğu ile 43 293 gen belirlenmiştir. Bu genlerin 34.903'ü (%80.6) NCBI'nin protein veritabanındaki (Nr) bilinen proteinlerle önemli benzerlik göstermiştir. 21 450'i (%58.4) ise Swiss-Prot veritabanında (E-value < 10(-5)) BLAST hitlerine sahiptir. Yine aynı çalışmada 3 maş fasüyesi genotipinde farklılaşmış 1245 gen ve potansiyel moleküler marker olarak kullanılacak 3788 EST-SSR motifi belirlenmiştir. Çalışılan

320 lokus arasında, 310'u (%96.5) ile başarılı amplifikasyon gerçekleştirilmiş, 151'i ise (%47.0) 6 maş fasülyesi genotipi arasında polimorfizm meydana getirmiştir.

Zhou vd. (2016) yaptıkları araştırmada yerfıstığında DNA sekans okumaları ile tek lokuslu SSR markerleri geliştirmişlerdir. Bu amaçla 150 bp'lik paired-end okumalı sekanslama için 4 farklı insert uzunluğunda DNA kütüphaneleri hazırlamışlardır. Filtrelemeden sonra 1.675.631,984 okuma içeren yaklaşık 237 Gbp'lik temiz data elde etmişlerdir. Bu okumalar 1782 bp'lik N50 uzunluğunda 2102,446 contig içinde, daha sonra bu contigler ise 3920 bp'lik N50 uzunluğunda 1176,527 scaffold sekanslarında bir araya getirilmiştir. Biraya getirilmiş scaffold sekanslarının toplam uzunluğu 2.0 Gbp'dir. Toplam 2375,180 SSR içinden 134 652 tek lokuslu SSR tanımlamışlardır. Bu SSR'larda trinükleotid motiflerin en yaygın olarak gözlemlendiğini ve bunu tetra-, di-, mono-, penta- ve hexanükleotid motiflerin izlediğini bildirmişlerdir. Tek lokuslu SSR'ların farklı tiplerinde en yaygın olan motiflerin A/T bakımında zenginliği gözlenmiştir. 1790 in-silico marker seçilmiş ve PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışılan 12 kendine döllenmiş hatta 1637 marker tek bant meydana getirdiğinden dolayı tek lokuslu marker olarak düşünülmüş, diğer 290 marker (%17.7) ise polimorfizm meydana getirmiştir. Geliştirilen 97 markerle yapılan testlemede F₂ popülasyonunda tek lokus için Mendel kalıtımıyla örtüşen 1:2:1 oranı gözlenmiştir. Yerfıstığı (*A. hypogaea* L.) linkaj haritası için 89 marker kullanılmıştır.

Borse vd. (2017) 14 desi ve 13 kabuli tip olmak üzere toplam 27 nohut genotipinde çalışmışlardır. Daha önceki çalışmalarda 100-dane ağırlığı ve verim komponentini oluşturan karakterlerle ilişkilendirilmiş 43 SSR markeri kullanılmıştır. Bu primerlerin içinden 33 SSR 135 allel meydana getirerek polimorfizm meydana getirmiştir. Bu markerlerle yapılan filogenetik analizler desi ve kabuli tiplerin ayrıştığı iki büyük grup meydana getirmiştir. 15 marker 13 genotipte 20 farklı allel üretmiştir. Çalışma sonucunda bu markerlerin tür tanımlaması ve moleküler karakterizasyonda etkin kullanılabilirliğini ifade etmişlerdir.

Chen vd. (2017) börülce [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] bitkisinin transkriptom analizini yaptıkları çalışmalarında bu cinsten daha sonraki yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere genik moleküler marker geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada Illumina paired-end sekanslama teknolojisini kullanarak yaklaşık 54 milyon yüksek kalitede cDNA sekans okumaları elde etmişlerdir. Bu okumalardan 1534 bp'lik N50 uzunluğunda 47 899 gen belirlenmiştir. Sekans benzerlik analizleri 36 289 genin (%75.8) Nr protein veritabanında bilinen proteinlerle önemli bir benzerlik taşıdığını, 23 471 genin (%49.0) Swiss-Prot veritabanında BLAST hitlerine sahip olduğunu ve 20 654 genin (%43.1) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veritabanında yüksek oranda benzerlik bulundurduğunu ortaya çıkarmıştır. Sonraki analizlerde 5560 SSR potansiyel marker olarak belirlenmiştir. Bunlardan 500'ü 32 börülce genotipinde testlenmiş ve bunlardan 54'ünün polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Purwoko vd. (2019) yaptıkları çalışmalarında *Metroxylon sagu* Rottb. türüne ait elde ettikleri NGS genomik verisiyle SSR marker geliştirmişlerdir. Bu çalışmada de 31 659 mükemmel SSR lokusu içeren 29 953 contig ve 33 576 mükemmel olmayan SSR lokusu içeren 31 578 contig belirlenmiştir. Mükemmel SSR lokuslarının yoğunluğu 132.57/Mb olup, AG, AAG ve AAAT motifleri en sık bulunan motiflerdendir. Primer dizaynı için rastgele 500 SSR lokusu seçilmiştir ve 93 SSR primer çifti tanımlanmıştır.

Çeltiğin genom sekansını kullanarak yapılan sinteni analizlerinden sonra 20 primer 11 genotipte doğrulanmış ve içlerinden 7 primer polimorfik alleller meydana getirmiştir. 41 genotiple yapılan genetik çeşitlilik analizleri ile bu popülasyonda 3 küme oluşturulmuştur. Sonuçlar elde edilen NGS verisinin bu türde SSR bölgelerinin belirlenmesi ve marker geliştirme için kullanılabilirliğini göstermiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bitki Materyali

Çalışma kapsamında *C. arietinum* (CA 2969, ♀) ve *C. reticulatum* türleri (AWC 602, ♂) tüm genom okuma verilerini elde etmek için kullanılan ebeveynlerdir. Genotiplere ait özellikler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Genetik çeşitlilik çalışmaları için 4’ü kabuli ve 4’ü desi tipte olmak üzere 8 adet *C. arietinum*, 8 adet *C. reticulatum*, 8 adet *C. echinospermum* ve *C. anatolicum*, *C. canariense*, *C. microphyllum*, *C. multijugum*, *C. oxyodon* ve *C. songaricum*’a ait 6 adet uzak akraba yabani türlerden oluşan toplam 30 genotip kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Bu 30 genotipten oluşturulan populasyon Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Seralarında yaprak örneklerinin alınması amacıyla viyollerde yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Genom analizinde anaçlar ve temel özellikleri

Özellik	Ebeveynler	
	<i>C. arietinum</i> (CA 2969)	<i>C. reticulatum</i> (AWC 602)
Kabuli/Desi/ Yabani	K	Y
Soğuğa reaksiyonu*	Hassas	Toleranslı
Yanıklık hastalığına reaksiyon	Dayanıklı	Hassas
Tohum böceğine reaksiyon**	Hassas	Dayanıklı
Salkımdaki çiçek sayısı	2	1
100-dane ağırlığı	30	10

* Toker (2005) ve ** Erler vd. (2009)’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kültür ve yabani nohut genotipleri

No	PI Numarası	Tür adı	Orijin
1	ICC 4969	<i>C. arietinum</i> /desi tip	Türkiye
2	ICC 552	<i>C. arietinum</i> /desi tip	Türkiye
3	ICC 988	<i>C. arietinum</i> /desi tip	Türkiye
4	ICC 1069	<i>C. arietinum</i> /desi tip	Türkiye
5	Hasanbey	<i>C. arietinum</i> /kabuli tip	Türkiye
6	YAR	<i>C. arietinum</i> /kabuli tip	Türkiye
7	ILC 200	<i>C. arietinum</i> /kabuli tip	Türkiye
8	ILC 263	<i>C. arietinum</i> /kabuli tip	Türkiye
9	593709	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
10	510656	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
11	599092	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
12	599050	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
13	599044	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
14	510655	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
15	572537	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye
16	489778	<i>C. reticulatum</i>	Türkiye

Çizelge 3.2'nin devamı

No	PI Numarası	Tür adı	Orijin
17	599040	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
18	599041	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
19	599068	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
20	527932	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
21	489776	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
22	599067	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
23	527931	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
24	IG 73010/ILWC 181	<i>C. echinospermum</i>	Türkiye
25	557453	<i>C. canariense</i>	İspanya
26	383626	<i>C. anatolicum</i>	Türkiye
27	599085	<i>C. multijugum</i>	Özbekistan
28	593718	<i>C. microphyllum</i>	Hindistan
29	561084	<i>C. oxyodon</i>	Türkiye
30	599053	<i>C. songaricum</i>	Özbekistan



Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında viyollerde yetiştirilen nohut bitkisi resimleri

Yine, çalışma kapsamında *C. arietinum* (CA 2969, ♀) ve *C. reticulatum* (AWC 602, ♂) türlerarası F₆ populasyonu geliştirilen markerlerin testlenmesinde kullanılmıştır. Her bir RIL hattına ait olan yaprak örnekleri viyolde ilk çıkışlarıyla birlikte alınmış ve DNA izolasyonu için -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Genotipleme için F₆ populasyonundan 30 genotip rastgele seçilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan genotiplere ait genç yaprak örnekleri alınmış, DNA izolasyonu Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Bitki Islahı Laboratuvarında Doyle ve Doyle (1990) tarafından geliştirilen CTAB yöntemi aşağıdaki gibi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3.).

DNA izolasyon protokolü:

1. Bulk olarak toplanan bitkinin genç yaprakları (Bir bitki için yaprağın ortalama ağırlığı 0.1 gr) 1.5 ml'lik ependorf tüplere konulup üzerine %0.5 merkaptotanol içeren CTAB çözeltisinden (Çizelge 3.3) 500 µl eklenmiştir.
2. Ependorf tüp içerisindeki yaprakları rahatça hareket ettirebilen plastik ezme çubukları (pestil) yardımıyla her bir ependorf için başka bir çubuk kullanarak yapraklar tamamen ezilmiştir.
3. Ezme işlemi tamamlandıktan sonra bitki DNA'sının tüp içindeki sıvıya geçmesi için sıcaklığı 65°C'ye önceden ayarlanmış olan su banyosu içerisine örnekler 15 dakika aralıklarla hafif hafif çalkalanmak üzere 3 saat boyunca inkübasyona konulmuştur.
4. Inkübasyon aşamasından sonra örneklerden protein uzaklaştırılabilmek için tüp başına 600 µl kloroform izoamil alkol (24:1) çözeltisi eklenerek tüp içerisindeki sıvı ile tamamen karışana kadar çalkalanmıştır.
5. Çalkalanma işleminin ardından tüpler 20 dakika 14000 rpm hızında santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası ependorf tüplerde alt kısımda kloroform, orta kısımda protein, üst kısımda DNA'nın bulunduğu sıvı olarak üç ayrı faz görülmüştür. Ependorf tüpünün süpernatant (üst faz) adı verilen DNA'nın bulunduğu sıvı kısım 1.5 ml'lik yeni ependorf tüpe aktarılmıştır (ortalama 300 µl). Bu aşama daha temiz DNA izolasyonu için tekrar edilmiş ve ikinci tekrar sonrası yeni ependorflara ortalama 150 µl süpernatant kısım (üst faz) aktarılmıştır.
7. Aktarılan sıvı içerisindeki DNA'nın tüpün dibine çökmesi için tüpün içerisine 500 µl -20 °C muhafaza edilen soğuk izopropanol eklenir; ekleme sonrası tüp ters düz edilerek 10 saniye boyunca hafif hafif karıştırılır. DNA tamamen dibe çökmesi için bir gece -20 °C'de bekletilmiştir.
8. 1 gece -20 °C'de bekletilen örnekler alınıp 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. Santrifüj işlemi sonrası ependorf tüplerinin dibinde pelet oluşumu gözlenmiştir. Tüpün içerisindeki peletler hareket ettirilmeden tüp içindeki sıvı dökülmüştür. Bu aşamadan sonra -20 °C'de muhafaza edilen %70'lik etil alkol (etanol) tüp başına 300 µl konulup 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Aynı işlem bir defa daha tekrar edilmiştir. Bu aşamadan sonra dipteki pelete zarar vermeden içindeki etanol dikkatli şekilde boşaltılmış ve tüpler ters şekilde ağzı açık olarak kurutulmaya bırakılmıştır (yaklaşık 30-40 dakika).
10. Tüpler tamamen kuruduktan sonra içerisine 150 µl otoklavlı saf su eklenmiştir. Ekleme sonrası tüp içerisindeki DNA'nın sıvıya geçebilmesi için örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Bir gece +4 °C bekletilen örnekler bozulmaması için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3. CTAB solüsyonu bileşenleri

Bileşenler	Buffer Son Konsantrasyonları	Hacim
NaCl	1.4 M	280 ml
Tris-HCL PH:8	1000 mM	100 ml
EDTA PH:8	20 mM	40 ml
CTAB	% 2	20 g
Beta-merkaptotanol	% 0.2	2 ml
Toplam		1000 ml

3.2.2. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA konsantrasyonu %1'lik jele yüklenen standart DNA (100 ng/μl) ile yüklediğimiz örneklerdeki DNA bantlarının karşılaştırılmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır.

Her bir bitkiden elde edilen 3 μl hacmindeki DNA 1 μl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Örneklerin yanına yine aynı miktarda lambda DNA standardı (100 ng/μL) yüklenerek elektroforezde 50 voltta 30 dakika koşturma işlemi yapılmıştır ve daha sonrasında UV transilluminatör ile jel görüntüsü alınmıştır.

3.2.3. Kütüphane hazırlanması, genom sekanslama

Her bir genotipe ait kütüphane hazırlığı için Illumina tarafından hazırlanan protokol dikkate alınmış ve TruSeq library kit kullanılarak (yaklaşık) 350 bp uzunluğunda insertler oluşturulmuştur (Illumina Inc., San Diego, CA).

Dizileme işlemi ise Illumina HiSeq platformunda yapılmış 150 bp büyüklüğünde iki yönlü okumalar elde edilmiştir. Tüm bu işlemler Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) aracılığıyla yaptırılmıştır.

3.2.4. SSR lokuslarının belirlenmesi ve primer dizaynı

Dizilemeden elde edilen sıkıştırılmış formdaki ham okumalar Je (v1.2) (Girardot vd. 2016) programı kullanılarak dışarı çıkarılmış ve barkod sekanslardan temizlenmiştir. Ortaya çıkarılan fastq dosyaları fastp programı (Chen vd. 2018) ile Illumina adaptorlerinden temizlenmiştir. Aynı zamanda düşük kalitedeki okumalar elemine edilmiştir. İşlenmiş sekanslar Bowtie2 programı (Langmead ve Salzberg 2012) ile nohut referans genomuna (kabuli referans genom 2.6.2) eşlenmiştir. Mapping sonucu elde edilen BAM (binary sequence alignment file format) dosyaları referans genomla farklılık gösteren varyantların (SNP, In/Del) belirlenmesi amacıyla freebayes (Galaxy Version 1.1.0.46-0) (Garrison ve Marth 2012) programı ile analiz edilmiştir. Bu işlem hem *C. arietinum*, CA 2969 hem de *C. reticulatum*, AWC 602 genomu için yapılmıştır.

VCFfilter (Galaxy Version 1.0.0) programı kullanılarak SNP'ler mevcut dosyadan arındırılmış ve geriye yalnızca In/Del varyantları bırakılmıştır. VCFcombine (Galaxy Version 1.0.0) programı ile her iki genomu ait olan vcf dosyaları birleştirilmiştir.

Referans genom üzerindeki tekrarlı bölgeleri ayrıca belirlemek amacıyla MicroSATellite (MISA) programı kullanılmıştır (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>). Referans genom üzerinde belirlenen SSR bölgelerinin koordinat bilgileri ile VCFcombine sonrası ortaya konan varyant dosyasındaki koordinatlar ile ortak olanlar filtrelenmiş ve polimorfik SSR lokuslarının koordinatları ortaya konulmuştur. Elde edilen bu son koordinat bilgilerinin yardımıyla her iki ebeveyn için oluşturulan BAM dosyalarının bu koordinatlardaki okuma bilgileri Integrated Genome Browser 9.0.2 programında detaylı bir şekilde görüntülenmiş ve polimorfik SSR bölgelerinin manuel bir değerlendirilme imkanı doğmuştur. Bu değerlendirmede; koordinattaki okuma sayıları, her iki ebeveynin farklı büyüklükte allel barındırdığının okumaların en az %90'ı tarafından desteklenmesi parametreleri kullanılmıştır. Bu şekilde filtrelenen SSR lokuslarındaki primer dizaynı Primer3 versiyon 2.2.3 (Rozen ve Skaletsky, 2000) programında, SSR lokuslarına komşu olan sekanslardan şu parametreler kullanılarak dizayn edilmiştir: primer uzunluğu =18–26 bp (Opt. 23 bp); GC % =50–70% (Opt. 60%); sıcaklık =55–62 0C (Opt. 58 0C); ve ürün büyüklüğü = 150–200 bp. Tekrarlı DNA ve aynı zamanda duplike sekanslar dahil edilmeyip, primerler iki tür arasında polimorfik olan bölgelerden seçilmiştir.

3.2.5. PCR amplifikasyonu

PCR reaksiyonu 15 µl hacimde hazırlanmıştır. SSR-1 PCR reaksiyonu; 10X PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 10 µM F-primer (5' ucunda M13 üniversal primer baz dizisi eklenmiş primer), 10 µM R-primer, 0.5 ünite Taq DNA polimeraz, ultra saf su ve DNA içermektedir (Çizelge 3.4). Primerlerin bağlanma sıcaklığı sırasında PCR cihazı durdurularak reaksiyon içerisinde 4'er µl Çizelge 3.5'de verilen SSR-2 PCR bileşenlerinden oluşan karışım ilave edilerek döngü devam ettirilmiştir.

PCR, Çizelge 3.6'da verilen protokolü kullanılarak Peqlab Thermocycler Primus 96 marka cihazda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada dizayn edilen primer çiftlerinin forward primerlerinin 5' uçlarına, 18 bazdan oluşan M13 üniversal (5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3') baz dizisi eklenerek sentez ettirilmiştir (Schulke 2000). Li-cor 4200 cihazında elektroforez edilecek örneklerin PCR reaksiyonlarında M13 üniversal baz dizisine özgü floresan boyalı (IRD700 ve IRD800) primerler kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında 2 farklı boyanın kullanılması, 2 farklı primerin PCR ürününün de aynı kuyucukta analiz edilmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca geliştirilen primerlerin hepsinin tek tek işaretli olması yerine, önceden M13 üniversal baz dizisi eklenerek sentezlenmesi ve PCR reaksiyonu sırasında floresan boyalı primerlerle işaretlenmesi maliyeti düşürmüştür. Ancak, maliyeti düşürmesinin yanında bu yöntemin en büyük dezavantajı iki aşamalı PCR kurulmasını gerektirmektedir. Bu yüzden floresan boyalı primerin yer aldığı karışım (Çizelge 3.5), PCR reaksiyonunun başlamasını takiben Çizelge 3.6'da verilen program ile 6-8 döngüler arasında 50-60 °C sıcaklığında iken, tüpler açılarak reaksiyona dahil edilmiştir.

Çizelge 3.4. SSR-1 PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Dna (20 ng/μl)	1 μl
PCR buffer (10X)	1.5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.25 μl
dNTP (10 mM)	1.5 μl
F-Primer (10 μM)	1 μl
R-Primer (10 μM)	1 μl
Taq polimeraz (5 u/μl)	0.08 μl
ddH ₂ O	7.67 μl

Çizelge 3.5. SSR-2 PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
PCR buffer (10X)	0.5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	0.33 μl
dNTP (10 mM)	0.33 μl
Taq polimeraz (5 u/μl)	0.04 μl
M13 işaretli primer	0.2
ddH ₂ O	3.3 μl

Çizelge 3.6. SSR PCR protokolü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94 °C	5 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1 dk	35
Primerlerin bağlanması	50-60 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	1

3.2.6. Poliakrilamid jel hazırlanması

Polakrilamid jel hazırlamak için 7M üre, 3.5 ml 10X'lik TBE, 11 mM Bis akrilamid, 5.6875 ml %40'lık akrilamid ve saf su kullanılarak toplamda 35 ml %6,5'luk çözelti hazırlanmıştır (Çizelge 3.7). Cam aparatlara döküleceği sırada 25 µl TEMED ve 340 µl (%10) Amonium persülfat çözeltiye ilave edilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.7. Licor jel matriks bileşenleri

Jel Matriks (500 ml)	%5.5	%6.5
% 40 Akrilamid+ Bis (19:1)	68.75 ml	81.25 ml
TBE (10X)	50 ml	50 ml
Üre (7 M)	210 g	210 g

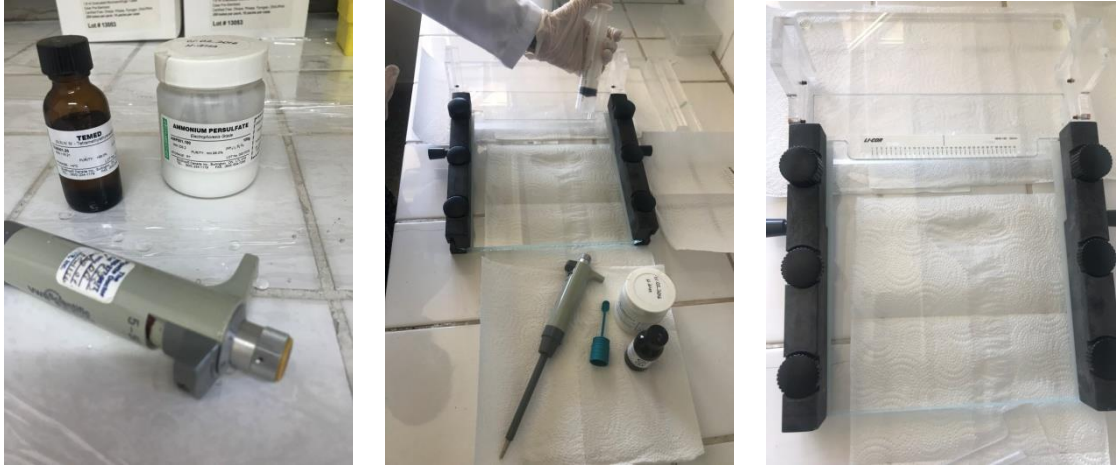
Çizelge 3.8. Poliakrilamid jel bileşenleri

Poliakrilamid jel bileşenleri	41 cm cam için (SSR)
%10 luk APS	340 µl
Temed	25 µl
Akrilamid jel matriks	25 ml

Poliakrilamid jel çözeltisi hazırlandıktan sonra önceden hazırlanmış ve zemine 30-40° kadar eğik bir konumda bulunan 41 cm uzunluğunda ve 0.2 mm kalınlığında boşluk bırakmayı sağlayan bir aralayıcı ile iki cam arasına şırınga yardımı ile dökülmüştür. Çözelti tüm cam yüzeye dağıldıktan sonra hemen cam zemine yatay hale getirilerek (Şekil 3.2) camın üst kısmına 32 adet kuyucuk oluşmasını sağlayan tarak yerleştirilmiştir. Bu arada çözelti dökülürken iki cam arasında bir baloncuk oluşmamasına oldukça dikkat ederek yavaş yavaş dökülmüştür. En son olarak jel 1.5-2 saat polimerize olması için beklemeye bırakılmıştır. Polimerize olduğundan emin olduktan sonra kuyucukları bozmamaya özen göstererek taraklar dikkatlice çekilmiş ve jel Li-Cor 4200 cihazına yerleştirilmiştir.

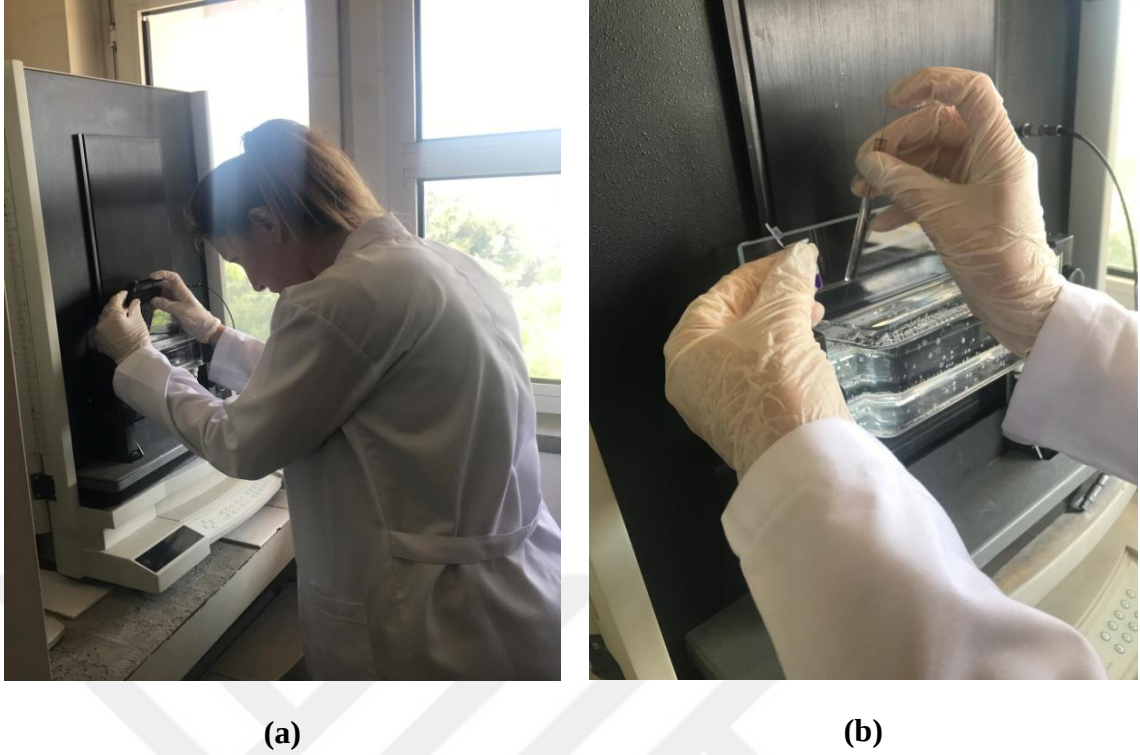
3.2.7. Poliakrilamid jelle örneklerin yüklenmesi ve Li-Cor cihazında koşturulması

PCR ile çoğaltılan DNA parçalarının boyut ayrıştırılmaları Li-Cor 4200 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) genetik analiz cihazında gerçekleştirilmiştir. SSR analizleri sonucu elde edilen bantların büyüklükleri birbirlerine çok yakın olduğu için agaroz jelde ayırmak mümkün olmadığından, elektroforez, bir DNA dizileme cihazı da olan ve örnekleri denature koşturan Li-Cor 4200 cihazı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. a) Poliakrilamid jel bileşenleri; **b)** Poliakrilamid jel bileşenlerinin eklenmesiyle elde edilen karışımın camların arasına enjekte edilmesi; **c)** Tarak yerleştirilmiş şekilde polimerizasyonunun beklenmesi

Poliakrilamid jele yüklenecek olan örnekler 5 katı oranında yükleme boyası (%95 formamide, % 2.5 EDTA ve %2.5 bromofenol blue 50 mg/ml) katılmıştır. 1-2 dk santrifüj yapılan örnekler daha sonrasında 95 °C’de 5 dk inkübasyona tabii tutularak çift sarmallı DNA’nın denatüre olması sağlanmıştır ve hemen ardından DNA nın ayrılan sarmallarının yeniden birleşmemesi için buz üzerine konmuştur. Buz üzerinde bulunan örnekler Hamilton cam mikropipet yardımı ile her bir jel kuyucuğuna 0.5-1 µl yüklenmiştir (Şekil 3.3). Yüklenen örnekler 2000 voltta, 25 mA amperlik akımda, 50 watt gücünde ve sıcaklığın 45 °C olduğu koşullarda 2-3 saat süresince koşturulmuştur.



Şekil 3.3. a) Denatüre edilmiş PCR ürünlerinin poliakrilamid jele yüklenmesi; **b)** Markerin jele yüklenmesi

3.2.8. Filogenetik analizler

Li-cor cihazında analiz edilen SSR primerlerinden elde edilen lokusların her birinde gözlenen allel büyüklükleri manuel olarak ko-dominant şekilde skorlanmıştır. Elde edilen ko-dominant data seti, GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) yazılım programı kullanılarak allel frekansları, her lokustaki allel sayısı, etkili allel sayısı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk oranları ve PIC (Polimorfik İnfomasyon İçeriği) gibi istatistiki değerler hesaplanmıştır.

3.2.8.1. Allel frekansları

Allel frekanslarının hesaplanması genetik varyasyonun ifade edilmesindeki temel basamaktır. Genetik çeşitliliğin göstergesi çalışılan lokuslarda allelik varyasyonun bulunmasıdır. Bu çalışmada her bir lokustaki allel frekansları Nei (1987) tarafından bildirilen gen (allel) sayma (*counting the number of gene*) yöntemi kullanılarak GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) programı ile hesaplanmıştır.

3.2.8.2. Gözlenen allel sayısı (N_a)

Genetik çeşitliliğin bir diğer göstergesi bir gözlenen allel sayısıdır. Gözlenen allel sayısı ne kadar yüksek ise popülasyondaki genetik varyasyon da o kadar yüksektir. Gözlenen allel sayısı GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.8.3. Etkili allel sayısı (Ne)

Etkili allel sayısı, bir lokusta tespit edilen allellerin ne kadarının o lokustaki genetik varyasyona katkı sağladığını gösteren bir parametredir. Kimura ve Crow (1964) tarafından geliştirilen bu istatistik allel frekansları üzerinden tahmin edilmektedir. Bazı çalışmalarda genetik çeşitliliği ve farklılaşmayı ifade etmede etkili allel sayısının daha önemli olduğu ifade edilmektedir (Jost 2007, 2008). Etkili allel sayısı (Ne) GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) programı ile aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$Ne = 1/(\sum p_i^2)$$

Formülde Ne: etkin allel sayısı, p_i allelin frekansdır.

3.2.8.4. Shannon sabiti

Shannon sabiti her bir popülasyondaki genetik çeşitlilik düzeyini ifade etmektedir. Bu çalışmada GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Allel frekansına dayanılarak Lewontin (1972) tarafından geliştirilen aşağıdaki formül kullanılmıştır. Formülde I: Shannon sabiti, p_i : i. allelin frekansdır.

$$I = -1 \times \sum [p_i \times \ln(p_i)]$$

3.2.8.5. Gözlenen heterozigotluk

Popülasyonlarda genetik varyasyonun ölçülmesinde heterozigotluk kullanışlı bir ölçüdür. Gözlenen heterozigotluk; üzerinde durulan lokuslar bakımından heterozigot genotiplerin toplam genotiplere oranı şeklinde hesaplanır. Gözlenen heterozigotluk değerlerinin belirlenmesinde GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) programından yararlanılmıştır.

$$H_o = \text{Heterozigot birey sayısı} / \text{Toplam birey sayısı}$$

3.2.8.5. Beklenen heterozigotluk

Bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin en yaygın kullanılan ölçütlerinden biridir. Çalışmada lokustaki beklenen heterozigotlugun tahmininde SSR analizlerinde GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) paket programı kullanılmıştır. Bu programda beklenen heterozigotluk Nei (1987) tarafından geliştirilen aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Formülde H_e : beklenen heterozigotluk, p_i : i. allelin frekansdır.

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

3.2.8.6. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC)

Polimorfizm bilgi içeriği bir markerin popülasyon içindeki polimorfizm değerini belirlemek için kullanılan bir parametredir. Yani o markerin ne kadar polimorfik olduğu ve çalışılan lokustaki varyasyonun ne ölçüde olduğu hakkında bilgi vermektedir. PIC, bir lokusa ait allel sayısına ve allellerin popülasyon içindeki dağılımına göre değişebilmektedir. PIC değerinin 0.50'nin üzerinde olması markerin yüksek seviyede bilgi sağladığını göstermektedir. PIC değerinin 0.75'den yüksek olması ise lokusun çok

daha yüksek seviyelerde bilgi verici olduğunu, genetik varyasyon ve genetik haritalama çalışmaları için çok kullanışlı olduğunu göstermektedir (Botstein vd 1980). PIC değeri aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır. Çalışılan lokuslar için PIC değerleri POWERMARKER (Liu ve Muse 2005) paket programı kullanılarak tespit edilmiştir.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - 2 \left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n P_i^2 P_j^2 \right]$$

Formülde; n = allel sayısı, P_i = i. allelin frekansı, P_j = j. allelin frekansı

3.2.8.7. Genetik mesafe

İki populasyon ya da tür arasındaki genetik mesafe gen farklılıklarını belirtmekte olup allel frekanslarından yararlanılarak hesaplanmaktadır. Genetik mesafe ölçümünde farklı yöntemler mevcut olmasına rağmen en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi Nei'nin (1972) genetik benzerlik değerinden hesaplanan, standart genetik uzaklık (D) yöntemi ile bundan türetilen tarafsız (unbiased) genetik mesafe (Nei 1978) değeridir. Genetik uzaklık hesaplanırken türler arasındaki genetik benzerlikten yararlanılmaktadır. Genetik benzerlik (I, genetic identity), mesafe (D) değerleri ile gösterilmektedir. Eğer benzerlik değeri 0 ise türlerde çalışılan SSR lokusları bakımından hiçbir ortak allelin olmadığı söylenebilir. Benzerlik 0 ile 1 arasında değer alırken, genetik mesafe 0 ile ∞ arasında değer alabilir.

$$D = -\ln I' \text{ ya da } D = -\log_e I$$

$$I' = \frac{J'_{xy}}{(J'_x J'_y)^{1/2}}$$

$$J'_{xy} = \sum X_i Y_i \quad J'_x = \sum X_i^2 \quad J'_y = \sum Y_i^2$$

Formülde;

D = Genetik mesafe,

I = Genetik benzerlik,

J'_{xy} = X ve Y populasyonlarında i. allelinin frekanslarının toplamı

J'_x = X populasyonunda i. allelin frekansı

J'_y = Y populasyonunda i. allelin frekansı

3.2.8.8. Temel koordinat analizi (PCoA)

Çalışılan populasyonlarda genetik varyasyonu görmek için çok değişkenli istatistik analizlerinden Temel Koordinat Analizi (PCA) allel frekans verileri temel alınarak GenAlEx 6.2 (Peakall ve Smouse 2006) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

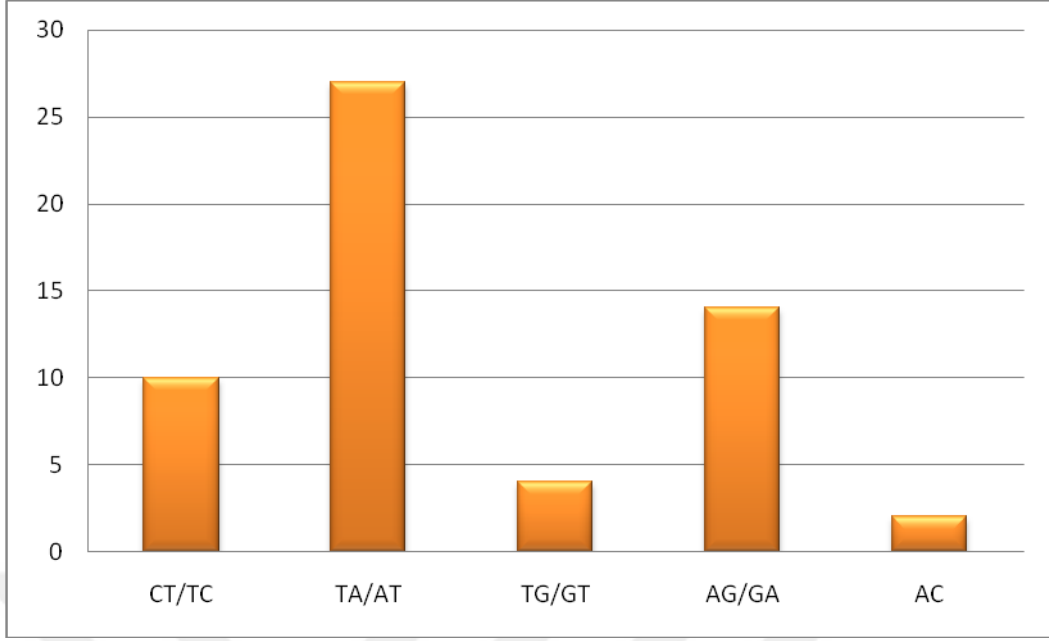


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma kapsamında yeni nesil sekaslama yöntemi ile *Cicer arietinum* ve *Cicer reticulatum* türlerine ait yaklaşık 20X derinliğinde okumalar elde edilmiştir. Yapılan biyoinformatik analizler sonrasında hem *Cicer arietinum* hem de *Cicer reticulatum* genomunda toplam 15380 güvenilir In/Del bölgesi belirlenmiştir. Bunlardan 1650 In/Del bölgesi ise referans genom üzerinde belirlenen tekrarlı bölgeler üzerinde bulunmaktadır. Bu tekrarlı bölgeler üzerinde In/Del'lerden iki genom üzerinde polimorfik olduğu manuel olarak teyid edilen ilk 133 SSR bölgesi belirlenmiş (Ek-1), ve bunların içinden seçilen 58 SSR bölgesi için primer sentezi yaptırılmıştır. Başarılı şekilde amplifiye olan primerler, 4'ü kabulü ve 4'ü desi tipte olmak üzere 8 adet *C. arietinum*, 8 adet *C. reticulatum*, 8 adet *C. echinospermum* ve *C. anatolicum*, *C. canariense*, *C. microphyllum*, *C. multijugum*, *C. oxyodon* ve *C. songaricum*'a ait 6 adet uzak akraba yabancı türlerden oluşan toplam 30 genotipte analiz edilerek genetik çeşitlilik değerleri hesaplanmıştır. Bunların yanında, yeni geliştirilen SSR primerlerinin CA 2969 (ana) ve AWC 602 (baba) türlerarası F₆ populasyonundan seçilen 30 genotipte kullanılabilirliği test edilmiştir.

4.1. SSR Lokusların Belirlenmesi ve Primer Dizaynı

Analize tabii tutulan 58 SSR bölgesinin CA 2969 ve AWC 602 genom okumalarındaki durumu referans genome karşı incelendiğinde 3 farklı yerde CA 2969 türünde delesyon saptanmış olup, bunlar iki ve dört nükleotidlik polimorfizmlerdir (Çizelge 4.1; Şekil 4.6). Diğer belirlenen tüm delesyon bölgeleri AWC 602 türündedir. Bunların içerisinde 2, 4, 6, 8 ve 10 nükleotidlik polimorfizm içeren bölgeler belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de sırasıyla 10 adet (AT), 4 adet (GA) ve 2 adet (TG) nükleotid delesyonu içeren polimorfik kısımlar gösterilmiştir. İncelenen tekrarlı bölgeler içinde Şekil 4.7'de gösterilen AG ve CA insersiyon bölgeleri AWC 602 türünde görülmüştür. Buradan geliştirilen primer iki insersiyonu da içermektedir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Dizayn edilen primerlerinde CA 2969 ve AWC 602 genotipleri arasında polimorfik olan di-nükleotid tekrarların sayısı

CA 2969 ve AWC 602 genotipleri arasında polimorfik olduğu belirlenen ve bu çalışmada kullanılan tekrarlı bölgelerin kromozom lokasyonları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Belirlenen kromozom lokasyonlarına göre markerlerin kromozom dağılımları ise Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu bölgelerin di-nükleotid motifleri değişkenlik göstermektedir. Şekil 4.2’ye göre çalışılan bölgeler içinde en çok TA/AT motifine rastlanmıştır. Bunu sırasıyla AG/GA ve CT/TC motifleri izlemiştir. Thudi vd. (2011) ve Parida vd. (2015) tarafından yapılan araştırmalara göre nohut genomunda en bol bulunan tekrarlı diziler di-nükleotid motiflerdir. Parida vd. (2015) ayrıca AT/TA motiflerin diğerlerine göre daha fazla olduğunu belirtmiştir. Bu da bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir.

Çizelge 4.1. CA 2969 ve AWC 602 genotipleri arasında polimorfik olan SSR bölgeleri, dizayn edilen forward ve reverse primer sekansları, polimorfizm tipi

Marker adı	Kromozom lokasyonu	Forward Primer	Reverse Primer	Motif	Ürün büyüklüğü (bp)		
					CA 2969	AWC 602	Referans Genom (<i>C. arietinum</i>)
SSR1	NC_021165.1:19,011,134-19,011,210	CTTCCACGCGAGAGAAAAAC	TGGCCAATTTGAAAAGAAAA	CT	176	180	182
SSR2	NC_021165.1:55,753,401-55,753,477	TTGCCCTGATTTGAGATGTG	TTGGAAATTCAACCTACACAAAAA	TA	158	160	160
SSR3	NC_021165.1:19,011,133-19,011,211	CTTCCACGCGAGAGAAAAAC	TGGCCAATTTGAAAAGAAAA	CT	176	180	182
SSR4	NC_021163.1:889,577-889,653	TGCCAGTTTTTAACAGCATGA	CAGCATTATCTGCAAAAACAAA	AT	164	154	164
SSR5	NC_021163.1:994,011-994,087	TCCTTGTTTTAATTCCTCCATTG	TGAGACTCGACGCATTTAAGAA	TA	164	162	164
SSR6	NC_021163.1:1,322,967-1,323,044	TTCATGATGAGTGAATGGATGAG	AAATGGTGCACGTGTTTGTT	AT	167	157	167
SSR7	NC_021163.1:7,315,917-7,315,993	TGTTGCTGAGAAATTAAAAGAATGA	GCAACCAGACAAAACACGAG	TG	231	229	231
SSR8	NC_021163.1:13,721,274-13,721,350	CCAAATCCACTCCACCAGAT	ATGGGTGGAACAGGTGAAAC	AT	154	152	154
SSR9	NC_021163.1:21,156,335-21,156,411	CCATTGTTTTGACGGTGTG	ATGGAGGAGTGGGTTTGACA	TA	185	183	185
SSR10	NC_021163.1:25,727,833-25,727,909	CGTTTGTTTGTTCATACACG	CACACAAATCTAGTCCCTTGAGA	AG	154	152	154
SSR11	NC_021163.1:32,040,766-32,040,842	TCTCACAGCAGTGGTCCTCTT	AATGTCAAATTGAAGCCACCT	CT	153	151	153
SSR12	NC_021163.1:47,883,120-47,883,196	CGCAGTGTGCAGAACAGAGA	TGAGAAAAGTGAAAAATGGAAGA	TC	164	162	164
SSR13	NC_021166.1:709,972-710,050	GAAGTTGAACACAGCCTCGTT	CAGAAAGAAGGACCAAAATTGTAA	TA	239	237	239

Çizelge 4.1'in devamı

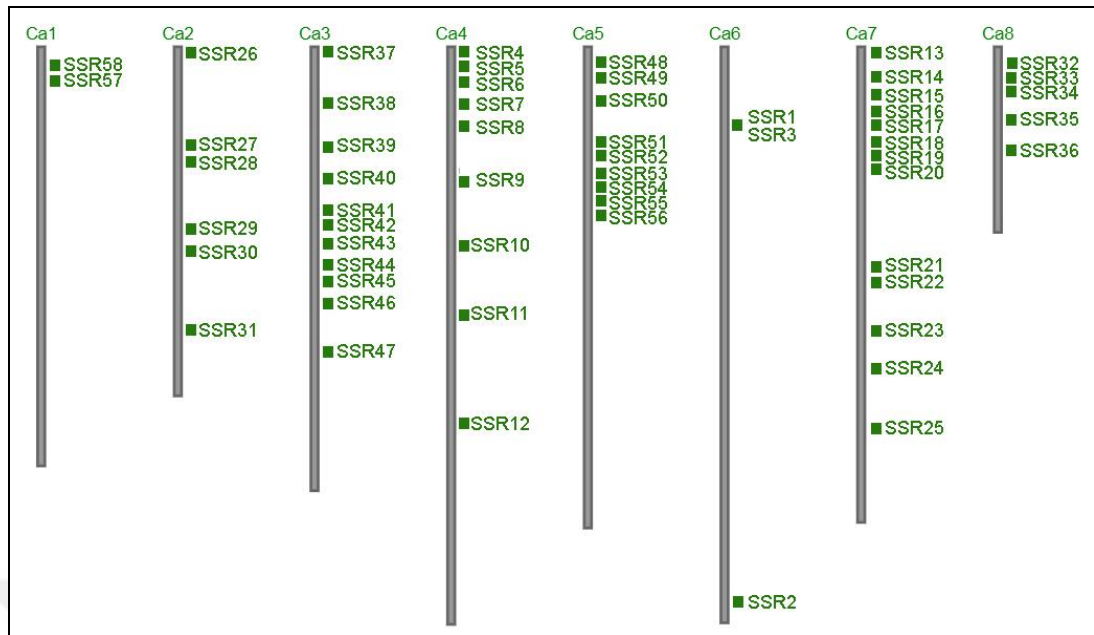
SSR14	NC_021166.1:3,754,394-3,754,472	GATCCTATGACGGCCAAGAT	CAATGTGGCACTAGAATAGCTG	TC	179	171	181
SSR15	NC_021166.1:4,508,947-4,509,025	GATGAATTGCAATGCCCACT	TGAGACCATACTTTTGCATCG	GA	152	148	154
SSR16	NC_021166.1:5,702,105-5,702,183	TTAGGCACACTTCCCATCAA	ACCCCACTTGTGATTTTTGC	AT	150	148	150
SSR17	NC_021166.1:5,706,723-5,706,801	CTCGCAAAAGAATGAATCACA	CACCAAATATATCAGAGTTCTCATGG	AT	150	148	150
SSR18	NC_021166.1:7,220,178-7,220,256	CCTGCATGCATCTCTCAT	TTGAACAGCATTGCCATCAT	AT	205	199	205
SSR19	NC_021166.1:11,523,580-11,523,658	AGCTCCGGACCTTTGAAATA	CCAGAATAGGTGGGGTTTCA	GA	163	161	163
SSR20	NC_021166.1:12,063,993-12,064,071	TCATCCTATTTTTGTGTATAAAATCGT	TGTTATTTTAGGATTTGTCAAGGTT	AG	229	227	229
SSR21	NC_021166.1:25,623,108-25,623,186	TGTTGGTGGCTCAACTATCAT	TGCGTTTTAGTTCAAACAACCTT	AG	184	182	184
SSR22	NC_021166.1:26,072,281-26,072,359	AGTGTGAATCAATCTGCTCTGA	TTAAACAAATCAAAGCATTGAAAA	GT	158	156	160
SSR23	NC_021166.1:30,200,833-30,200,911	TACAATTCAAAGCGGCACAA	CCCTTTGTGATATTTCTCGTGTT	TC	156	154	156
SSR24	NC_021166.1:34,024,156-34,024,235	TGATCACATTGCATCCATCTT	TGGAAATTGTGAGATTAAACATAGAA	AT	179	177	179
SSR25	NC_021166.1:40,487,098-40,487,176	AAGCGAAGCGTACCTTTGAA	TCCTCTCCGCACTCTCTCTC	AG	139	137	139
SSR26	NC_021161.1:514,664-514,710	TTGAATCACCATCTGAAAAATCA	GGGCAAGCTCCAAGTACAGT	GA	311	309	311
SSR27	NC_021161.1:12,151,893-12,151,939	AACCTTTTTGAGATTGATTGAAGG	CCTTCAAATACACCAAAGGACA	TA	187	185	187
SSR28	NC_021161.1:13,690,483-13,690,529	TCCACAATGGAGATAAGAAAGC	TTGACTTGATTGGTTTGAGAGAA	CT	156	154	156
SSR29	NC_021161.1:20,110,687-20,110,733	TTTTGTATTGTCAATTCGCATT	TTTCTCTCCCCGTTACTCA	AG	172	170	172
SSR30	NC_021161.1:22,768,737-22,768,783	AAGTGATGGACACATGCAATCT	GGGATACGGATTTGGAGGGTA	AC	327	325	327

Çizelge 4.1'in devamı

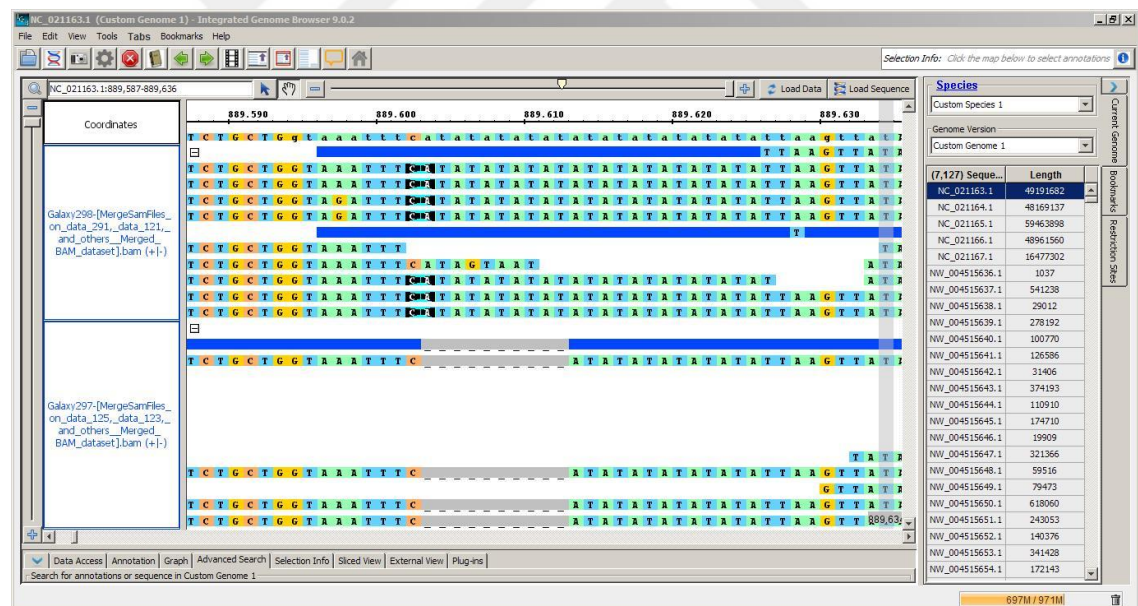
SSR31	NC_021161.1:30,049,660-30,049,706	CCACATGTTTCGTAGTGTTATCTCC	CTTGATTGAATTAAAGTTTGAAAAAG	AT	164	162	164
SSR32	NC_021167.1:3,762,999-3,763,051	AAACACAACAAAAGATCACATGG	TTTCAAAGAACCCCAACAGAA	AT	314	312	314
SSR33	NC_021167.1:4,183,287-4,183,339	TCCTTTTCCAAATTCCAATGA	GGAGCAGAGTGTGTGTGTGG	TC	153	151	153
SSR34	NC_021167.1:5,072,765-5,072,817	CAATTACATGTTAGATGACGTGCT	TGTTGCACACAAAAAGTTAGACG	TA	372	370	372
SSR35	NC_021167.1:7,847,913-7,847,965	TGGCCATTGGATTGGTTTAT	TGAAAACAAAAATGAACATGGAA	TA	130	128	130
SSR36	NC_021167.1:10,455,187-10,455,239	TCTTGTAAGTACGGTGGCAGTG	TATTGTTGCAAGAAATTGTCTCTTT	AC	150	146	150
SSR37	NC_021162.1:822,924-823,003	TGTCCAAGAACGACAATGTG	CGACTTAACATTAGCAATAGTCTTCAA	CA, AG	154	152	154
SSR38	NC_021162.1:7,250,162-7,250,240	AAATAGTCCATAAGCTTCACCATAC	TTGATTAATTACCACAACCTTATATGC	AT	152	150	152
SSR39	NC_021162.1:16,688,457-16,688,535	TGAGTGTTGTTGTTACCTTTTGC	CATCGACACAATTCCAAGGTT	GA	157	155	157
SSR40	NC_021162.1:20,328,085-20,328,163	AAAATTTAGAAAATGGGAGAAAACA	TGTGACATATGCATTTGCTCTTAC	GA	186	184	186
SSR41	NC_021162.1:24,316,422-24,316,500	AAAAACATCGAAACCAGCAAA	ACGTGTTCCCATTTGGTTAGC	AG	341	339	341
SSR42	NC_021162.1:24,874,026-24,874,104	AGAAAAAGAGGACGAACAGAAA	TCTTTTGCTCCGTTGGATTT	AT	153	149	153
SSR43	NC_021162.1:27,746,809-27,746,887	GAATCGGAACTAAAACCGAAA	TCTCTCCCTCCCTCCCTCTA	GA	245	243	245
SSR44	NC_021162.1:29,532,448-29,532,526	TCAGAAATAGGAAAAGCAGTTTCA	CCTGAATGCCAAAATAAGGTTTC	TA	205	203	205
SSR45	NC_021162.1:30,278,651-30,278,729	CCCGGTTTGTCGTGTCTATC	GAAAGGTGTTGGTTGGTGAT	TC	173	171	173
SSR46	NC_021162.1:30,896,220-30,896,298	TGGTTTTGTTACATTGCATCTG	TGCACATCACACACAAGGAA	TG	221	219	221
SSR47	NC_021162.1:36,420,939-36,421,017	TGCCATTGTTGAAAGCACAT	TCAAATGCTTCATTGCCATT	AT	317	313	317

Çizelge 4.1'in devamı

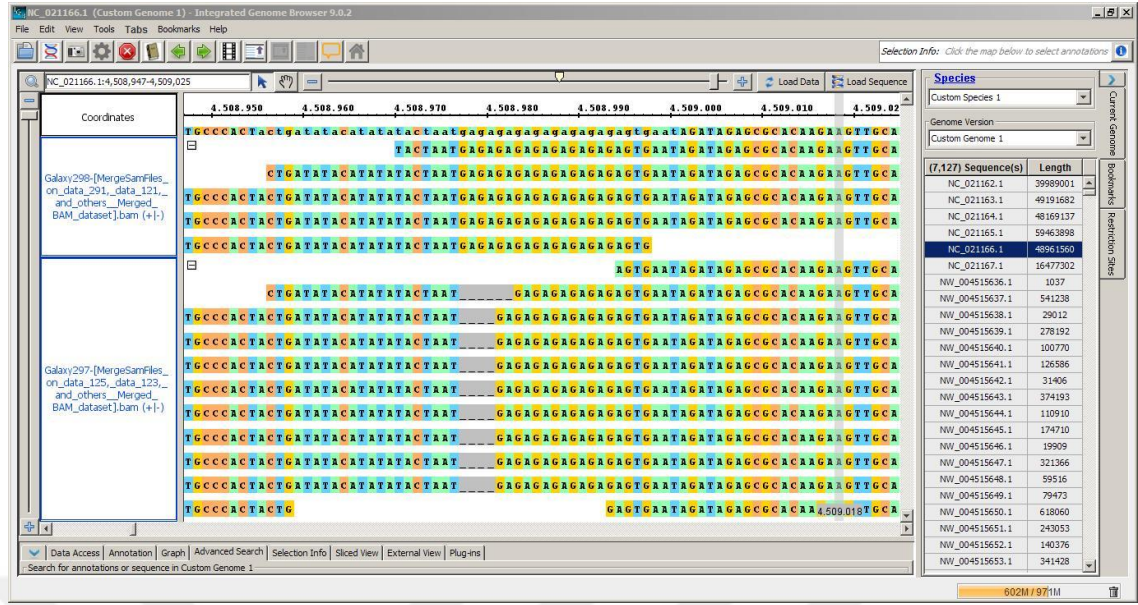
SSR48	NC_021164.1:1,077,194-1,077,272	AACGTCCACAATGAGAAAAGC	GCCATTTCTTGCAAAGTTCA	TG	198	196	198
SSR49	NC_021164.1:207,413-207,491	TAACTTGGGCTTCGAGGAGA	AACTCTGCCGTATGCTTTCC	AG	155	151	155
SSR50	NC_021164.1:5,819,504-5,819,583	TGGTTGTTGCTATTTCAACCT	TGATTTGGGTCTCTTTTGTCTT	AT	200	198	200
SSR51	NC_021164.1:31,121,065-31,121,143	TTGTCTGAAGAATGCCACCTT	TTTGTGAAGCGTCACTCAGG	AT	144	140	144
SSR52	NC_021164.1:31,568,270-31,568,348	TCAACCCACGTGCTTTTGTa	CCGGTCAATATTTTGCGAGT	AT	196	194	196
SSR53	NC_021164.1:33,184,427-33,184,505	AAAACATTCTGCAATTTTGTTTTA	TCTCGTTGTTCAAACCCAAAC	AT	162	158	162
SSR54	NC_021164.1:33,645,811-33,645,889	TGCCTTTGTACTCTTCTATATTTGG	CAAATTGTTTGCCTTTGTGTTG	AT	230	228	230
SSR55	NC_021164.1:36,678,457-36,678,535	GTTCGTCATACGATAAGAAGAGAAA	TATAGCGTCGGTTGTCAATTTTT	AT	150	146	150
SSR56	NC_021164.1:37,082,804-37,082,882	GCACCCACACCTGCTAAGAG	TCCCAAGAACGTCTTTCACC	TC	162	152	162
SSR57	NC_021160.1:4,181,347-4,181,425	AAGTCCTAATATTGGGCTGTTTAGA	TATGCATGCAGAAACACACG	AT	152	150	152
SSR58	NC_021160.1:2,837,886-2,837,964	GGTGTGATGTGTGGCAGAGA	GCCCCGAAATACAGGGATAC	AG	186	182	186



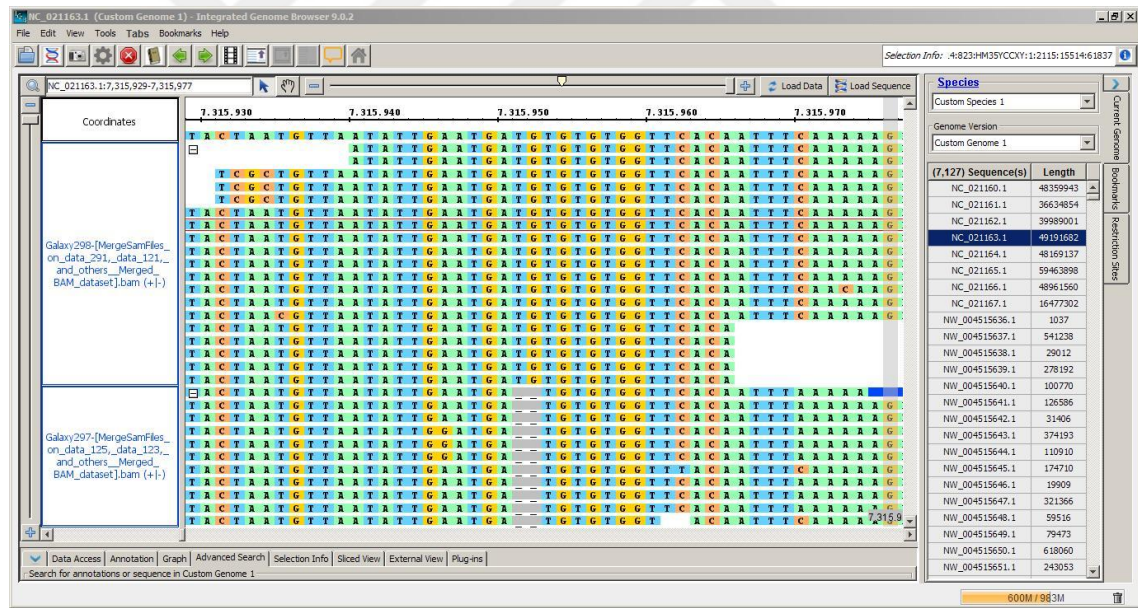
Şekil 4.2. Dizayn edilen SSR bölgelerinin nohut kromozomlarına dağılımı



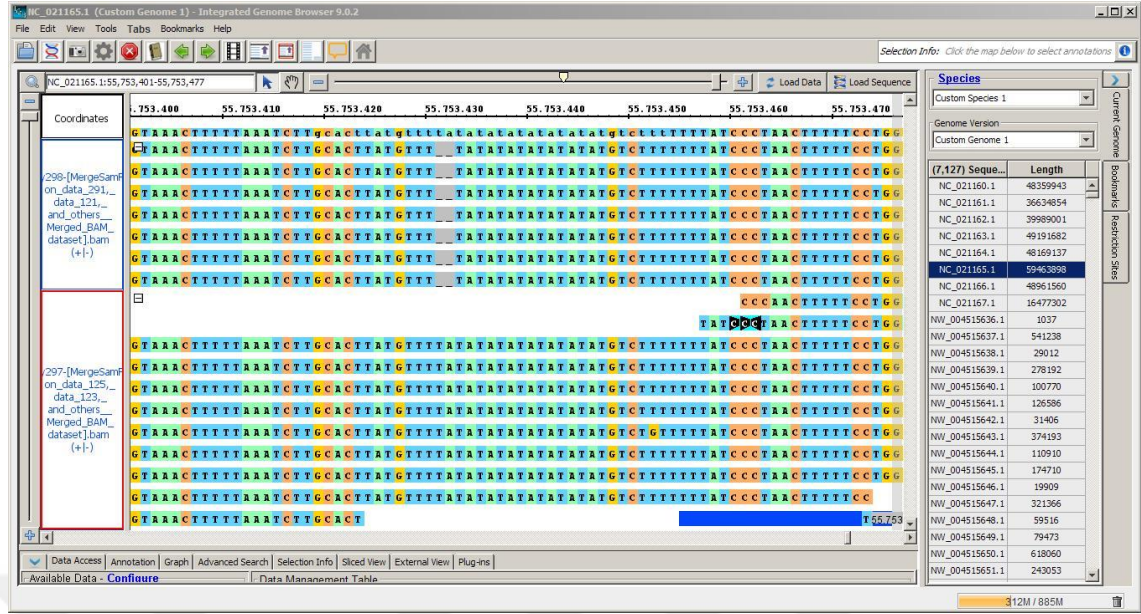
Şekil 4.3. AWC 602’de bulunan 10 nükleotid delesyon bölgesi



Şekil 4.4. AWC 602’de bulunan 4 nükleotid delesyon bölgesi



Şekil 4.5. AWC 602’de bulunan 2 nükleotid delesyon bölgesi



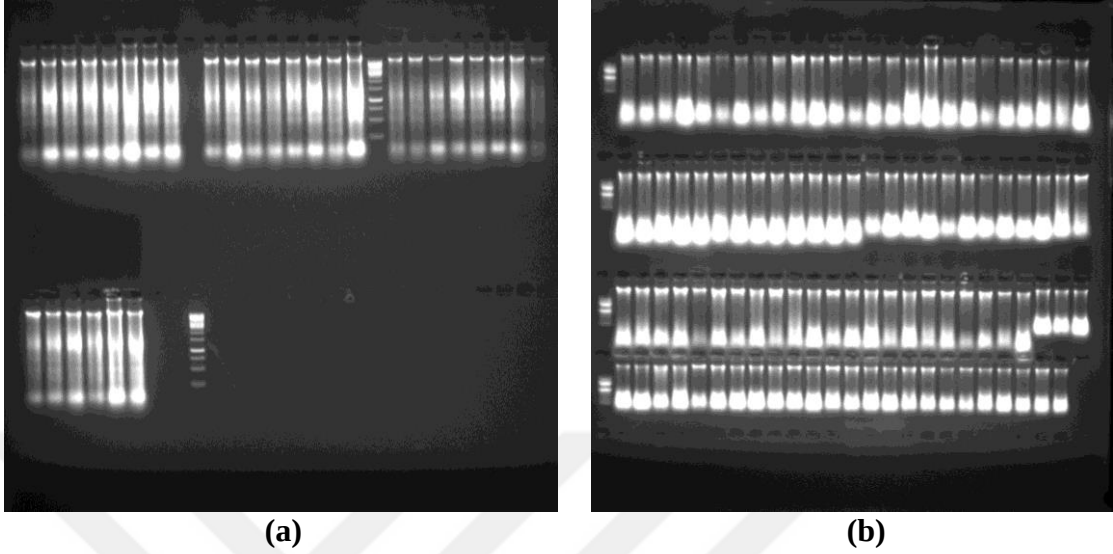
Şekil 4.6. CA 2969’da bulunan 2 nükleotid delesyon bölgesi



Şekil 4.7. AWC 602’de bulunan 2 farklı insersiyon

4.2. DNA İzolasyonu

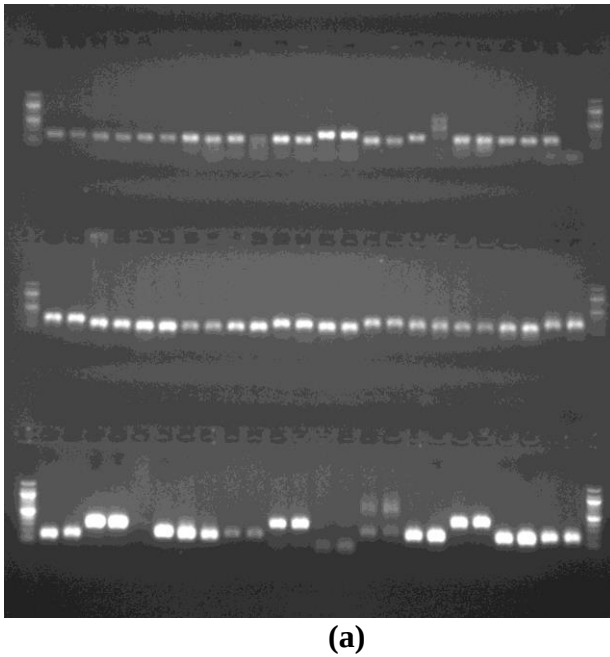
DNA'ların kalite kontrolleri %1'lik agaroz jelde yapılmıştır (Şekil 4.8).

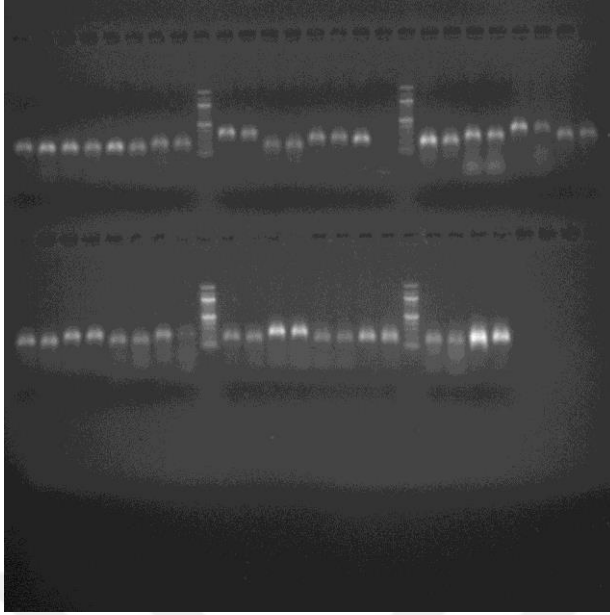


Şekil 4.8. Çalışmada kullanılan **a)** Kültür ve yabani popülasyondan; **b)** RIL popülasyonundan elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri

4.3. Genomik SSR Bölgelerinin Amplifikasyonu

Çalışma kapsamında 58 SSR primer çiftinin DNA'ları elde edilen RIL popülasyonundaki amplifikasyonunu kontrol etmek amacıyla %3'lük agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 4.2'de gösterilen agaroz jel sonuçlarına göre SSR31 ve SSR32 primerleri ne CA 2969 genotip numaralı ana ebeveynde ne de AWC 602 genotip numaralı baba ebeveynde amplifikasyon gerçekleştirilmemiştir (Şekil 4.9).

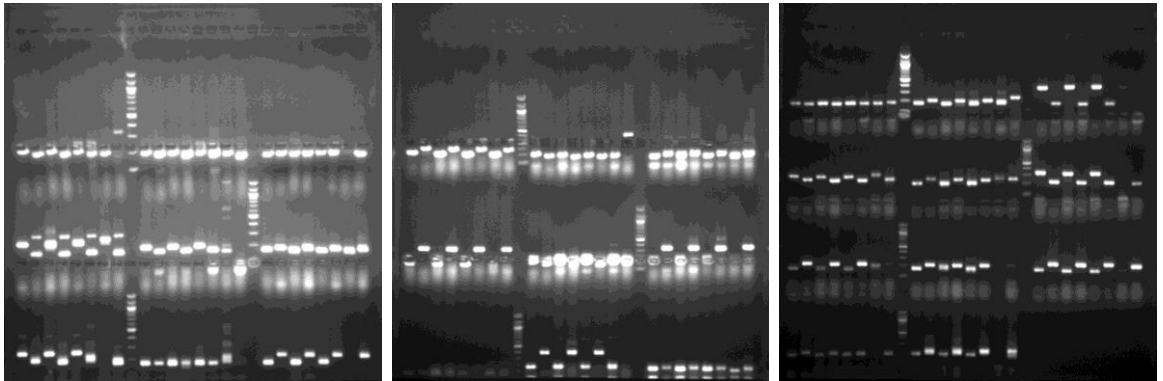




(b)

Şekil 4.9. CA 2969 ve AWC 602 genotipleri ile **a)** SSR1-SSR36 no'lu primerlerin; **b)** SSR37-SSR58 no'lu primerlerin amplifikasyonu

Çalışma kapsamında kültür ve yabani genotipler ile oluşturulan populasyona ait her DNA'dan 10'ar µl alınarak *C. arietinum* genotiplerini içeren ilk 8 DNA ile Bulk 1, *C. reticulatum* genotiplerini içeren 8 DNA ile Bulk 2, *C. echinospermum* genotiplerini içeren 8 DNA ile Bulk 3 ve *C. anatolicum*, *C. canariense*, *C. microphyllum*, *C. multijugum*, *C. oxyodon* ve *C. songaricum* genotiplerini içeren 6 DNA ile Bulk 4 oluşturulmuştur. Primer3 programı kullanılarak dizayn edilen 58 SSR primeri 4 ayrı Bulk DNA ile PCR'da test edilmiştir. %3'lük agaroz jelde primerlerin çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. SSR bölgelerinin bant büyüklüklerini doğrulamak amacıyla jelde 100 bp marker kullanılmıştır. 58 primere ait olan agaroz jel görüntüleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Primerlerden SSR31 ve SSR32 hiçbir bulk populasyonunda bant vermemiştir. SSR14 ve SSR17 Bulk 4 populasyonunda başarılı amplifikasyon gerçekleştirmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Oluşturulan 4 ayrı bulk DNA ile 58 primere ait agaroz jel görüntüsü

4.4. PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jelde Yürütülmesi

Kültür ve yabani türlerden oluşturulan 30 genotipin PCR amplifikasyonu agaroz jelde test edildikten sonra Li-cor cihazında poliakrilamid jele yüklenerek allel büyüklüklerine göre bant skorlamaları yapılmıştır. Bu analizler sonucunda 30 adet nohut genotipinde 40 farklı SSR lokusuna ait toplam 374 allel belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Populasyon seviyesinde bakıldığında kültür ve yabani populasyonlardaki allelik çeşitlilik Şekil 4.11’de şematize edilmiştir. Toplam allel dağılımı kültürlerde 63, yabanilerde 311 allel şeklindedir. *C. reticulatum* türüne ait genotiplerde toplam 110 allel belirlenirken, *C. echinospermum* türüne ait genotiplerde 112 allel gözlenmiştir. Uzak akraba yabanilerden oluşturulan populasyonda ise toplam 89 allel belirlenmiştir. 30 genotip için ortalama allel sayısı (N_a) 2.36’dır. En yüksek allel sayısı kültür populasyonunda SSR3 (Şekil 4.12), SSR4 (Şekil 4.13), SSR8, SSR21, SSR50 ve SSR56 (Şekil 4.13) primerlerinden elde edilirken, yabani populasyonda SSR2 ve SSR3 primerinden elde edilirken, bunu SSR7 (11), SSR58 (11), SSR39 (10) (Şekil 4.15) ve SSR11 (9) (Şekil 4.16) primerleri izlemiştir. Çizelge 4.3’e göre etkili allel sayısı (N_e) 1,00 ile 6,54 arasında değişmektedir. Kültür populasyonunda N_e değeri 1,00 ile 2,68 arasında değişirken, *C. reticulatum* populasyonunda 1,00 ile 6,53, *C. echinospermum* populasyonunda 1,00 ile 6,40 ve diğer yabaniler populasyonunda ise 1,00 ile 6,54 arasında değişmiştir. Bütün genotipler ele alındığında ortalama N_e değeri $1,93 \pm 0,10$ olarak bulunmuştur. Shannon sabiti (I), kültür populasyonunda $0,29 \pm 0,05$, *C. reticulatum* populasyonunda $0,77 \pm 0,08$, *C. echinospermum* populasyonunda $0,72 \pm 0,09$ ve diğer yabaniler populasyonunda ise $0,64 \pm 0,09$ olarak hesaplanmıştır. Yüksek I değeri populasyon içinde önemli oranda varyasyon olduğunu göstermektedir. Nei’nin (1987) gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değeri sırasıyla $0,08 \pm 0,01$ ve $0,34 \pm 0,02$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler kültür ve diğer yabani populasyonlar için ayrı ayrı da hesaplanmıştır ve Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. H_o ve H_e değerleri sırasıyla kültür populasyonunda 0,05 ve 0,18 iken, *C. reticulatum* populasyonunda 0,08 ve 0,44, *C. echinospermum* populasyonunda 0,10 ve 0,39, diğer yabaniler populasyonunda ise 0,09 ve 0,37 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan 40 farklı SSR lokusuna ait ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PIC) $0,73 \pm 0,01$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). En yüksek PIC değeri SSR21 (0,90) lokusunda gözlenirken, bunu SSR56 (0,88), SSR54 (0,86), SSR4 (0,85), SSR7 (0,83) ve SSR34 (0,83) lokusları izlemiştir. En düşük PIC değeri SSR9 (0,51) lokusunda bulunmuştur (Çizelge 4.2).

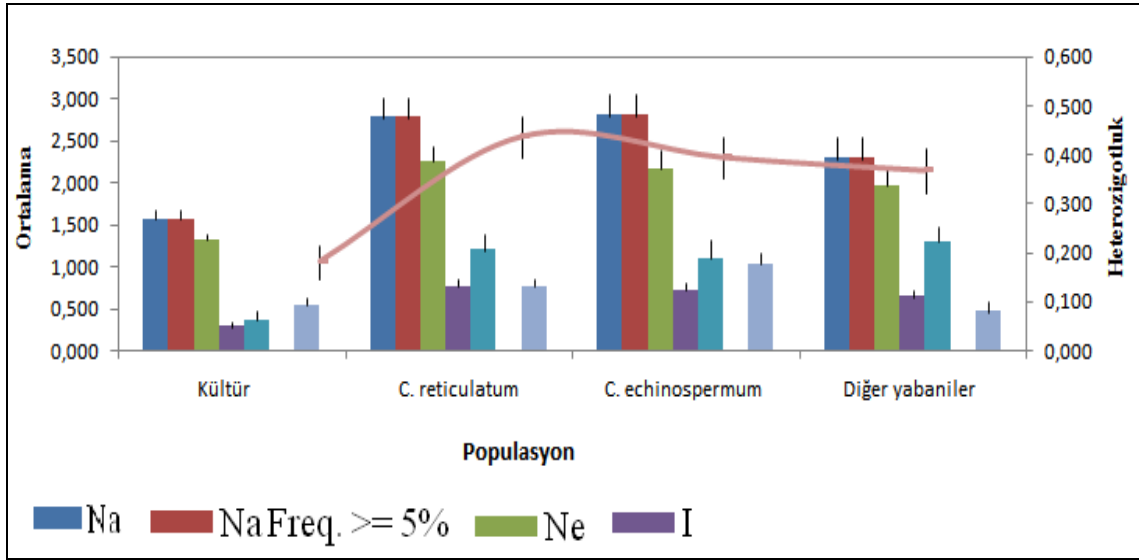
Çizelge 4.2. 30 genotipte her lokusta gözlenen min-max allel büyüklükleri ile polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerleri

Lokus adı	Minimum allel büyüklüğü (bp)	Maksimum allel büyüklüğü (bp)	PIC*
SSR2	176	427	0,83
SSR3	187	237	0,78
SSR4	170	198	0,85
SSR5	187	201	0,64
SSR6	168	187	0,64

Çizelge 4.2'nin devamı

Lokus adı	Minimum allel büyüklüğü (bp)	Maksimum allel büyüklüğü (bp)	PIC*
SSR7	210	274	0,83
SSR8	162	174	0,75
SSR9	200	203	0,51
SSR10	178	180	0,66
SSR11	143	184	0,82
SSR12	176	202	0,69
SSR13	22	255	0,83
SSR16	150	171	0,61
SSR17	166	176	0,82
SSR19	174	180	0,73
SSR21	200	227	0,90
SSR25	164	180	0,74
SSR28	147	173	0,72
SSR30	150	156	0,55
SSR33	187	200	0,61
SSR34	150	176	0,83
SSR35	146	176	0,80
SSR36	183	190	0,54
SSR37	172	181	0,60
SSR38	170	176	0,81
SSR39	170	203	0,77
SSR42	168	174	0,64
SSR43	235	247	0,72
SSR44	213	237	0,61
SSR45	180	201	0,65
SSR46	248	260	0,78
SSR49	152	187	0,75
SSR50	203	225	0,79
SSR51	155	204	0,77
SSR52	203	214	0,69
SSR53	172	176	0,74
SSR54	227	255	0,86
SSR55	163	200	0,75
SSR56	181	205	0,88
SSR57	168	172	0,66
SSR58	168	213	0,82

*PIC = Polimorfizm bilgi içeriği



Na = Gözlenen allel sayısı

Na (Freq >= 5%) = No. of Different Alleles with a Frequency >= 5%

Ne = Etkili allel sayısı

I = Shannon indeksi

Şekil 4.11. Kültür ve yabani populasyonlardaki allelik çeşitliliğin şematize edilmesi

Çizelge 4.3. Kültür ve yabani populasyonlara ait genetik çeşitlilik parametreleri

Pop	Lokus	N*	Na*	Ne*	I*	Ho*	He*	uHe*
Kültür populasyonu	SSR2	8	2,00	1,88	0,66	0,00	0,47	0,50
	SSR3	8	3,00	1,68	0,74	0,00	0,41	0,43
	SSR4	8	3,00	2,13	0,90	0,00	0,53	0,57
	SSR5	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR6	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR7	8	2,00	1,28	0,38	0,00	0,22	0,23
	SSR8	8	3,00	1,68	0,74	0,00	0,41	0,43
	SSR9	6	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR10	8	2,00	1,75	0,62	0,12	0,43	0,46
	SSR11	5	2,00	2,00	0,69	0,20	0,50	0,56
	SSR12	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR13	6	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR16	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR17	8	2,00	2,00	0,69	1,00	0,50	0,53
	SSR19	8	2,00	1,60	0,56	0,00	0,37	0,40
	SSR21	4	3,00	2,67	1,04	0,00	0,62	0,71
	SSR25	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR28	6	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR37	8	2,00	1,28	0,38	0,25	0,22	0,23
	SSR39	8	2,00	1,60	0,57	0,00	0,37	0,40

Çizelge 4.3'ün devamı

Pop	Lokus	N*	Na*	Ne*	I*	Ho*	He*	uHe*
Kültür populasyonu	SSR33	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR34	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR35	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR36	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR38	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR42	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR43	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR44	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR45	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR46	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR49	8	2,00	1,88	0,66	0,00	0,47	0,50
	SSR50	8	3,00	1,85	0,78	0,12	0,46	0,49
	SSR51	5	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR52	8	2,00	1,28	0,38	0,25	0,22	0,23
	SSR53	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR54	7	2,00	1,69	0,60	0,00	0,41	0,44
	SSR55	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR56	6	3,00	2,57	1,01	0,00	0,61	0,67
	SSR57	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR58	8	2,00	1,28	0,38	0,00	0,22	0,23
	Ort.	7,22 ± 0,27	1,56 ± 0,12	1,32 ± 0,08	0,29 ± 0,05	0,048 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,20 ± 0,04
C. reticulatum populasyonu	SSR2	8	5,00	3,20	1,39	0,00	0,69	0,73
	SSR3	8	5,00	2,72	1,28	0,12	0,63	0,67
	SSR4	8	4,00	3,56	1,32	0,00	0,72	0,77
	SSR5	8	3,00	2,67	1,04	0,00	0,62	0,67
	SSR6	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR7	7	7,00	6,53	1,91	0,14	0,85	0,91
	SSR8	8	3,00	1,68	0,74	0,00	0,41	0,43
	SSR9	5	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR10	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR11	6	3,00	2,88	1,08	0,17	0,65	0,71
	SSR12	6	4,00	3,00	1,24	0,00	0,67	0,73
	SSR13	6	2,00	2,00	0,70	0,00	0,50	0,54
	SSR16	7	4,00	2,51	1,17	0,14	0,60	0,65
	SSR17	6	4,00	2,77	1,14	1,00	0,64	0,70
	SSR19	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR21	8	4,00	2,91	1,21	0,00	0,66	0,70
	SSR25	7	2,00	1,69	0,60	0,00	0,41	0,44
	SSR28	5	2,00	1,72	0,61	0,20	0,42	0,47
	SSR37	4	2,00	1,60	0,56	0,00	0,37	0,43

Çizelge 4.3'ün devamı

Pop	Lokus	N*	Na*	Ne*	I*	Ho*	He*	uHe*
<i>C. reticulatum</i> populasyonu	SSR39	7	2,00	1,69	0,59	0,00	0,41	0,44
	SSR33	7	2,00	1,32	0,41	0,00	0,24	0,26
	SSR34	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR35	1	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR36	8	2,00	1,97	0,68	0,12	0,49	0,52
	SSR38	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR42	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR43	8	2,00	1,88	0,66	0,00	0,47	0,50
	SSR44	7	3,00	2,88	1,08	0,00	0,65	0,70
	SSR45	7	4,00	3,38	1,27	0,14	0,70	0,76
	SSR46	7	2,00	1,96	0,68	0,00	0,49	0,53
	SSR49	8	2,00	1,88	0,66	0,00	0,47	0,50
	SSR50	8	3,00	2,51	0,98	0,87	0,60	0,64
	SSR51	8	5,00	4,00	1,49	0,00	0,75	0,80
	SSR52	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR53	8	3,00	2,46	0,97	0,00	0,59	0,63
	SSR54	6	3,00	2,57	1,01	0,00	0,61	0,67
	SSR55	8	2,00	1,28	0,38	0,00	0,22	0,23
	SSR56	8	5,00	3,20	1,39	0,00	0,69	0,73
	SSR57	7	2,00	1,32	0,41	0,00	0,24	0,26
	SSR58	8	5,00	4,00	1,47	0,37	0,75	0,800
	Ort.	6,927 ± 0,214	2,78 ± 0,23	2,25 ± 0,18	0,77 ± 0,08	0,08 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,47 ± 0,05
<i>C. echinospermum</i> populasyonu	SSR2	6	6,00	4,80	1,68	0,17	0,79	0,87
	SSR3	8	7,00	5,56	1,82	0,12	0,82	0,87
	SSR4	7	6,00	4,45	1,63	0,29	0,78	0,83
	SSR5	7	2,00	1,69	0,60	0,00	0,41	0,44
	SSR6	7	2,00	1,15	0,26	0,14	0,13	0,14
	SSR7	6	3,00	2,88	1,08	0,17	0,65	0,71
	SSR8	6	2,00	1,38	0,45	0,00	0,28	0,30
	SSR9	8	2,00	1,28	0,38	0,00	0,22	0,23
	SSR10	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR11	8	4,00	2,84	1,18	0,25	0,65	0,69
	SSR12	6	2,00	2,00	0,69	0,00	0,50	0,54
	SSR13	7	3,00	1,81	0,80	0,29	0,45	0,48
	SSR16	8	2,00	1,13	0,23	0,12	0,12	0,12
	SSR17	5	2,00	1,22	0,32	0,20	0,18	0,20
	SSR19	7	2,00	1,69	0,60	0,00	0,41	0,44
	SSR21	8	5,00	4,00	1,49	0,00	0,75	0,80
	SSR25	6	3,00	2,32	0,92	0,67	0,57	0,62
	SSR28	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00

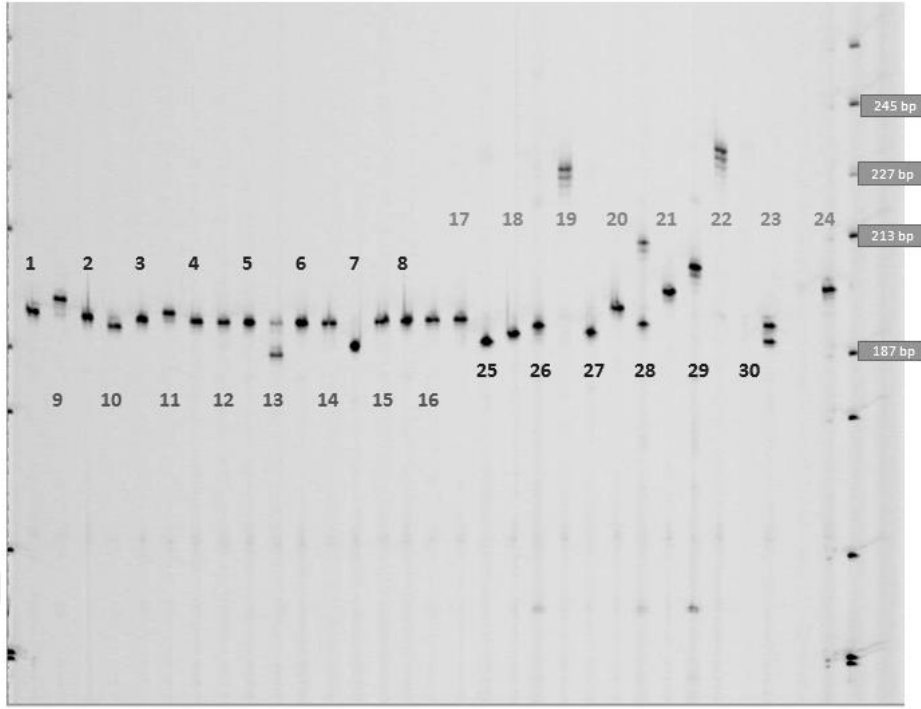
Çizelge 4.3'ün devamı

Pop	Lokus	N*	Na*	Ne*	I*	Ho*	He*	uHe*
C. <i>echinospermum</i> populasyonu	SSR37	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR39	7	5,00	4,08	1,49	0,29	0,75	0,81
	SSR33	7	2,00	1,96	0,68	0,00	0,49	0,53
	SSR34	8	4,00	3,56	1,32	0,00	0,72	0,77
	SSR35	7	3,00	1,81	0,80	0,00	0,45	0,48
	SSR36	8	2,00	1,28	0,38	0,25	0,22	0,23
	SSR38	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR42	7	2,00	1,32	0,41	0,00	0,24	0,26
	SSR43	8	2,00	1,28	0,38	0,25	0,22	0,23
	SSR44	8	2,00	1,13	0,23	0,12	0,12	0,12
	SSR45	6	4,00	3,00	1,24	0,00	0,67	0,73
	SSR46	8	3,00	1,68	0,74	0,50	0,41	0,43
	SSR49	8	7,00	6,40	1,91	0,00	0,84	0,90
	SSR50	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR51	7	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR52	7	2,00	1,69	0,60	0,00	0,41	0,44
	SSR53	8	3,00	1,47	0,60	0,12	0,32	0,34
	SSR54	8	2,00	1,28	0,38	0,25	0,22	0,23
	SSR55	8	3,00	2,67	1,04	0,00	0,62	0,67
	SSR56	5	2,00	1,92	0,67	0,00	0,48	0,53
	SSR57	8	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR58	8	5,00	3,66	1,41	0,12	0,73	0,77
	Ort.	7,000 ± 0,221	2,80 ± 0,26	2,16 ± 0,22	0,72 ± 0,09	0,10 ± 0,02	0,40 ± 0,04	0,42 ± 0,05
Diğer yabaniler populasyonu	SSR2	6	2,00	1,18	0,29	0,17	0,15	0,17
	SSR3	5	6,00	5,00	1,70	0,40	0,80	0,89
	SSR4	6	2,00	1,80	0,64	0,00	0,44	0,48
	SSR5	6	4,00	3,27	1,26	0,67	0,69	0,76
	SSR6	5	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR7	4	3,00	2,67	1,04	0,00	0,62	0,71
	SSR8	5	3,00	2,38	0,94	0,40	0,58	0,64
	SSR9	4	2,00	2,00	0,69	0,00	0,50	0,57
	SSR10	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR11	6	5,00	4,50	1,56	0,00	0,78	0,85
	SSR12	4	2,00	1,60	0,56	0,00	0,37	0,43
	SSR13	1	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR16	5	3,00	2,63	1,03	0,60	0,62	0,69
	SSR17	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR19	5	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR21	1	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR25	2	2,00	2,00	0,70	0,00	0,50	0,67

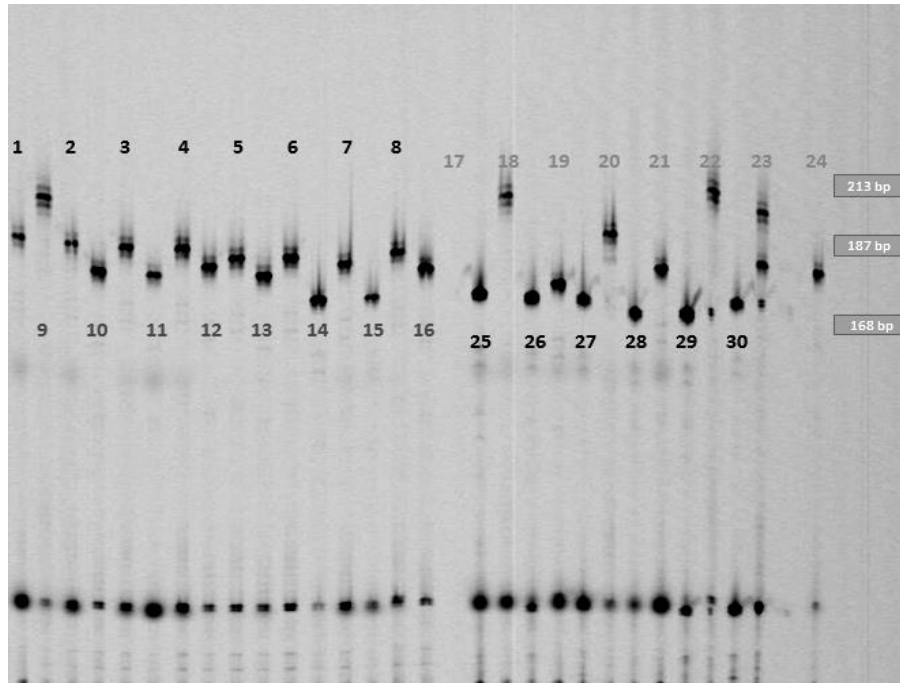
Çizelge 4.3'ün devamı

Pop	Lokus	N*	Na*	Ne*	I*	Ho*	He*	uHe*
Diğer yabaniler popülasyonu	SSR28	2	2,00	2,00	0,69	0,00	0,50	0,67
	SSR37	4	3,00	2,67	1,040	0,00	0,62	0,71
	SSR39	6	7,00	6,54	1,91	0,33	0,85	0,92
	SSR33	5	3,00	2,78	1,05	0,00	0,64	0,71
	SSR34	5	3,00	2,78	1,05	0,00	0,64	0,71
	SSR35	5	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR36	4	2,00	1,60	0,56	0,00	0,37	0,43
	SSR38	4	2,00	2,00	0,69	0,00	0,50	0,57
	SSR42	2	2,00	2,00	0,69	0,00	0,50	0,67
	SSR43	6	3,00	2,57	1,01	0,00	0,61	0,67
	SSR44	4	3,00	2,67	1,04	0,00	0,62	0,71
	SSR45	6	2,00	1,18	0,29	0,17	0,15	0,17
	SSR46	4	2,00	1,60	0,56	0,00	0,37	0,43
	SSR49	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR50	4	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR51	6	4,00	1,71	0,84	0,33	0,42	0,45
	SSR52	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR53	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR54	4	2,00	1,28	0,38	0,25	0,22	0,25
	SSR55	1	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR56	4	3,00	1,68	0,74	0,25	0,41	0,46
	SSR57	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SSR58	6	5,00	4,50	1,56	0,00	0,78	0,85
	Ort.	3,71 ± 0,33	2,29 ± 0,26	1,97 ± 0,23	0,64 ± 0,09	0,09 ± 0,03	0,37 ± 0,05	0,41 ± 0,05

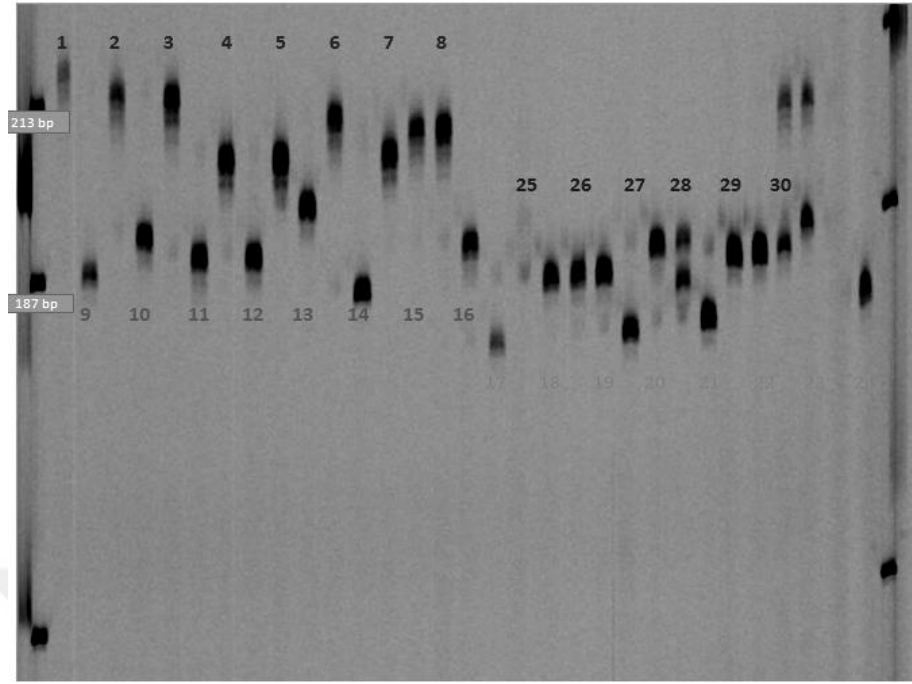
*N = örnek sayısı, Na = gözlenen allel sayısı, Ne = etkili allel sayısı, I = Shannon sabiti, Ho = gözlenen heterozigotluk, He = beklenen heterozigotluk (Nei 1987), ± standart hata.



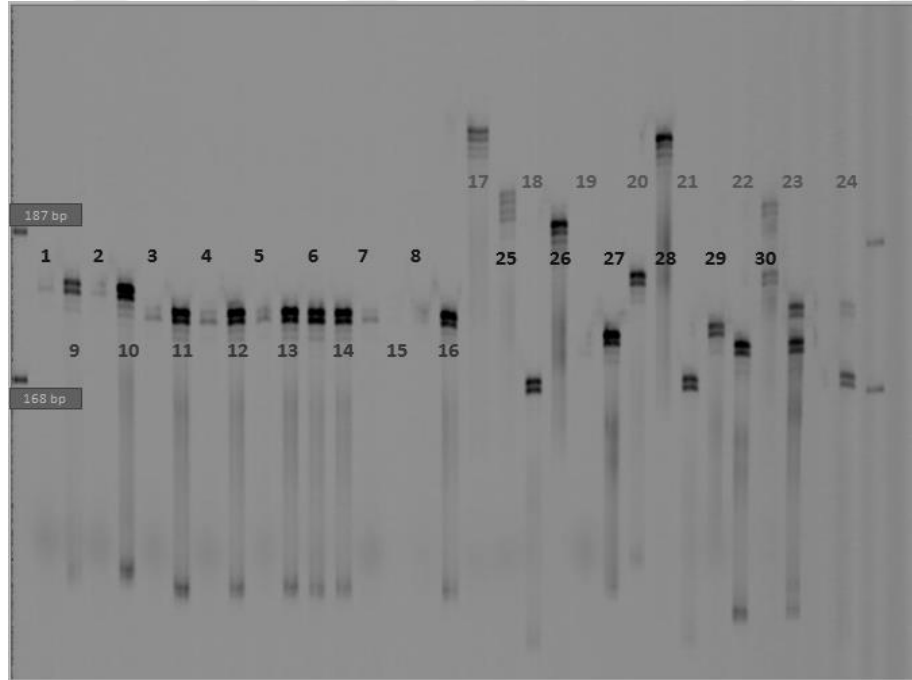
şekil 4.12. Kùltùr ve yabani populusyonda SSR3 markerine ait Li-cor gùrùntùsù (1-8: Kùltùr genotipleri, 9-16: *C. reticulatum* genotipleri, 17-24: *C. echinospermum* genotipleri, 25-30: Diğer yabanilere ait genotipler)



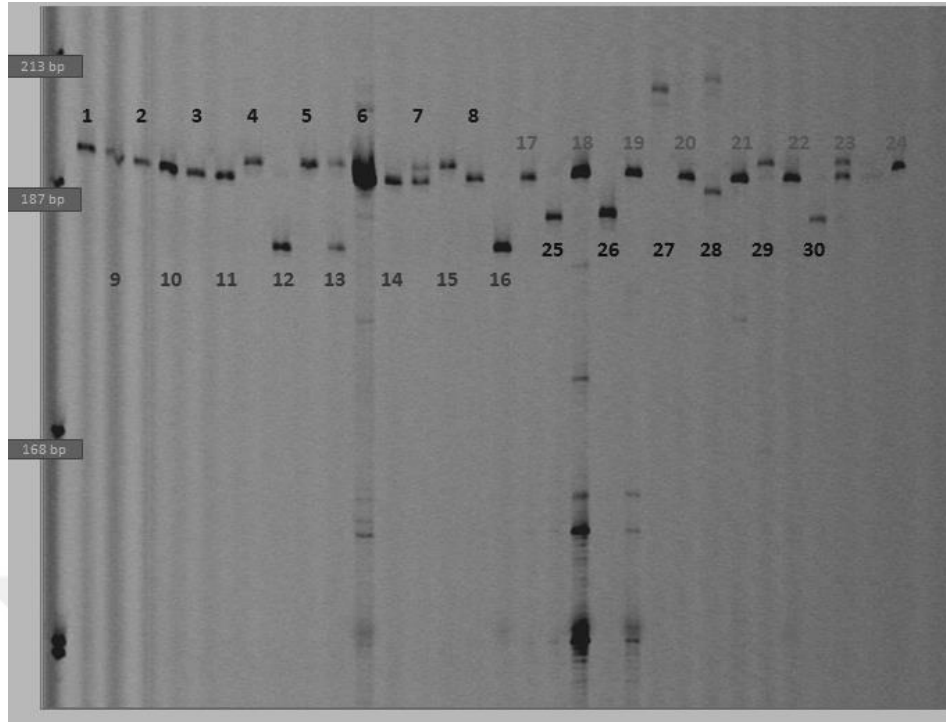
şekil 4.13. Kùltùr ve yabani populusyonda SSR4 markerine ait Li-cor gùrùntùsù (1-8: Kùltùr genotipleri, 9-16: *C. reticulatum* genotipleri, 17-24: *C. echinospermum* genotipleri, 25-30: Diğer yabanilere ait genotipler)



Şekil 4.14. Kültür ve yabani popülasyonda SSR56 markerine ait Li-cor görüntüsü (1-8: Kültür genotipleri, 9-16: *C. reticulatum* genotipleri, 17-24: *C. echinospermum* genotipleri, 25-30: Diğer yabanilere ait genotipler)



Şekil 4.15. Kültür ve yabani popülasyonda SSR39 markerine ait Li-cor görüntüsü (1-8: Kültür genotipleri, 9-16: *C. reticulatum* genotipleri, 17-24: *C. echinospermum* genotipleri, 25-30: Diğer yabanilere ait genotipler)



Şekil 4.16. Kültür ve yabani popülasyonda SSR11 markerine ait Li-cor görüntüsü (1-8: Kültür genotipleri, 9-16: *C. reticulatum* genotipleri, 17-24: *C. echinospermum* genotipleri, 25-30: Diğer yabaniilere ait genotipler)

Borse vd. (2017) 33 polimorfik SSR ile yaptıkları çalışmada 27 nohut genotipinde toplam 135 allel elde etmişlerdir. Ortalama allel sayısı 4,1 olarak belirlenmiştir. Benzer sayıda genotip ve lokus ile yapılan çalışmamızda 374 olarak gözlenen allel sayısının daha fazla olduğu göze çarpmaktadır. Fakat ortalama allel sayısı bizim çalışmamızda 2,36 olarak gözlenmiştir. Gözlenen allel sayıları çalışılan popülasyonun doğasına bağlı olarak değişmektedir (Borse vd. 2017). Dolayısıyla çalışmamızda kültür ve yabani olmak üzere 2 farklı popülasyonun olması ortalama allel sayısını etkilemektedir. Kültür popülasyonundaki ortalama allel sayısı Borse vd. (2017) tarafından gözlenen ortalama allel sayısına göre daha düşük iken, yabani popülasyondaki sayısı daha fazladır. Upadhyaya vd. (2006, 2008) tarafından daha çok çeşitliliğe sahip universal bir koleksiyonu değerlendirdiği çalışmasında daha yüksek allel sayısı elde etmesinin nedeninin bu olabileceğini öngörmüştür.

Borse vd. (2017) yapılan aynı çalışmada PIC değerleri 0,19 ile 0,82 arasında değişmiştir. 17 primer 0,5'den büyük PIC değerine sahipken, 16 primer 0,5'den küçük PIC değeri göstermiştir. PIC değerlerindeki bu geniş dağılım çalışılan materyalde desi ve kabuli tiplerin aynı zamanda yerel ve dış kaynaklı tiplerin bulunmasından kaynaklıdır. Upadhyaya vd. (2008) kendi koleksiyonunda 0,47 ile 0,97 arasında değişen daha dar bir PIC dağılımı tespit etmiştir. Çalışmamızdan elde edilen PIC değerleri 0,51 ile 0,90 arasında dağılım göstermiştir. Borse vd. (2017) PIC değerlerindeki bu geniş dağılımın çalışılan materyalde desi ve kabuli tiplerin aynı zamanda yerel ve dış kaynaklı tiplerin bulunmasından kaynaklı olabileceğini belirtmiştir. Agarwal vd. (2015) tarafından desi, kabuli ve yabani tiplerin bir arada olduğu 44 genotiple 25 markerle

yapılan bir çalışmada PIC değerleri 0,11 ile 0,77 arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmada PIC değerlerinin daha az bulunmasının sebebinin marker sayısının azlığına bağlı olduğu düşünülebilir. Choudhary vd. (2012) tarafından 38 *Cicer arietinum*, 6 *C. reticulatum* ve 4 *C. echinospermum* genotipi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada 100 SSR markerinden toplam 480 allel (ort: 4,8) ve 0,04 ile 0,80 arasında dağılım gösteren PIC değerleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada SSR markerlerinin intra- ve inter-spesifik varyasyonlardaki derecesinin farklı olabileceği ifade edilmiştir. Buna benzer olarak Hüttel vd. (1999) 22 marker kullanarak 4 genotiple intra-spesifik seviyede 2-4 allel belirlerken, Singh vd. (2003) 12 markerle 13 genotipte yaptığı çalışmada ortalama 2,58 allel olacak şekilde 1-4 allel belirlemiştir. Singh (2008) 21 nohut genotipiyle yaptığı çalışmasında 18 SSR markerine ait 2-5 allel belirlerken, ortalama PIC değerini 0,78 olarak hesaplamıştır. Hüttel vd. (1999), Singh vd. (2003) ve Singh (2008) tarafından yapılan çalışmalarla kıyaslandığında bizim çalışmamızdan elde edilen daha fazla allel sayısı bundan sonra yapılacak çalışmalarda daha geniş set SSR kullanımına katkı sağlayacaktır. Bir diğer yünden, Sefera vd. (2011) tarafından yapılan çalışmayla kıyaslandığında çalışmamızda daha düşük seviyede allel sayısı ve PIC değerleri belirlenmiştir. Bunun sebebinin yazarın daha önceki çalışmalarda belirlemiş oldukları oldukça yüksek polimorfizm oranına sahip markerleri kullanmış oldukları düşünülebilir. Upadhyaya vd. (2008) bu çıkarımı destekleyecek şekilde polimorfik marker kullanımının bu parametreleri arttırdığını bildirmiştir.

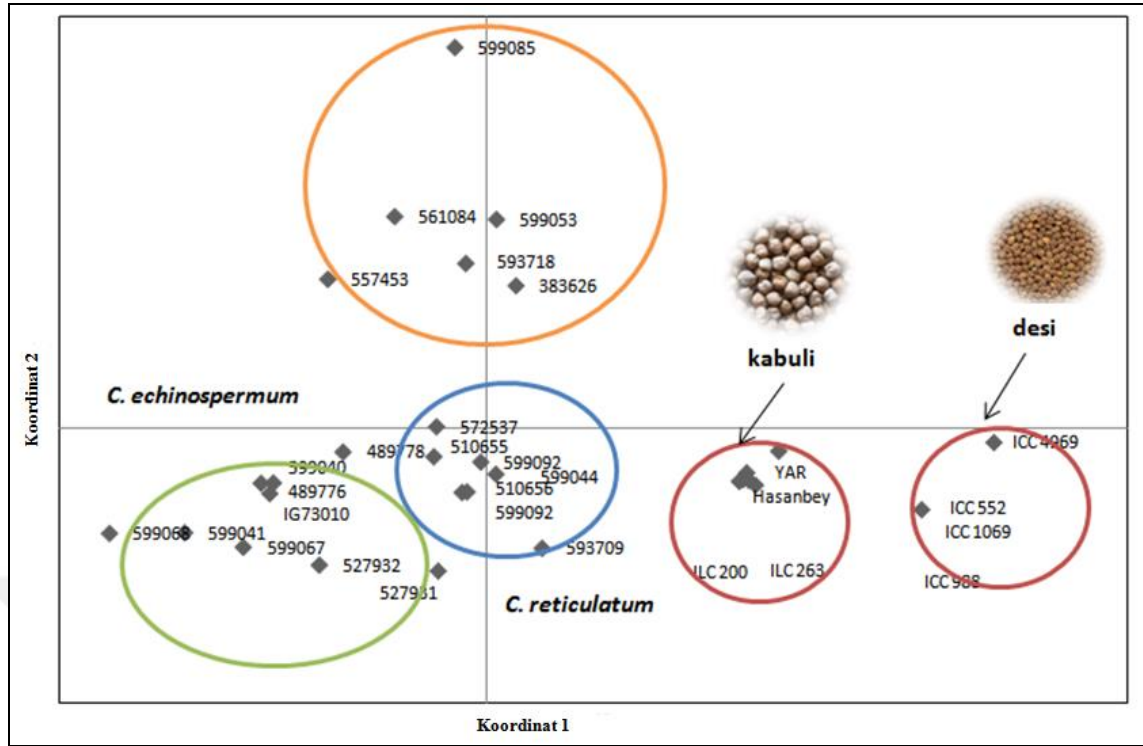
Chen vd. (2015b) börülce bitkisinde yaptıkları çalışmada elde ettikleri allel sayısı 2 ile 6 arasında dağılım göstermiştir. PIC değeri ortalaması 0,34 bulunmuştur. Tangphatsornruang vd. (2009) tarafından 60 genomik SSR kullanılarak 17 börülce genotipinde yapılan bir çalışmada PIC değerleri 0,06 ve 0,69 (ort: 0,26) arasında bulunmuştur. Araştırmacılar kültürü yapılan tiplerdeki polimorfizm oranının yabancılar göre daha fazla olduğunu ifade etmiştir. Ancak Zhang vd. (2014) yabancı arpada yaptıkları çalışmada bu durumun tersini ifade etmiştir. Yaptığımız çalışmada nohut bitkisinin SSR analiz sonuçlarına göre yabancılerdeki değer kültürlere göre oldukça fazladır. Choudhary vd. (2012)' de PIC değerini de kapsayan birçok genetik çeşitlilik parametresinin kültürü yapılan nohutun dar genetik temelinden dolayı yabancılerde daha fazla olduğunu ileri sürmüştür.

Çalışmamızda polimorfik lokusların oranı toplamda %68 olarak hesaplanmıştır. Kültür popülasyonu, *C. reticulatum* popülasyonu, *C. echinospermum* popülasyonu ve diğer yabancılar popülasyonunda bu oran sırasıyla %44, %78, %83 ve %68 olarak hesaplanmıştır. Bu zamana kadar yapılan moleküler marker analizlerinde nohutun polimorfizm seviyesinin düşük seviyede olduğu görülmektedir (Choudhary vd. 2009). Bu durumun nohutun kendine döllen bir bitki olmasına ve aynı zamanda dünya genelinde yayılış gösteren yapısına bağlı olduğu düşünülmektedir (Udupa vd. 1999). Choudhary vd. (2009) nohutta EST-SSR markerlerinde yaptıkları çalışmada %16 seviyesinde düşük bir polimorfizm oranı belirlemiştir. Bu oranın daha önceden yapılan çalışmalarda genomik markerlerde gözlenen %40–60'luk polimorfizm oranlarına göre oldukça düşüktür. Kodlanan bölgelerde bulunan SSR bölgeleri yoğun bir seleksiyon baskısı altındadır dolayısıyla çok sayıda mutasyon barındırırlar (Varshney vd. 2005a; Li vd. 2004). Çeltik (Cho vd. 2000), şeker kamışı (Cordeiro vd. 2001) ve buğdayda (Gupta vd. 2003) yapılan çalışmalarda da benzer şekilde EST-SSR'larda düşük seviyede polimorfizm görülmüştür. EST bölgelerinden geliştirilen SSR'ların etkinliği çeltik (Cho

vd. 2000) ve asmada (Scott vd. 2000) bildirilmiştir. Bu çalışmalar mevcut çalışma ile örtüşmektedir ki genomik SSR'ların polimorfizm seviyesi EST-SSR'lardan daha yüksektir. Cho vd. (2000) ekzon veya açık okuma bölgelerinde (ORF) bulunan trinükleotid motiflerin intron veya 3' ve 5' untranslated bölgelere göre daha düşük seviyede polimorfizm gösterdiğini bildirmiştir. Scott vd. (2000) ayrıca kodlanan bölgelerde bulunan SSR'ların daha polimorfik ve türler arasında aktarılabilir olduğunu belirtmiştir.

Choudhary vd. (2012) çalışmalarında heterozigot allellerin oranının oldukça düşük bir seviyede (%1.2) tespit etmiştir. Araştırmacılara göre nohut gibi kendine döllen bitkilerde heterozigotluk daha önceden rapor edilen (Gowda 1981) yabancı döllen türler için daha düşük seviyede izlenmektedir. Ancak kendileme depresyonu veya yüksek mutasyon hızı gibi ihtimaller dahilinde heterozigotların varlığı göz ardı edilmemelidir. Çalışmamızda heterozigotluk kültür popülasyonunda %5 seviyesinde iken bu oran yabanilerde %10 seviyesine kadar çıkmıştır. Bu da bize markerlerin etkinliğini göstermektedir. Yine Choudhary vd. (2009) başka bir çalışmada gözlenen heterozigotluk değerini 0,16 olarak bulurken beklenen heterozigotluk 0,56 olarak hesaplamıştır. Ancak aynı çalışmada yabanileri dahil ederek oluşturdukları popülasyonda yaptıkları SSR analizinde gözlenen heterozigotluk değerini 0,22 olarak belirlemiştir. Yani, yabanilerde gözlenen ve beklenen heterozigotluk oranları daha fazladır. Bizim bulgularımızla paralel sonuçlar gözlenmiştir.

Farklı çalışmaların sonuçlarından görüldüğü üzere allel sayısı, PIC değeri ve gen çeşitliliği gibi çeşitlilik parametreleri göz önüne alındığında nohutun yabani formlarında daha yüksek değerler elde edilmektedir. Iruela vd. (2002), Nguyen vd. (2004) ve Rao vd. (2006) tarafından kültür popülasyonundan elde edilen çok düşük seviyedeki çeşitlilik parametreleri bu varsayımları doğrulamaktadır. Her çalışmada elde edilen farklı sonuçlar şunu göstermektedir ki; çalışılan popülasyonun sayısı, değerlendirilen lokus sayısı ve kullanılan markerlerin tipi ve özelliği bu parametreleri etkilemektedir. Ancak genel çerçevede bakıldığında *C. arietinum* tek yıllık yabani formlarına göre daha sınırlı varyasyona sahiptir.



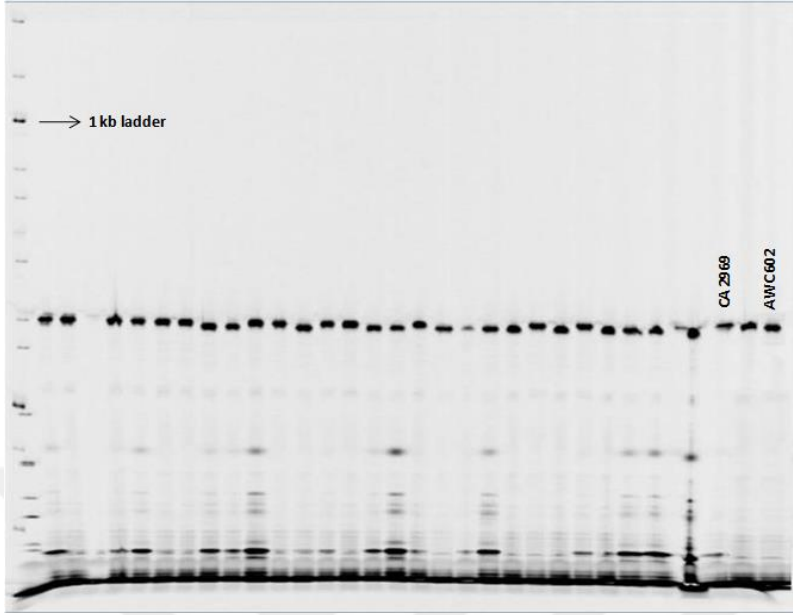
Şekil 4.17. 30 nohut genotipine ait PCA grafiği

Temel bileşenler analizinde (PCA) çalışılan genotiplerin %22,01'i PC1 tarafından ve %16,63'i PC2 tarafından açıklanmıştır. Analiz sonucunda toplamda dört belirgin grup göze çarpmaktadır (Şekil 4.17). *C. arietinum* türlerine ait kültür formları geniş bir alanda dağılım göstermiştir. Bu grupta belirgin 2 alt grup göze çarpmaktadır. YAR, Hasanbey, ILC 200 ve ILC 263 numaralı genotipler kabuli tip nohut olup, ICC 4969, ICC 552, ICC 1069 ve ICC 988 numaralı genotipler desi tip nohuttur. PCA grafiği kültür formu içindeki kabuli ve desi tip nohut farklılaşmasını ortaya çıkarmıştır. Kültür formuna yakın bir küme içinde toplanan *C. reticulatum* türünün üyeleri ve hemen onun yanında ise *C. echinospermum* genotipleri bulunmaktadır. *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* türleri nohutun 1. gen havuzunda olup PCA grafiğinde bunu destekler bir dağılım göze çarpmıştır. *C. arietinum*, *C. reticulatum* ve *C. echinospermum* genotiplerinin oluşturduğu gruptan daha farklı bir alanda bir grup daha göze çarpmaktadır ki bu uzak akraba türlerden oluşan genotiplerdir.

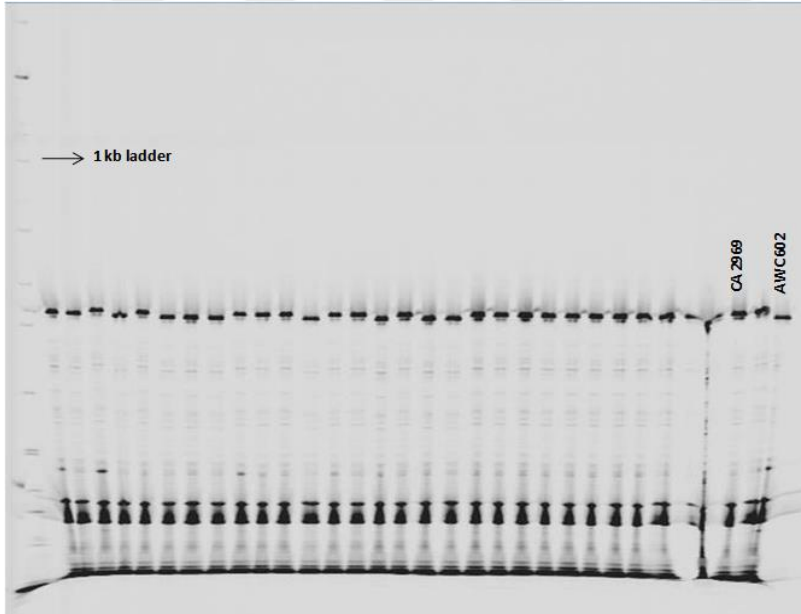
4.5. Geliştirilen SSR primerlerinin RIL Populasyonunda Analizi

RIL populasyonunu temsil eden 30 genotipin 58 primerle PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri Li-cor cihazında poliakrilamid jele yüklenmiş, CA 2969 (ana) ve AWC 602 (baba) ile karşılaştırılarak allel büyüklükleri belirlenmiştir. Çizelge 4.3'de verilen allel büyüklükleri arasındaki farklılık poliakrilamid jelde de doğrulanmıştır. Ana ve baba ebeveynin allel büyüklüklerine bakıldığında genotiplerin bu alleleri taşıdıkları görülmektedir. SSR5 (Şekil 4.18) ve SSR10 primerleri (Şekil 4.19) 30 RIL genotipinde ana ve baba arasında yine 2 bazlık polimorfizme uygun alleler üretirken, SSR14 primeri (Şekil 4.20) 8 bazlık polimorfizme

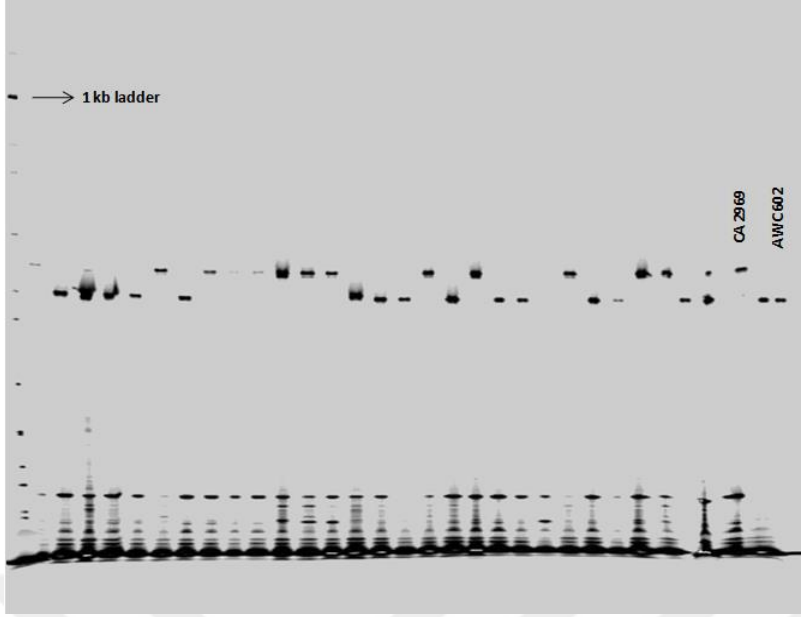
ve SSR18 primeri ise (şekil 4.21) 6 bazlık polimorfizme uygun alleler meydana getirmiştir.



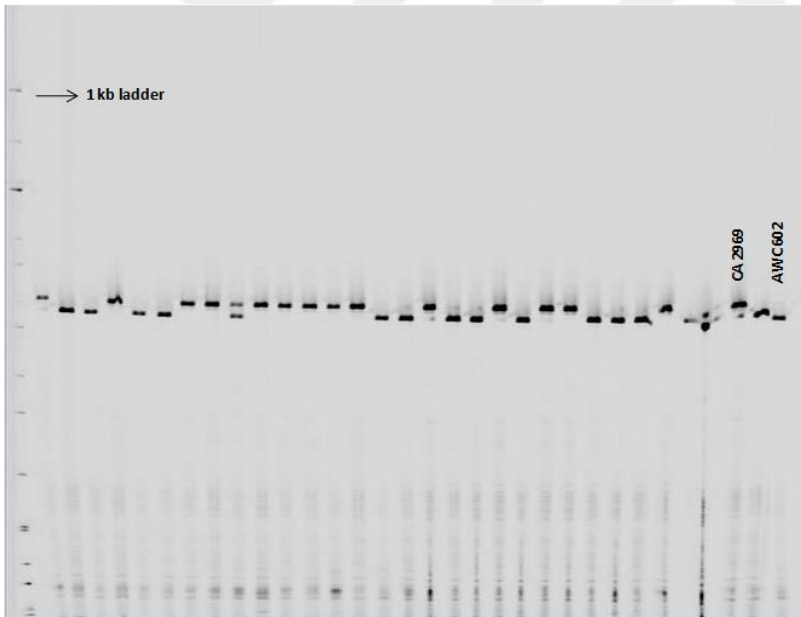
şekil 4.18. RIL populasyonunda SSR5 markerine ait jel görüntüsü



şekil 4.19. RIL populasyonunda SSR10 markerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.20. RIL popülasyonunda SSR14 markerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.21. RIL popülasyonunda SSR18 markerine ait jel görüntüsü

RIL popülasyonunu temsil eden 32 genotipte markerlerin beklenen 1:1 açılım oranlarına uygunluğunu test etmek için, her bir marker için ki-kare (χ^2) değerleri hesaplanmıştır. Ki-kare analizi ile beklenen Mendel oranlarından sapma gösteren markerler belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Sonuçlara göre SSR20 dışındaki tüm markerler için hesaplanan p değerleri 0,05'den büyük olduğu için markerlerin 1:1 açılım oranına uygun olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Markerlere ait 30 genotip için ki-kare değerleri

Marker adı	Baz büyüklüğü (bp)		Ki-kare değeri	P-değeri
	CA 2969 (ana)	AWC 602 (baba)		
SSR1	176	180	0,15	0,69
SSR2	158	160	1,00	0,32
SSR3	176	180	3,85	0,05
SSR4	164	154	0,03	0,85
SSR5	164	162	0,13	0,71
SSR6	167	157	0,04	0,85
SSR10	154	152	1,81	0,18
SSR11	153	151	2,13	0,14
SSR14	179	171	0,14	0,70
SSR15	152	148	0,04	0,84
SSR16	150	148	0,00	1,00
SSR17	150	148	0,04	0,84
SSR18	205	199	0,00	1,00
SSR19	163	161	0,00	1,00
SSR20	229	227	26,13	0,00
SSR21	184	182	2,79	0,09
SSR22	158	156	0,93	0,34
SSR23	156	154	2,29	0,13
SSR24	179	177	0,05	0,83
SSR26	311	309	0,31	0,58
SSR27	187	185	0,17	0,68
SSR29	172	170	0,61	0,43
SSR30	327	325	0,33	0,56
SSR37	154	152	0,31	0,58
SSR38	152	150	0,31	0,58
SSR39	157	155	0,14	0,70
SSR40	186	184	0,03	0,85
SSR41	341	339	0,14	0,70
SSR42	153	149	0,31	0,58
SSR43	245	243	0,53	0,46
SSR45	173	171	0,33	0,56
SSR46	221	219	0,14	0,70
SSR47	317	313	0,93	0,34
SSR51	144	140	0,53	0,46

5. SONUÇLAR

Çalışma kapsamında WGRS ile *Cicer arietinum* ve *Cicer reticulatum* türlerine ait yaklaşık 20x yoğunluğunda okumalar elde edilmiştir. Bu veriden di-nükleotid motifleri içeren tekrarlı bölgeler arasında 2 tür için polimorfik olanlardan toplam 58 SSR primeri geliştirilmiştir.

1. Yeni nesil dizileme, mevcut binlerce tekrarlı bölgenin doğrulanması ile yüksek sayıda mikrosatellit markerlerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada yüksek ölçekli genotiplemenin kullanılmış olması geliştirilen markerlerin güvenilirliğini arttırmaktadır.

2. Tüm genom dizileme verilerinin kullanılmasıyla SSR marker geliştirilmesi konusunda yeni bir iş planı ortaya konulmuştur.

3. Tekrarlı bölgelerin *C. arietinum* ile *C. reticulatum* veri setinde polimorfizm dikkate alınarak belirlenmiş olması ile buradan geliştirilen markerler hem kültür hem de yabani türlerde çalışmıştır.

4. SSR analizleri sonucunda elde edilen gözlenen allel sayısı, etkili allel sayısı gibi allel sayısına bağlı genetik çeşitlilik parametreleri yabani popülasyonda daha yüksek değerlerde bulunmaktadır. Bu sonuçlar markerlerin yabani türlerde daha etkili çalıştığını göstermektedir.

5. Geliştirilen markerler yabani ve kültür melezlerinde her türlü karakterin takibi ve seleksiyonu için potansiyel önemli birer kaynak oluşturmuştur.

6. Geliştirilen markerler RIL popülasyonunu temsil eden 30 genotipte test edilmiştir. Yapılan ki-kare analizine göre tüm markerlerin beklenen 1:1 Mendel oranına uygun olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu markerler bu popülasyonda yapılacak olan karaktere bağlı gen/QTL haritalama gibi çalışmalarda güvenli bir şekilde kullanılabilir.

7. Oluşturulan veri seti daha sonradan yapılacak SNP, INDEL gibi marker geliştirme çalışmalarına katkı sağlamıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abbo, S., Lev-Yadun, S. and Galwey, N. 2002. Vernalization response of wild chickpea. *New Phytologist*, 154 (3): 695-701.
- Abbo, S., Molina, C., Jungmann, R., Grusak, M.A., Berkovitch, Z., Reifen, R., Kahl, G., Winter, P. and Reifen, R. 2005. Quantitative trait loci governing carotenoid concentration and weight in seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (2): 185-195.
- Abbo, S., Van-Oss, R.P., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I., and Peleg, Z. 2014. Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Science*, 19 (6): 351-360.
- Adak, A., Sari, D., Sari, H., Toker, C. 2017. Gene effects of *Cicer reticulatum* on qualitative and quantitative traits in the cultivated chickpea. *Plant Breeding*, 136: 939-947.
- Agarwal, G., Sabbavarapu, M.M., Singh, V.K., Thudi, M.; Sheelamary, S., Gaur, P.M., Varshney, R.K. 2015. Identification of a non-redundant set of 202 in silico SSR markers and applicability of a select set in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Euphytica*, 205 (2): 381-394.
- Ahmad, F. and Slinkard, A.E. 2004. The extent of embryo and endosperm growth following interspecific hybridization between *Cicer arietinum* L. and related annual wild species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51 (7): 765-772.
- Ashwani, K., Sorabh, C., Sushma, S., Vinay, K., Mukesh, K. 2016. Assessment of genetic diversity among chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes using EST-SSR markers and SDS-PAGE. *Research Journal of Biotechnology*, 11 (4): 48-57.
- Atalay, E., Babaoglu, M. 2012. Determination of genetic relationship in Turkish chickpea (*cicer arietinum* l.) genotypes using SSR molecular markers and capillary electrophoresis. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22 (2): 369-375.
- Auckland, A.K. and Van der Maesen, L.J.G. 1980. Chickpea. In: Fehr, W.R., Hadley, H.H. (Eds.), *Hybridization of crop plants*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, pp. 249-259.
- Borse, V.V., Kulwal, P.L., Mhase, L.B., Jadhav, A.S. 2017. Validation of seed weight-associated SSR markers and their usefulness in distinguishing chickpea genotypes according to seed size. *Agricultural Research*, 6 (2): 130-138.
- Cancı, H. and Toker, C. 2009. Evaluation of annual wild *Cicer* species for drought and heat resistance under field conditions. *Genetic resources and crop evolution*, 56 (1): 1-6.
- Chen, H.L., Liu, L.P., Wang, L.X., Wang, S.H., Wang, M.L., Cheng, X.Z. 2015a. Development of SSR markers and assessment of genetic diversity of adzuki bean in the Chinese germplasm collection. *Molecular Breeding*, 35: 191.
- Chen, H.L., Qiao, L., Wang, L.D., Wang, S.H., Blair, M.W., Cheng, X.Z. 2015b. Assessment of genetic diversity and population structure of mung bean (*Vigna*

- radiata*) germplasm using EST-based and genomic SSR markers. *Gene*, 566 (2): 175-183.
- Chen, H.L., Wang, L.X., Liu, X.Y., Hu, L.L., Wang, S.H., Cheng, X.Z. 2017. De novo transcriptomic analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for genic SSR marker development. *BMC Genetics*, 18: 65.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34: 884-890.
- Choudhary, S., Sethy, N.K., Shokeen, B., Bhatia, S. 2009. Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. *Theor. Appl. Genet.* 118 (3): 591-608.
- Choudhary, P., Khanna, S.M., Jain, P.K., Bharadwaj, C., Kumar, J., Lakhera, P.C., Srinivasan, R. 2012. Genetic structure and diversity analysis of the primary gene pool of chickpea using SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 11 (2): 891-905.
- Clarke, H.J., Wilson, J.G., Kuo, I., Lulsdorf, M.M., Mallikarjuna, N., Kuo, J., and Siddique, K. H. M. 2006. Embryo rescue and plant regeneration in vitro of selfed chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild annual relatives. *Plant cell, tissue and organ culture*, 85 (2): 197-204.
- Cubero, J.I. 1981. Origin, taxonomy and domestication. In: Webb, C.; Hawtin, G. (Eds.), *Lentils*. CAB International, Slough, UK pp. 15-38.
- Cubero, J.I. 1987. Morphology of chickpea. In: Saxena, M.C. and Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK pp. 35-66.
- Donmez, A.A. 2011. *Cicer uludereensis* Dönmez: a new species of *Cicer* (chickpea) (*Fabaceae*) from around the Fertile Crescent, SE Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 35: 71-76.
- Doyle, J.J., Doyle, J.I. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Egan, A.N., Schlueter, J., Spooner, D.M. 2012. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot.* 99: 175-185.
- El-Rodeny, W., Kimura, M., Hirakawa, H., Sabah, A., Shirasawa, K., Sato, S., et al. 2014. Development of EST-SSR markers and construction of a linkage map in faba bean (*Vicia faba*). *Breeding Science*, 64 (3): 252-263.
- Erler, F., Ceylan, F.O., Erdemir, T., Toker, C. 2009. Preliminary results on evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions for resistance to *Callosobruchus maculatus*. *F. J. Insect Sci.* 9: 58.
- FAOSTAT 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gaur, P.M. and Gour, V.K. 2002. A gene producing one to nine flowers per flowering node in chickpea. *Euphytica*, 128 (2): 231-235.
- Gaur, R., Azam, S., Jeena, G., Khan, A.W., Choudhary, S., Jain, M., Yadav, G., Tyagi, A.K., Chattopadhyay, D., Bhatia, S. 2012. High-throughput SNP discovery and genotyping for constructing a saturated linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *DNA Research*, 19: 357-373.

- Garrison, E. and Marth, G. 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv. 1207.3907.
- Girardot, C., Scholtalbers, J., Sauer, S., Su, S., Furlong, E.E.M. 2016. Je, a versatile suite to handle multiplexed NGS libraries with unique molecular identifiers. *BMC Bioinformatics*, 17:419.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N., Balyan, H.S. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol. Genet. Genomics*, 270 (4): 315-23.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Mir, R.R. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*, 101: 5-18.
- Gupta, S. and Prasad, M. 2009. Development and characterization of genic SSR markers in *Medicago truncatula* and their transferability in leguminous and non-leguminous species. *Genome*, 52 (9): 761-771.
- Gupta, S., Nawaz, K., Parween, S., Roy, R., Sahu, K., Pole, A. K., Khandal, H., Srivastava, S.K.P., Chattopadhyay, D. 2017. Draft genome sequence of *Cicer reticulatum* L., the wild progenitor of chickpea provides a resource for agronomic trait improvement. *DNA Research*, 24 (1): 1-10.
- Harlan, J.R. and De Wet, J.M. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, pp. 509-517.
- Hulse, J.H. 1991. Nature, composition and utilization of grain legumes. In: Patencheru, A.P. (Ed.), *Uses of Tropical Legumes. Proceedings of a Consultants Meeting, 27-30 March 1989. ICRISAT Center, ICRISAT, India*, pp. 502-524.
- Huang, X., Kurata, N., Wei, X., Wang, Z.-X., Wang, A., Zhao, Q., et al. 2012. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, 490: 497-501.
- Iqbal, A., Ateeq, N., Khalil, I.A., Perveen, S. and Saleemullah, S. 2006. Physicochemical characteristics and amino acid profile of chickpea cultivars grown in Pakistan. *Journal of Foodservice*, 17 (2): 94-101.
- Jain, M., Misra, G., Patel, R.K. et al. 2013, A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant J.* 74: 715-29.
- Jaiswal, H.K., Singh, B.D., Singh, A.K. and Singh, R.M. 1986. Introgression of genes for yield and yield traits from *C. reticulatum* into *C. arietinum*. *International Chickpea Newsletter*, 14: 5-8.
- Knights, E.J. 1993. Fasciation in chickpea: genetics and evaluation. *Euphytica*, 69 (3): 163-166.
- Koseoglu, K., Adak, A., Sari, D., Sari, H., Ceylan, F. O., Toker, C. 2017. Transgressive segregations for yield criteria in reciprocal interspecific crosses between *Cicer arietinum* L. and *C. reticulatum* Ladiz. *Euphytica*, 213: 116.
- Ladizinsky, G. 1975. A new *Cicer* from Turkey. *Notes of the Royal Botanical Garden, Edinburgh*, 34: 201-202.
- Ladizinsky, G., and Adler, A. 1976a. The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica*, 25 (1): 211-217.

- Ladizinsky, G. and Adler, A. 1976b. Genetic relationships among annual species of *Cicer* L. *Theor Appl Genet.* 48:197-203.
- Ladizinsky, G., Pickersgill, B. and Yamamoto, K. 1988. Exploitation of wild relatives of the food legumes. In: Summerfield, R.J. (Ed.), *World crops: Cool season food legumes. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 5. Dordrecht Springer Netherlands, pp. 967-978.
- Ladizinsky, G. and Abbo, S. 2015. *The search for wild relatives of cool season legumes.* Springer International Publishing, Switzerland, pp. 103.
- Lake, L., Li, Y., Casal, J.J. and Sadras, V.O. 2016. Negative association between chickpea response to competition and crop yield: phenotypic and genetic analysis. *Field Crops Res.* 196: 409-417.
- Langmead, B. and Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nature Methods*, 9: 357-359.
- Lee, C-Y., Chiu, Y-C., Wang, L-B., Kuo, Y-L., Chuang, E.Y., Lai, L-C., Tsai, M-H. 2013. Common applications of next-generation sequencing Technologies in genomic research. *Transl Cancer Res*, 2 (1): 33-45.
- Lichtenzveig, J., Scheuring, C., Dodge, J., Abbo, S., Zhang, H.B. 2005. Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 110 (3): 492-510.
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., et al. 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat. Genet.* 46: 1220-1226.
- Liu, K., Muse, S.V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21 (9): 2128-2129.
- Liu, Z.P., Chen, T.L., Ma, L.C.; Zhao, Z.G.; Zhao, P.X., Nan, Z.B.; Wang, Y.R. 2013. Global Transcriptome sequencing using the Illumina platform and the development of EST-SSR markers in autotetraploid alfalfa. *Plos One*, 8 (12).
- Liu, G.S., Zhang, Y.G., Tao, R., Fang, J.G., Dai, H.Y. 2014. Identification of apple cultivars on the basis of simple sequence repeat markers. *Genet. Mol. Res.* 13: 7377-7384.
- Liu, C.Y.; Fan, B.J, Cao, Z.M., Su, Q.Z., Wang, Y., Zhang, Z.X., Wu, J., Tian, J. 2016. A deep sequencing analysis of transcriptomes and the development of EST-SSR markers in mungbean (*Vigna radiata*). *Journal of Genetics*, 95 (3): 527-535.
- Lulsdorf, M., Mallikarjuna, N., Clarke, H., and Tar'an, B. 2005. Finding solutions for interspecific hybridization problems in chickpea (*Cicer arietinum* L.). 4th International Food Legumes Research Conference, New Delhi, India.
- Mace, E.S., Tai, S., Gilding, E.K., Li, Y., Prentis, P.J., Bian, L., et al. 2013. Whole genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa's indigenous cereal crop sorghum. *Nat. Commun.* 4: 2320.
- Madabhushi, R.S. 1998. Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions. *Electrophoresis*, 19: 224-230.

- Mallikarjuna, N. 1999. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. *Euphytica*, 110 (1): 1-6.
- Mardis, E.R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9: 387-402.
- Mardis, E.R. 2017. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat. Protoc.* 12 (2): 213-218.
- Muehlbauer, F.J. and Singh, K.B. 1987. Genetics of chickpea. In: Saxena, M.C., Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB Int, Wallingford, pp. 99-125.
- Muehlbauer, F.J. and Tullu, A. 1997. *Cicer arietinum* L. *New CROP FactSHEET*, 6.
- Mishra, R.K., Gangadhar., B.H., Nookaraju, A., Kumar, S., Park, S.W. 2012. Development of EST-derived SSR markers in pea (*Pisum sativum*) and their potential utility for genetic mapping and transferability. *Plant Breeding*, 131: 118-124.
- Moose, S.P. and Mumm, R.H. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol.* 147: 969-977.
- Nayak, S.N., Zhu, H.Y., Varghese, N., Datta, S., Choi, H.K., Horres, R., Jungling, R., Singh, J., Kishor, P.B.K., Sivaramakrishnan, S., et al. 2010. Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 1415-1441 .
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, p. 512.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Natur.* 106: 283-292.
- Ocampo, B., Venora, G., Errico, A., Singh, K.B. and Saccardo, F. 1992. Karyotype analysis in the genus *Cicer*. *J Genet Breed.* 46: 229–240.
- Ohri, D., and Pal, M. 1991. The origin of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Karyotype and nuclear DNA amount. *Heredity*. 66: 367-372.
- Ozturk, M., Duran, A., Erdoğan, E.H. 2011. *Cicer floribundum* var. *amanicola* (*Fabaceae*), a new variety from south Anatolia, Turkey. *Biodicon*. 3: 44-51.
- Parida, S.K., Verma, M., Yadav, S.K., Ambawat, S., Das, S., Garg, R., Jain, M. 2015. Development of genome-wide informative simple sequence repeat markers for large-scale genotyping applications in chickpea and development of web resource. *Front. Plant Sci.* 21 (6): 645.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pfaff, T. and Kahl, G. 2003. Mapping of gene-specific markers on the genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 269 (2): 243-251.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. 1987. A system for rapid DNA

- sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238 (4825): 336-41.
- Pundir, R.P.S., Rao, N.K. and Van der Maesen, L.J.G. 1981. Induced autotetraploidy in chickpeas. *International Chickpea Newsletter*, 4: 4-8.
- Pundir, R.P.S., Rao, N.K. and Van der Maesen, L.J.G. 1983. Induced autotetraploidy in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 65 (2): 119-122.
- Pundir, R.P.S., Reddy, K.N. and Mengesha, M.H. 1988. ICRISAT chickpea germplasm catalog: evaluation and analysis, ICRISAT, India, pp. 94.
- Pundir, R.P.S., Mengesha, M.H. and Reddy, K.N. 1990. Leaf types and their genetics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, 45 (3): 197-200.
- Pundir, R.P.S. and Mengesha, M.H. 1995. Cross compatibility between chickpea and its wild relative, *Cicer echinospermum* Davis. *Euphytica*, 83 (3): 241-245.
- Purwoko, D., Cartealy, I.C., Tajuddin, T., Dinarti, D., Sudarsono, S. 2019. SSR identification and marker development for sago palm based on NGS genome data. *Breeding Science*, 69: 1-10.
- Rajesh, P.N., Tullu, A., Gil, J., Gupta, V., Ranjekar, P. and Muehlbauer, F. 2002. Identification of an STMS marker for the double-podding gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 105 (4): 604-607.
- Robertson, L.D., Singh, K.B., Ocampo, B. 1995. A catalog of annual wild *Cicer* species. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria, pp. 171.
- Robertson, L.D., Ocampo, B. and Singh, K.B. 1997. Morphological variation in wild annual *Cicer* species in comparison to the cultigen. *Euphytica*, 95 (3): 309-319.
- Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386.
- Santra, D.K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W.J., and Muehlbauer, F.J. 2000. Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea. *Crop Science*, 40 (6): 1606-1612.
- Saha, M.C., Cooper, J.D., Mian, M.A., Chekhovskiy, K., May, G.D. 2006. Tall fescue genomic SSR markers: Development and transferability across multiple grass species. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1449-1458.
- Samineni, S., Kamatam, S., Thudi, M., Varshney, R.K. and Gaur, P.M. 2016. Vernalization response in chickpea is controlled by a major QTL. *Euphytica*, 207 (2): 453-461.
- Saxena, M.C. 1987. Agronomy of Chickpea. In: Saxena, M.C. and Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 207-232.
- Sefera, T., Abebie, B., Gaur, P.M., Assefa, K., Varshney, R.K. 2011. Characterisation and genetic diversity analysis of selected chickpea cultivars of nine countries using simple sequence repeat (SSR) markers. *Crop & Pasture Science*, 62: 177-187.

- Singh, K.B. 1987. Chickpea breeding. In: Saxena, M.C., Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 127-162.
- Singh, P. 1991. Influence of water-deficits on phenology, growth and dry-matter allocation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Field Crops Research*, 28 (1-2): 1-15.
- Singh, K.B. and Ocampo, B. 1993. Interspecific hybridization in annual *Cicer* species. *Journal of Genetics and. Breeding*, 47: 199-204
- Singh, K.B. and Ocampo, B. 1997. Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 95 (3): 418-423.
- Singh, K.B, Ocampo, B. and Robertson, L.D. 1998. Diversity for abiotic and biotic stress resistance in the wild annual *Cicer* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45 (1): 9-17.
- Singh, R., Durga Prasad, C., Singhal, V, Randhawai G.J. 2003. Assessment of genetic diversity in chickpea cultivars using RAPD, AFLP and STMS markers. *Journal of Genetics & Breeding*, 57: 165-174.
- Singh, S., Gumber, R.K., Joshi, N., Singh, K. 2005. Introgression from wild *Cicer reticulatum* to cultivated chickpea for productivity and disease resistance. *Plant Breeding*, 124 (5): 477-480.
- Singh, R., Singhal, V., Randhawa, G.J. 2008. Molecular analysis of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using AFLP and STMS markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17: 167-171.
- Singh, M., Kumar, K., Bisht, I.S., Dutta, M., Rana, M.K., Rana, J.C., Bansal, K.C., Sarker, A. 2015. Exploitation of wild annual *Cicer* species for widening the gene pool of chickpea cultivars. *Plant Breeding*, 134: 186-192.
- Smykal, P., Coyne C.J., Ambrose M.J., Maxted N., Schaefer, H., Blair, M.W., Berger, J., Greene, S.L., Nelson, M.N., Besharat, N., et al. 2015. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34: 43-104.
- Srinivasan S., Gaur P.M., Chaturvedi S.K. and Rao B.V. 2006. Allelic relationships of genes controlling number of flowers per axis in chickpea. *Euphytica*, 159: 35-41.
- Sudupak, M.A. 2013. SSR-based genetic diversity assessment of Turkish chickpea varieties. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27: 4087-4090.
- Suresh, S., Park, J.H., Cho, G.T., Lee, H.S., Baek, H.J., Lee, S.Y. Chung, J.W. 2013. Development and molecular characterization of 55 novel polymorphic cdna SSR markers in faba bean (*Vicia faba* L.) using 454 pyrosequencing. *Molecules*, 18: 1844-1856.
- Tanno, K. I. and Willcox, G. 2006. The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium BP. *Vegetation History and Archaeobotany*, 15 (3): 197-204.
- Tangphatsornruang, S. et al., 2009. Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *BMC Plant Biol.* 9: 137.

- Thompson, J.P., Reen, R.A., Clewett, T.G., Sheedy, J.G., Kelly, A.M., Gogel, B.J., Knights, E.J. 2011. Hybridisation of Australian chickpea cultivars with wild *Cicer* spp. increases resistance to root-lesion nematodes (*Pratylenchus thornei* and *P. neglectus*). *Australasian Plant Pathol.* 40: 601-611.
- Thomson, M.J. 2014. High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breed. Biotechnol.* 2: 195-212.
- Thudi, M., Bohra, A., Nayak, S.N., Varghese, N., Shah, T.M., Penmetsa, R.V., Thirunavukkarasu, N., Gudipati, S., Gaur, P.M., Kulwal, P.L., et al. 2011. Novel SSR markers from BAC-end sequences, DArT arrays and a comprehensive genetic map with 1,291 marker loci for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plos One*, 6.
- Thudi, M., Khan, A. W., Kumar, V., Gaur, P. M., Katta, K., Garg, V. et al. 2016. Whole genome re-sequencing reveals genome-wide variations among parental lines of 16 mapping populations in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biol.* 16: 10.
- Toker, C. 2005. Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild *Cicer* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52 (1): 1-5.
- Toker, C., Ulger, S. and Cagırgan, M.I. 2006. Endogenous hormone variations in annual wild *Cicer* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53 (1): 171-177.
- Toker, C., Lluch, C., Tejera, N.A., Serraj, R. and Siddique, K.H.M. 2007. Abiotic stresses. In: Yadav, S.S., Redden, R., Chen, W. Sharma, B. (Eds.), Chickpea breeding and management, CAB International, Wallingford, UK, pp. 474-496.
- Toker, C. 2009. A note on the evolution of kabuli chickpeas as shown by induced mutations in *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56 (1): 7-12.
- Toker, C., Ikten, C., Ceylan, F.O., Bolucek, E. and Uzun, B. 2013. Genetic relationship between transgressive segregations and genetic distance based on SSR markers in *Cicer* species. *Current opinion in biotechnology*, 24: 38-39.
- Toker, C., Uzun, B., Ceylan, F.O., Ikten, C. 2014a. Chickpea. In: Pratap, A., Kumar, J. (Eds.), Alien gene transfer in crop plants. vol 2., Achievements and impacts. Springer, Berlin, pp. 121-152.
- Toker, C., Berger, J., Abdullah, K., Abdulkadir, A., Canan, C., Bekir, B., Penmetsa, R.V., von Wettberg, E.J., Cook, D.R. 2014b. *Cicer reticulatum* Ladizinsky, progenitor of the cultivated chickpea (*C. arietinum* L.). *Legume Perspective*, 5: 26-27.
- TTSM 2019.<http://www.tarim.gov.tr/BUGEM/TTSM/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=85>. [Son erişim tarihi: 27.12.2019].
- Upadhyaya, H.D., Furman, B.J., Dwivedi, S.L., Udupa, S.M., Gowda, C.L.L., Baum, M., Crouch, J.H., Buhariwalla, H.K., Singh, S. 2006. Development of a composite collection for mining germplasm possessing allelic variation for beneficial traits in chickpea. *Plant Genet Res.* 4: 13-19.
- Upadhyaya, H., Dwivedi, S., Baum, M., Varshney, R., Udupa, S., Gowda, C., Hoisington, D., Singh, S. 2008. Genetic structure, diversity and allelic richness

- in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biol.* 8: 106.
- van der Maesen, L.J.G. 1972. *Cicer* L., a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation: Meded. Landbouwhoges. Wageningen, 72 (10) 342 p.
- van der Maesen, L.J.G., 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea. In: Saxena, M.C. and Singh, K.B. (Eds.), *The Chickpea*. CAB International, UK, pp. 11-34.
- van der Maesen, L.J.G., Maxted, N., Javadi, F., Coles, S., Davies, A.M.R. 2007. Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. In: Yadav, S.S., Redden, B., Chen, W., Sharma, B. (Eds.), *Chickpea breeding and management*. CAB International, Wallingford, pp. 14-16.
- Van Oss, R., Abbo, S., Eshed, R., Sherman, A., Coyne, C. J., Vandemark, G. J., Zhang H.B. and Peleg, Z. 2015. Genetic relationship in *Cicer* Sp. expose evidence for gene flow between the cultigen and its wild progenitor. *PloS one*, 10 (10): e0139789.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. 2005a. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*. 23: 48-55.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. 2005b. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.* 10: 621-630.
- Varshney, R., Tuberosa, R. 2007. Genomics-assisted crop improvement: an overview. In: Varshney, R.K., Tuberosa, R. (Eds.), *Genomic assisted crop improvement: genomics approaches and platforms*. vol I. Springer, New York, pp. 1-12.
- Varshney, R.K., Song, C., Saxena, R.K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A.G. et al. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum* L.) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol.* 31: 240-246.
- Verma, M., Ravi, M., and Sandhu, J.S. 1995. Characterization of interspecific cross *Cicer arietinum* L. $\times$ *C. judaicum* (Boiss). *Plant Breeding*, 114: 549-551.
- Verma, P., Chandra, A., Roy, A.K., Malaviya, D.R., Kaushal, P., Pandey, D., Bhatia, S. 2015. Development, characterization and cross-species transferability of genomic SSR markers in berseem (*Trifolium alexandrinum* L.), an important multi-cut annual forage legume. *Molecular Breeding*, 35.
- Wang, Z., Fang, B., Chen, J., Zhang, X., Luo, Z., Huang, L., Chen, X., Li, Y. 2010. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *BMC Genom.* 11: 726-739.
- Wang, M., Yu, Y., Haberer, G., Marri, P.R., Fan, C., Goicoechea, J.L., et al. 2014. The genome sequence of African rice (*Oryza glaberrima*) and evidence for independent domestication. *Nat. Genet.* 46: 982-988.
- Winter, P., Pfaff, T., Udupsa, S. M., Huttel, B., Sharma, P. C., Sahi, S., Arreguin Espinoza R., Weigand F., Meuhlbauer F.J. and Kahl, G. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Molecular and General Genetics MGG*, 262 (1): 90-101.

- Winter, P., Benko-Iseppon, A.M., Huttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnate, G., Pfaff, T., Tekeoglu, M., Santra, D., Sant V.J. et al. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 (7): 1155-1163.
- Woods, J.A. and Grusak, M.A. 2007. Nutritional value of chickpea. In: Yadav. S.S., Redden R.J., Chen W., Sarmah B. (Eds.), Chickpea Breeding and Management. CAB International, Oxfordshire, UK, pp. 101-142.
- Yang, T., Fang, L., Zhang, X.Y., Hu, J.G., Bao, S.Y., Hao, J.J., Li, L., He, Y.H., Jiang, J.Y., Wang, F., Tian, S.F., Zong, X.X. 2015. High-throughput development of SSR markers from pea (*Pisum sativum* L.) based on next generation sequencing of a purified chinese commercial variety. *Plos One*, 10.
- Zhang, M., Mao, W., Zhang, G., Wu, F., 2014. Development and characterization of polymorphic EST-SSR and genomic SSR markers for Tibetan annual wild barley. *PLoS One*, 9: e94881.
- Zhuang, X.F., McPhee, K.E., Coram, T.E., Peever, T.L., Chilvers, M.I. 2013. Development and characterization of 37 novel EST-SSR markers in *Pisum sativum* (Fabaceae). *Applications in Plant Sciences*, 1 (1): 1200249.
- Zhou, X.J., Dong, Y., Zhao, J.J., Huang, L., Ren, X.P., Chen, Y.N. et al. 2016. Genomic survey sequencing for development and validation of single-locus SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Genomics*, 17.

7. EKLER

Ek-1. CA 2969 ve AWC 602 arasında polimorfik olan SSR bölgelerinin genomdaki lokasyonları

Sayı	Genom lokasyonu
1	NC_021165.1:19,011,134-19,011,210
2	NC_021165.1:55,753,401-55,753,477
3	NC_021165.1:19,011,133-19,011,211
4	NC_021163.1:889,577-889,653
5	NC_021163.1:994,011-994,087
6	NC_021163.1:1,322,967-1,323,044
7	NC_021163.1:7,315,917-7,315,993
8	NC_021163.1:13,721,274-13,721,350
9	NC_021163.1:25,727,833-25,727,909
10	NC_021163.1:32,040,766-32,040,842
11	NC_021163.1:47,883,120-47,883,196
12	NC_021166.1:709,972-710,050
13	NC_021166.1:3,754,394-3,754,472
14	NC_021166.1:4,508,947-4,509,025
15	NC_021166.1:5,702,105-5,702,183
16	NC_021166.1:7,220,178-7,220,256
17	NC_021166.1:12,063,993-12,064,071
18	NC_021166.1:25,623,108-25,623,186
19	NC_021166.1:34,024,156-34,024,235
20	NC_021166.1:40,487,098-40,487,176
21	NC_021161.1:514,664-514,710

22	NC_021161.1:12,151,893-12,151,939
23	NC_021161.1:13,690,483-13,690,529
24	NC_021161.1:20,110,687-20,110,733
25	NC_021161.1:22,768,737-22,768,783
26	NC_021161.1:30,049,660-30,049,706
27	NC_021167.1:3,762,999-3,763,051
28	NC_021167.1:4,183,287-4,183,339
29	NC_021167.1:5,072,765-5,072,817
30	NC_021167.1:7,847,913-7,847,965
31	NC_021167.1:10,455,187-10,455,239
32	NC_021162.1:822,924-823,003
33	NC_021162.1:7,250,162-7,250,240
34	NC_021162.1:16,688,457-16,688,535
35	NC_021162.1:20,328,085-20,328,163
36	NC_021162.1:24,316,422-24,316,500
37	NC_021162.1:24,874,026-24,874,104
38	NC_021162.1:27,746,809-27,746,887
39	NC_021162.1:29,532,448-29,532,526
40	NC_021162.1:30,896,220-30,896,298
41	NC_021162.1:36,420,939-36,421,017
42	NC_021164.1:1,077,194-1,077,272
43	NC_021164.1:207,413-207,491
44	NC_021164.1:5,819,504-5,819,583
45	NC_021164.1:31,121,065-31,121,143
46	NC_021164.1:31,568,270-31,568,348

47	NC_021164.1:33,184,427-33,184,505
48	NC_021164.1:33,645,811-33,645,889
49	NC_021164.1:36,678,457-36,678,535
50	NC_021164.1:37,082,804-37,082,882
51	NC_021160.1:4,181,347-4,181,425
52	NC_021160.1:2,837,886-2,837,964
53	NC_021163.1:5,725,734-5,725,811
54	NC_021163.1:7,076,283-7,076,359
55	NC_021163.1:7,981,576-7,981,652
56	NC_021163.1:9,032,876-9,032,952
57	NC_021163.1:9,529,177-9,529,253
58	NC_021163.1:15,955,538-15,955,614
59	NC_021163.1:19,867,493-19,867,569
60	NC_021163.1:21,156,335-21,156,411
61	NC_021163.1:22,848,713-22,848,789
62	NC_021163.1:23,307,318-23,307,394
63	NC_021163.1:31,585,278-31,585,354
64	NC_021163.1:37,150,472-37,150,548
65	NC_021163.1:37,259,870-37,259,946
66	NC_021163.1:41,182,633-41,182,709
67	NC_021163.1:43,779,977-43,780,053
68	NC_021166.1:1,910,613-1,910,691
69	NC_021166.1:4,099,028-4,099,106
70	NC_021166.1:5,706,723-5,706,801
71	NC_021166.1:7,471,500-7,471,578

72	NC_021166.1:11,523,580-11,523,658
73	NC_021166.1:12,303,926-12,304,004
74	NC_021166.1:13,863,019-13,863,097
75	NC_021166.1:19,621,716-19,621,794
76	NC_021166.1:20,574,550-20,574,628
77	NC_021166.1:21,624,275-21,624,353
78	NC_021166.1:24,396,978-24,397,056
79	NC_021166.1:26,072,281-26,072,359
80	NC_021166.1:30,200,833-30,200,911
81	NC_021166.1:40,648,303-40,648,381
82	NC_021160.1:6,684,419-6,684,497
83	NC_021160.1:7,131,213-7,131,291
84	NC_021160.1:11,195,289-11,195,367
85	NC_021160.1:12,175,024-12,175,102
86	NC_021160.1:18,200,935-18,201,013
87	NC_021160.1:40,552,336-40,552,414
88	NC_021164.1:281,902-281,980
89	NC_021164.1:2,995,865-2,995,943
90	NC_021164.1:16,236,144-16,236,222
91	NC_021164.1:29,095,390-29,095,468
92	NC_021164.1:29,559,396-29,559,474
93	NC_021164.1:30,562,238-30,562,316
94	NC_021164.1:31,932,641-31,932,719
95	NC_021164.1:31,986,207-31,986,285
96	NC_021164.1:33,131,800-33,131,878

97	NC_021164.1:34,818,874-34,818,952
98	NC_021164.1:34,948,969-34,949,047
99	NC_021164.1:35,203,145-35,203,223
100	NC_021164.1:37,858,074-37,858,152
101	NC_021164.1:48,025,548-48,025,626
102	NC_021162.1:4,927,704-4,927,782
103	NC_021162.1:9,303,043-9,303,121
104	NC_021162.1:17,829,087-17,829,165
105	NC_021162.1:23,197,908-23,197,986
106	NC_021162.1:28,705,682-28,705,760
107	NC_021162.1:30,278,651-30,278,729
108	NC_021162.1:30,896,220-30,896,298
109	NC_021162.1:31,844,347-31,844,425
110	NC_021162.1:32,537,161-32,537,239
111	NC_021162.1:34,636,568-34,636,646
112	NC_021162.1:35,051,936-35,052,014
113	NC_021162.1:38,459,977-38,460,055
114	NC_021167.1:6,039,069-6,039,121
115	NC_021167.1:7,379,226-7,379,278
116	NC_021167.1:8,740,955-8,741,007
117	NC_021167.1:9,199,921-9,199,973
118	NC_021167.1:13,198,898-13,198,944
119	NC_021161.1:686,298-686,344
120	NC_021161.1:981,422-981,468
121	NC_021161.1:1,135,031-1,135,077

122	NC_021161.1:2,111,843-2,111,889
123	NC_021161.1:2,427,830-2,427,876
124	NC_021161.1:3,259,792-3,259,838
125	NC_021161.1:5,908,497-5,908,543
126	NC_021161.1:7,855,409-7,855,455
127	NC_021161.1:8,201,814-8,201,860
128	NC_021161.1:13,745,012-13,745,058
129	NC_021161.1:17,830,784-17,830,830
130	NC_021161.1:21,866,699-21,866,745
131	NC_021161.1:28,104,600-28,104,646
132	NC_021161.1:34,747,628-34,747,674
133	NC_021161.1:35,862,849-35,862,895

Ek-2. Çalışmada kullanılan markerlere ait primer dizaynı

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence		Primer3Manager	Help
		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	CTTCCACGCGAGAGAAAAAC		
Start: 10	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGGccaattgaaaagaaaa		
Start: 185	Length: 20 bp	Tm: 58.3 °C	GC: 30.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
Product Size: 176 bp	Pair Any: 3.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TAACCCCTATC	TTCCACGCGA	GAGAAAAACA CTTATAGGCA TTAATTAATT
51	GTCACATTGT	TTGCAAGAAA	ACTAACTATT TATGCAACTA TTGTCCATTC
101	GTATACTCAA	GACTAGCTTC	ATATATATAA CACCTTCatc aactctctct
151	ctctctctct	ttaac	ttttc ttttcaaatt ggCCAtagtt gaca

SSR1 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence		Primer3Manager	Help
		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TTGCCCTGATTTGAGATGTG		
Start: 28	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 45.0 % ANY: 3.0 SELF: 1.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TTGGAAATTC AACCTAcacaaaaa		
Start: 185	Length: 24 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 29.2 % ANY: 5.0 SELF: 0.0
Product Size: 158 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	CAATTGACTA	GCTTCCAAGA	ATAAAGATTG CCCTGATTTG AGATGTGTAA
51	ACTTTTAA	TCTTgcactt	atgttttata tatatatata tatgtctttT
101	TTTATCCCTA	ACTTTTTCCT	GGACAACTCT TCTAAGTTTT CATCCCATAC
151	ggatgctcta	at	tttttgtgT AGGTTGAATT TCCAATT
☐ Select all Primers			

SSR2 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	CTTCCACGCGAGAGAAAAAC		
Start: 3	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGGccaatttgaaaagaaaa		
Start: 178	Length: 20 bp	Tm: 58.3 °C	GC: 30.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
Product Size: 176 bp		Pair Any: 3.0	Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	ATCTTCCACG	CGAGAGAAAA	ACACTTATAG GCATTAATTA ATGTGCACAT
51	TGTTTGCAAG	AAACTAACT	ATTTATGCAA CTATTGTCCA TTCGTATACT
101	CAAGACTAGC	TTCATATATA	TAACACCTTC Atcaactctc tctctctctc
151	tctttaac	ttcttttcaa	attggCCAta gttgacattt tttttttggt
201	aatggCCATA	TATAGTGGAC	ATTTAATAGC CACTTGCA
☐ Select all Primers			

SSR3 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGCCAGTTTTTAACAGCATGA		
Start: 25	Length: 21 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 38.1 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CAGCATTATCTGCAAAAACAAA		
Start: 188	Length: 22 bp	Tm: 58.0 °C	GC: 31.8 % ANY: 5.0 SELF: 0.0
Product Size: 164 bp		Pair Any: 6.0	Pair End: 3.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	TTTGGAAGCA	TATAATTGTG	TTATTGCCAG TTTTTAACAG CATGATgtgt
51	atattatttta	cattgtgtTA	CCTGTCTGCT Ggtaaatttc atatatatat
101	atatatatat	atattaagtt	atAAGAATCT CGTTTTAGTG TTGTTCTTGA
151	TTTATATCTA	CTTATGTTTG	TTTTTGCA TAATGCTGCT G
☐ Select all Primers			

SSR4 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	tccTTGTTTAAATTCCTCCATTG		
Start: 24	Length: 23 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 34.8 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGAGACTCGACGCATTTAAGAA		
Start: 187	Length: 22 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0
Product Size: 164 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	TGTGAAGtct	ttttgttttt	cat tccTTGT TTTAATTCCT CCATTGactt
51	tatttacttt	ttgtaGTTCC	ATATTGCATT TGCAGTGTAC ATCAACTAAT
101	TTAGGccaat	gaagaaaaaa	attaaaaatt aaatgttata tatatatatt
151	gtctcCACTA	CTCAAT TCCTT	AAATGCGTCG AGTCTCATTA AGTTATGTTA
201	GTCTCACATA	ATTACTGGA	
☐ Select all Primers			

SSR5 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TTCATGATGAGTGAATGGATGAG		
Start: 6	Length: 23 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 39.1 % ANY: 7.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	AAATGGTGCACGTGTTTGT		
Start: 172	Length: 20 bp	Tm: 59.0 °C	GC: 40.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
Product Size: 167 bp	Pair Any: 3.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	CATTT TTCAT	GATGAGTGAA	TGGATGAGTA TCTTGTGTG AATGTTATCT
51	TATTCAACCT	AGGTACACCT	ATAGCTTCCT AGCTAGACCT ATTTCCGTAT
101	CTCATACTTT	TCAGTTTAc	ttcattcata tatatatact aactTCTAAT
151	CT AACAAACA	CGTGCACCAT	TTTGTCTTAT ATatatgcat tatgcattat
201	tATTTCCGGTG	ATTTTATCAA	TCAATGACTA TAAActcttt taatatatta
251	cttgTAAAAAT	TATCGTTTTT	GATACATTAA TTTGCTACTC CATCATTAAT
301	GAAATTATAG	TGAATATATA	GAGTATTTTT GAAA
☐ Select all Primers			

SSR6 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGTGCTGAGAAATTAAGAATGA		
Start: 7	Length: 25 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 28.0 % ANY: 5.0 SELF: 1.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	gcAACCAGACAAAACACGAG		
Start: 237	Length: 20 bp	Tm: 59.3 °C	GC: 50.0 % ANY: 2.0 SELF: 2.0
Product Size: 231 bp	Pair Any: 5.0		Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TTAAATGTT	GCTGAGAAAT	TAAAGAATG AAACACTATa acattattaa
51	ataaaagGCT	ACTAATTAAT	GTGTCAAAA AATTGTACT AATGTTAATA
101	TTGAATGATG	TGTGTGGTTC	ACAATTTCAA AAAGAATGGA AAATTGATGG
151	ATAAGAGTTG	AGTGCAGTAG	TAGAAGTAGC CCATGAGAGA GAGTGTAGGT
201	GCATGCCTCG	ACCTTTCTC	GTGTTTGTG TGGTTgcaat tcaatttat
☐ Select all Primers			

SSR7 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	CCAAATCCACTCCACCAGAT		
Start: 125	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 50.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	ATGGGTGGAACAGGTGAAAC		
Start: 278	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 50.0 % ANY: 4.0 SELF: 1.0
Product Size: 154 bp	Pair Any: 4.0		Pair End: 2.0
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TCTATGACCC	ATAAAAACAA	GTAAAAGAAa tcatataaaa caaaattggt
51	cCAAGTATCT	GCGACTGCTG	ATGCCATGTA ATAAGTTACT GTGTAAAAAT
101	AGTCAATGGT	CCTTGAAAAG	GAAGCCAAAT CCACTCCACC AGATTTTCAG
151	ATACAAACAA	CGAGAACcat	atatcatata tcatatataat atattacact
201	caaAGGATCT	GCTTGGGGTA	TGAACCTATG AAGGATGGGT GCATACAACA
251	GGAAAGCAGT	TTCACCTGTT	CGACCCATAT GGACATGGAA CTTGAACCAA
301	AAGCAACCTT	GAAG	
☐ Select all Primers			

SSR8 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	CGTTTGTTGTTTTCATACACG		
Start: 6	Length: 22 bp	Tm: 58.2 °C	GC: 36.4 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CACACAAATCTAGTCCCTTGAGA		
Start: 159	Length: 23 bp	Tm: 58.4 °C	GC: 43.5 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
Product Size: 154 bp	Pair Any: 6.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	GTAAACGTTT	GTTTGTTTTC	ATACACGTAA
51	AAAGTTAAGA	Caagaatatt	atatttattt
101	agaagtttTA	TATGGTGGGA	CCCGCCAAAA
151	ATTGTGTGT	AGAAAAAGTA	GAT
☐ Select all Primers			

SSR10 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TCTCACAGCAGTGGTCCTCTT		
Start: 8	Length: 21 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 52.4 % ANY: 6.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	AATGTCAAATTGAAGCCACCT		
Start: 160	Length: 21 bp	Tm: 58.6 °C	GC: 38.1 % ANY: 7.0 SELF: 0.0
Product Size: 153 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	AAGATTATCT	CACAGCAGTG	GTCCTCTTAA
51	CTCCAGTTTC	ACCTTCTGAA	ATGGATGATT
101	GCTTTTACAC	ctctctctct	atctctctct
151	ATTTGACATT	AAAACAAAAA	CCTTAACAGA
201	tttggttttt	gtttttgttt	ttcattaata
☐ Select all Primers			

SSR11 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	CGCAGTGTGCAGAACAGAGA		
Start: 17	Length: 20 bp	Tm: 61.4 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 1.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGAGAAAAGTGAAAAATGGAAGA		
Start: 180	Length: 23 bp	Tm: 58.0 °C	GC: 30.4 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
Product Size: 164 bp	Pair Any: 3.0		Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	AATTCATATA	AACGCGCGCA	GTGTGCAGAA CAGAGAGAGT GTAACGCCGG
51	TAACTTCTT	CAGTTCACCA	TGACGGACGG TCATCTCTTC AACAATATTA
101	CCCTCGGTGG	CCGCGGCGGC	ACTGTaactt tctctctctc tctctctctc
151	tctagaaTCT	TCCATTTTTC	ACTTTTCTCA G
☐ Select all Primers			

SSR 12 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	GAAGTTGAACACAGCCTCgtt		
Start: 3	Length: 21 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 47.6 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CAGAAAGAAGGACCAAAAtgtaa		
Start: 241	Length: 24 bp	Tm: 58.8 °C	GC: 33.3 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
Product Size: 239 bp	Pair Any: 3.0		Pair End: 2.0
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	tAGAAGTTGA	ACACAGCCTC	gttatcatatt taatttctat attactCTCTCT
51	TAACTAAAC	TATCTTATGA	Ctatctttta tatatagata tgaagtgaca
101	aattaatgaa	ttttgATTGC	ATCTACGTAA AACAATATTT CAgtctaatt
151	atatatatat	aatttgtagg	tttaattgca gtttttagtat ctttatatttt
201	gttcattttt	taaaatccta	caATTTTGGT CCTTCTTTCT G
☐ Select all Primers			

SSR13 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	GATCCTATGACGGCCAAGAT		
Start: 1	Length: 20 bp	Tm: 59.0 °C	GC: 50.0 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CAATGTGGCACTAGAATAGCTG		
Start: 179	Length: 22 bp	Tm: 57.6 °C	GC: 45.5 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 179 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	GATCCTATGA	CGGCCAAGAT	ATGTATGCTG GAGAGAAGAT TGTTCCTATC
51	Aaggtctctc	tctctctctc	tctctctctc tatctatCTC TTTACCATAC
101	TGGAATTTTA	ACTAATTACT	AGTCTTATGC TATTTACTAC AAACACTGT
151	TAAATAGCAG	CTATTCTAGT	GCCACATTGT ACTCTTATGT AATTTTCGAA
201	ATTAGAGGGT		
☐ Select all Primers			

SSR14 markerine ait primer dizaynı

Pair 2:			
☐ Left Primer 2:	Primer_1_F		
Sequence:	GATGAATTGCAATGCCCACT		
Start: 30	Length: 20 bp	Tm: 60.9 °C	GC: 45.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0
☐ Right Primer 2:	Primer_1_R		
Sequence:	TGAGACCATACTTTTGATCG		
Start: 181	Length: 21 bp	Tm: 58.8 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
Product Size: 152 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			

SSR15 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TTAGGCACACTTCCCATCAA		
Start: 40	Length: 20 bp	Tm: 59.1 °C	GC: 45.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	acccCACTTGTGATTTTGC		
Start: 189	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 45.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
Product Size: 150 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	ATCAGCgtaa	tttaaatatt	gaacAAACAA ACCATCCAGT TAGGCACACT
51	TCCCATCAAC	CATTCTTCTG	CTGTAATTTA Caagttgata tatatataga
101	acAGTTTGG	ACACAtgaaa	attattagtt ttgctTTTC TGATGGGTCG
151	TTGTAAAAA	TAAGACCGTG	CAAAAATCAC AAGTGgggta taatt
☐ Select all Primers			

SSR16 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	tcattccTATTTTGTGTATAAAATCGT		
Start: 59	Length: 27 bp	Tm: 58.5 °C	GC: 25.9 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGTTATTTTAGGATTTGTCAAGGTT		
Start: 287	Length: 25 bp	Tm: 57.4 °C	GC: 28.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
Product Size: 229 bp		Pair Any: 6.0	Pair End: 2.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	atttaaatac	GTCAAAGAAA	GACTTTATAA AGAGATGGaa acacaaataa
51	ttattttattc	atccTATTTT	TGTGTATAAA ATCGTTAAAT TAACTTTATG
101	TCTATCTTTT	TTCTAGCATG	Agggaaaaaa aagagagaga aatgaGAGAC
151	TACAAATCCT	CAAAAATAC	ATGTCTTTTA TTGAATAGAA TCTATTGTTT
201	ATTTGTCTTT	ATCtactatt	tttctatttt taatatttga ttctTCATCA
251	AATTAATGTT	GTAAACCTGA	CAAATCCTAA AATAACAC
☐ Select all Primers			

SSR20 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGTTGGTGGCTcaactatcat		
Start: 7	Length: 21 bp	Tm: 58.1 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGC GTTTTAGTTCAAACAACCTT		
Start: 190	Length: 23 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 34.8 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
Product Size: 184 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	GTTTGATGTT	GGTGGCTcaa	ctatcatatt tttatccatt caatttttct
51	atagagagag	agaaaaactG	ATGTAGTTGT TAAAGATGCT CTTTGTCTTCT
101	GTAGCAGGAA	AAGACACCAT	GATCGGTAAA GAATACTAGA AAAAAATGTG
151	TCTAAACCGA	GGAATAAAG	GTTGTTTGAA CTAACGCA TATATC
☐ Select all Primers			

SSR21 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	tgaTCACAttgcatcattt		
Start: 28	Length: 21 bp	Tm: 58.9 °C	GC: 38.1 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	tggaaatttgagattaaaacatagaa		
Start: 206	Length: 27 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 25.9 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
Product Size: 179 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	atcatatcatc	atcatcatca	cataaaaatga TCACAttgca tccatctttt
51	attatcacat	acactcattt	aatcaaacat atatataat ataattaatt
101	tgacacccaa	tatcacaata	atatcaaata ccacacattt aaagaaatta
151	aatcaatcaa	catcttacca	atatatttat tctatgtttt aatctcacia
201	tttccatatt	t	
☐ Select all Primers			

SSR24 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AAGCGAAGCGTACCTTTGAA		
Start: 6	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 45.0 % ANY: 6.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TCCTCTCgcgactctctc		
Start: 144	Length: 20 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 60.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
Product Size: 139 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	GATGGAAGCG	AAGCGTACCT	TTGAA GAAAG CAAAGGGGAA GAGAAagaga
51	tagagagaga	gagagagagg	ttcTTTACTT CAGTTGTTGT AAAGGAATTT
101	GTAGAGAGAG	AAagtggaga	gagagagaga gagtgcgGAG AGGAGGGA
☐ Select all Primers			

SSR25 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TTTTTGTAAATAAGGGGTGGCTA		
Start: 19	Length: 23 bp	Tm: 59.0 °C	GC: 34.8 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	GGGCAAGCTCCAAGTACAGT		
Start: 133	Length: 20 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 55.0 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
Product Size: 115 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	AGAGAGGGTA	AAGGATCATT	TTTGTAAATAA AGGGGTGGCT ATAGCCATCA
51	GGCAGAAGCA	TTCATGCTTC	TCTGATACCT TCTTTCTTTC TTATTAAGGT
101	ATTTCCATTA	GATACTGTAC	TTGGAGCTTG CCCAAG
☐ Select all Primers			

SSR26 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AACCTTTTGGAGATTGATTGAAGG		
Start: 31	Length: 24 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 33.3 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CCTTCAAATACACCAAAGGACA		
Start: 217	Length: 22 bp	Tm: 59.0 °C	GC: 40.9 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
Product Size: 187 bp	Pair Any: 7.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	GTTGAGTGTT	ACTGTAAGGA	TATTCTATCA AACCTTTTGG AGATTGATTG
51	AAGGTTATCT	CTTAAACAGT	TGTCTGATCA ATAAAGCTAT TTATTAACAA
101	CACCTTTTGT	ATgtctctata	tatatatgaa cTCTTATAAC CACATAATTA
151	TATCACAAGA	GAtggaaaaa	tcattagtgt gtAATTATA ATGATTGTCC
201	TTTGGTGTAT	TTGAAGGATG	GTTAACTTTG TAATAGCTTT A
☐ Select all Primers			

SSR27 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TCCACAATGGAGATAAGAAAGC		
Start: 4	Length: 22 bp	Tm: 58.3 °C	GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TTGACTTGATTGGTTTGAGAGaa		
Start: 159	Length: 23 bp	Tm: 58.9 °C	GC: 34.8 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
Product Size: 156 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TTC	TCCACAA	TGGAGATAAG AAAGCTAAAA GGTGTAGGTC CCATAAATTT
51	TGGATCTCTC	TTACTTCTAT	GTAAAGTAAG AGAAGTTTAT CATTCTCTTT
101	CAACTTCTCT	CTTTTttaac	tctctctctt tcttattTCT CTCAAACCAA
151	TCAAGTCAA	a t	
☐ Select all Primers			

SSR28 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TTTTGTATTGTCAATTCGCatt		
Start: 2	Length: 23 bp	Tm: 58.6 °C	GC: 26.1 % ANY: 7.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TTTCTCTCCCCGTTACTCA		
Start: 173	Length: 20 bp	Tm: 59.7 °C	GC: 50.0 % ANY: 3.0 SELF: 1.0
Product Size: 172 bp		Pair Any: 3.0	Pair End: 1.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	CTTTTGTATT	GTCAATTCG	CAtttaacac tataaaacaa aattattttt
51	attttgccaC	TTACATTCat	acaagagaga gagagagaga agagaccatc
101	ttttttcttc	ttttttgtt	tttgattttt tttttggga ATACGTTTGT
151	GGATGAGTAA	CGGGGGAGAG	AAAGTTTGG TTTCAGTTT CTTTGGGTGT
201	TTGGTTTAGT	TAGCTATA	
☐ Select all Primers			

SSR29 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AAGTGATGGACACATGCAATCT		
Start: 209	Length: 22 bp	Tm: 59.5 °C	GC: 40.9 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	GGGATACGGATTGGAGGGTA		
Start: 535	Length: 21 bp	Tm: 62.1 °C	GC: 52.4 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
Product Size: 327 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 1.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	ttacctgaaa	ttaagttaag	ggacacatat gtaatttagc ctatttttaa
51	aattctaaaa	aataattata	aatctacaaa atatCCTATA ATTTGAGACT
101	TGAGGGAGTA	TATCTATGTA	ATTTCGTGTG GTAAGCGAGT TTTGAGCAA
151	CGCATACAAT	TAAACTAAT	AACACATTAC ACGAATTAGG GGTACATACA
201	AAACGAGTAA	GTGATGGACA	CATGCAATCT GTATAACTAC CAATTATTGT
251	AATTAGTTTC	CCATTAATAG	CAAATTATTA TCTTTAAGCA CCAAAACCAA
301	TGCCAACTAA	TCCTAATTGT	CCACACCATC ATAGGACCGA TTCCACceta
351	cacacacaca	cacgcaTTAA	TTTCGAtata actttacaaa aatatataaa
401	aataaataaa	tatcacaaGA	CATTAAAGTG TAGCTAGCAC TTAGCAAATT
451	AGGGAATGGC	ATAACACAAT	TTTCGTGTTA CCAACCATT TGGAAACAAT
501	CTCTACCATA	TAGTTACCCT	CCAAATCCGT ATCCCCTCTCA CCCAATTCAA
551	ACT		

SSR30 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	CCACATGTTTCGTAGTGTATCTCC		
Start: 1	Length: 25 bp	Tm: 61.0 °C	GC: 44.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CTTGATTGAATTAAAGTTTGAAAAAG		
Start: 164	Length: 26 bp	Tm: 57.1 °C	GC: 23.1 % ANY: 7.0 SELF: 3.0
Product Size: 164 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	CCACATGTTT	CGTAGTGTTA	TCTCCTTCAA CTATCACAGC CTGGACACCA
51	AACAGAAAAT	GCACAAAACC	AACAATATTC AAACAAGtta gaatatatat
101	atztatgaga	ttaatttata	tacaccgGCA ATGTAAAACT TTTTCAAACT
151	TTAATTCAAT	CAAGTAACAC	TATAAGGT

SSR31 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AAACACAACAAAAGATCACATGG		
Start: 9	Length: 23 bp	Tm: 58.9 °C	GC: 34.8 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TTTCAAAGAACCCCAACAGAA		
Start: 322	Length: 21 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 38.1 % ANY: 5.0 SELF: 0.0
Product Size: 314 bp	Pair Any: 3.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TAGTGAAGAA	ACACAACAAA	AGATCACATG Gatcaataaac aaaattatat
51	gacatatagg	aaaaaaaaaa	gatgatccAC TATATAGACG GATTATAGAT
101	ACACAGGTAG	ACATGCAATA	TGCAATGCAA GTTCCATATA CGTGTTAGGA
151	CTAAAGTCTA	CACAAGCAGG	ACATTTGTGC AGTGAAACCA CCGGTTTTCa
201	TAATACTTGC	CAAAATAAAG	AATTTTGTTT TGGGGGCATT TAGGCTTCTG
251	CAAAGGTATG	GTACACATAT	ACAaccccat atatatatat atcgacaAAG
301	ATTCTGTTGG	GGTTCTTTGA	AAACAGCAG AAAGAGAATT TATTCGTCCa
351	ttatgaacaa	aaaaaaagtc	taaATTTCTT CCCATAGTAA ACCTCAGAAT
401	CCTTTCAGCA	GGATTAGTGA	CCTCTTGTCT GAAATTCAGT CTTTCATAAC
451	AATGCTGAGG	TAAGTAGCTA	CAGAGAGCAT TTTTGACAAA ATCAACGCCG
501	TGCAACTAGG	CTCAGGCAAG	GCATTGGTTT CTTGAGTATT ATAGCAGCAC
551	CAGCAGCTAG	TCCTTGACC	

SSR32 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TCCTTTTCCAAATCCAATGA		
Start: 4	Length: 21 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 33.3 % ANY: 4.0 SELF: 1.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	GGAGCAGAGTGTGTGTGG		
Start: 156	Length: 20 bp	Tm: 60.4 °C	GC: 60.0 % ANY: 3.0 SELF: 0.0
Product Size: 153 bp	Pair Any: 3.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	ATATCCTTTT	CCAAATCCA	ATGAATTGA GCTTCAGAAA AGGGGATAAA
51	ATTAACAATC	ACATATCTCT	CTATCATATG cctttgaaat ttaaaattat
101	acagAAAAAA	TCTGAGACCT	TTCCACTATC TATCACCCAC ACACACACTC
151	TGCTCCTTCC	TCTGTTTTT	
☐ Select all Primers			

SSR33 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	caatTACATGTTAGATGACGtgct		
Start: 5	Length: 24 bp	Tm: 58.3 °C	GC: 37.5 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGTTGCACACAAAAAGTTAGACG		
Start: 376	Length: 23 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 39.1 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
Product Size: 372 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	ctaa	caatTA	CATGTTAGAT GACGtgctaa aataaaatga tatcattggt
51	ataaAGATAA	GTTTCAACAT	TTATTACTaa gataaat ttt aatatgaaca
101	aataat ttttaa	tgactaaaat	aaaagaat ttt tgataaaaaa tattaataaac
151	tataTTTAAG	TTTTCATTTT	ACTtgct ttt taatttattg tataCTAGCA
201	TTAACATGTT	CTCTTATGGA	TGTTTGTTAg cttat tttta ttgtttcaat
251	ttgtatatat	atatgtaata	taattttata atattgcatt atgatttaaa
301	tgttatttat	gtatt ttttt	ttatt ttttc atccaATTGT CAATAATGTA
351	ATACGTCTAA	CTTTTGTGT	GCAACAGTTA T

SSR34 markerine ait primer dizaynı

Pair 3:

☐ Left Primer 3:

Sequence:

Start: 17 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 40.0 % ANY: 6.0 SELF: 2.0

☐ Right Primer 3:

Sequence:

Start: 146 Length: 23 bp Tm: 59.4 °C GC: 26.1 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Product Size: 130 bp Pair Any: 5.0 Pair End: 2.0

SSR35 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TCTTGTAAGTACGGTGGCAGTG		
Start: 33	Length: 22 bp	Tm: 60.2 °C	GC: 50.0 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	tattgttGCAAGAAATTGTCTCTTT		
Start: 182	Length: 25 bp	Tm: 58.5 °C	GC: 28.0 % ANY: 8.0 SELF: 3.0
Product Size: 150 bp	Pair Any: 6.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TTTGTAGCTT	GTGTATTTTC	ACAGTGAAAT GCTCTTGTA GTACGGTGGC
51	AGTGAGTCAA	ACAcacaaac	acacacacac aaacacgtca aaatcaaatt
101	tcaccTCCAT	AATCAATTTT	AGCTCCAAAA GTGGAACCAA ACATATTGTA
151	ATCTTGTA	AAA GAGACAATTT	CTTGCaacaa tataat

SSR36 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGTCCAAGAACGACAATGTG		
Start: 11	Length: 20 bp	Tm: 58.1 °C	GC: 45.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CGACTTAACATTAGCAATAGTCTTCAA		
Start: 164	Length: 27 bp	Tm: 59.4 °C	GC: 33.3 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
Product Size: 154 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	CCATTATCAA	TGTCCAAGAA	CGACAATGTG TAGTGAACAG GAAATACCAA
51	GGTCATGACC	CTAAGTCCTC	TTACCAGCGc gcacacacac aaaaaagaaT
101	GTCAAAGACT	AGAGCAATTC	ATAAGATTGG GCAAATCTTG AAGACTATTG
151	CTAATGTTAA	GTCTG	
☐ Select all Primers			

SSR37 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AAATAGTCCATAAGCTTCACCATAC		
Start: 18	Length: 25 bp	Tm: 57.1 °C	GC: 36.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TTGATTAATTACCACAACCTTTATATGC		
Start: 169	Length: 27 bp	Tm: 57.1 °C	GC: 25.9 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
Product Size: 152 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	TTCACCTAAC	AACATATAAA	TAGTCCATAA GCTTCACCAT ACTATATAGT
51	AGAGAcacta	taaatatata	tatacttttg agTAGATATG GATGTAATTT
101	CAACTACCTC	ATGCTTATTT	TTGTTCCATT CCTGACCTGC ATGCATATAA
151	AGTTGTGGTA	ATTAATCAAA	CATAATCCAA TC

SSR38 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGAGTGTGTTGTTACCTTTTGC		
Start: 33	Length: 23 bp	Tm: 59.2 °C	GC: 39.1 % ANY: 3.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CATCGACACAATTCCAAGGTT		
Start: 189	Length: 21 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
Product Size: 157 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	AAATGAGAAC	GAGAAGAAGA	ACATAGGAAG TGTGAGTGT GTTGTTACCT
51	TTTGCACAA	AGGGGATCAA	tgtggagaga gagagagaga gagaaatgaG
101	AGGGTTCCAA	GTGAAGAGGC	AAAAGTGTGT ATTAGAATAA GGGTAGAGGA
151	CGGAGAAGTA	GAACAAAAAA	CCTTGAATT GTGTCGATGG
☐ Select all Primers			

SSR39 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	aaaatttagaaatgggAGAAAACA		
Start: 2	Length: 25 bp	Tm: 58.6 °C	GC: 24.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TGTGACATATGCATTGCTCTTAC		
Start: 187	Length: 24 bp	Tm: 59.2 °C	GC: 37.5 % ANY: 8.0 SELF: 3.0
Product Size: 186 bp	Pair Any: 6.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	taaaatttag	aaaatgggAG	AAAACATCTT TTAAGCTTAA AATATACCTT
51	AATTAATCCT	ATAAAAATCT	AGAAAACAAT TATACAAGCC TTTCTAACTT
101	TATATAAGAC	TTGAGAGAGA	GATAGTTGGT TCCATTGTCC AATATGATAT
151	TTTACCTAAA	AAAGTAAGAG	CAAATGCATA TGTCACATAA AATATA
☐ Select all Primers			

SSR40 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	aaaaacatcgAAACCAGCAAA		
Start: 4	Length: 21 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 33.3 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	ACGTGTTCCCATTTGGTTAGC		
Start: 344	Length: 20 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
Product Size: 341 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	ttaaaaaaca	tcgAAACCAG	CAAAATAAGTG ATACTAGTAT GAAACacaat
51	agagatagag	agagagagag	ataccGGTCA TGTGTAGAG AAAGGAGGAA
101	GGTGTGACG	TTGAAACTCA	AACAAATAGA GGTATTGACG AAGAGTAGTA
151	GTGAAGAGAC	GATATTTTGA	GAAACATGCG ATGTTGACAC TACCGGTGAC
201	GGAAAAAGG	GGTTTAAATA	GATAGAATAT GATTCAAAGG TTTGTCCAG
251	CAATTGTGAC	GGCGTTGGAA	GATTAGATGA ATGAATCCAA AGCGATAATA
301	TGATTGATGA	TATCACTAAT	AGCAGCTAAC CAATGGGAAC ACGTGTGAGT
351	TCT		
☐ Select all Primers			

SSR41 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	aGAAAAAGAGGACGAACAGAAA		
Start: 30	Length: 22 bp	Tm: 57.3 °C	GC: 36.4 % ANY: 2.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TCTTTTGCTCCGTTGGATT		
Start: 182	Length: 20 bp	Tm: 59.7 °C	GC: 40.0 % ANY: 3.0 SELF: 0.0
Product Size: 153 bp	Pair Any: 7.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	AGaaagaaca	ataaaatata	aatcaatata GAAAAAGAGG ACGAACAGAA
51	AGAGATTAGA	ATTCCAATCA	AAATGCTAAG AGTTACGAAA ACAAATgcta
101	caaatatata	tatatataag	caTAAAAAGAA CTAAATTACG AAATATAAAA
151	GTCTATTAAT	ATAAATCCAA	CGGAGCAAAA GATTAAATA ctcaagatat
201	taaattagct	AAATTTATGA	GATATTAAAT TAGGTC
☐ Select all Primers			

SSR42 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1: Primer_F			
Sequence: gaatCGGAAGCTAAACCGaaa			
Start: 3	Length: 21 bp	Tm: 58.2 °C	GC: 38.1 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1: Primer_R			
Sequence: TCTCTCCCTCCCTCCctcta			
Start: 247	Length: 20 bp	Tm: 60.3 °C	GC: 60.0 % ANY: 2.0 SELF: 2.0
Product Size: 245 bp		Pair Any: 3.0	Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	ttgaatCGGA	ACTAAAACCG	aaattttcaaa atgaaaactt atttaactta
51	tACATATGTG	TGTGTGTTGA	TGAATGCAAA TATTTGTAGA TGAAAGGGAG
101	gagaaaaaat	gatttaaaga	gagagatata tattaaatat aaaatgagag
151	AGAGATAAGA	ATTAGATAAA	GACAAAAGAG AGTAAGAGAT ATAGAGAGAC
201	ATAAGATAGt	agagaaatat	aaaatattag agGGAGGGAG GGAGAGAAAG
251	A		

SSR43 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1: Primer_F			
Sequence: TCAGAAATAGGAAAAGCAGTTtca			
Start: 63	Length: 24 bp	Tm: 59.5 °C	GC: 33.3 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1: Primer_R			
Sequence: CCTGAATGCCAAAATAAGGTTC			
Start: 267	Length: 22 bp	Tm: 59.8 °C	GC: 40.9 % ANY: 3.0 SELF: 0.0
Product Size: 205 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	GTAAACAGCC	AACTAATAT	AATGATAGGA ATTACAGGAC AGAATCATAA
51	AATAATCTAA	TTTCAGAAAT	AGGAAAAGCA GTTtcatTTA ctttatatat
101	atataatagg	cAGGTAACCT	CTAAAAATTT CAAACGATAT GCTCAAACCC
151	CCCCAAGAAT	CAAAAGTGAT	AGCTGTTATT TTATCCATGT GCCAAACAAT
201	GGCGCAATGA	AGAAGAGTAT	GCATAGTATT TTTCTTCAAC GAGATGAACC
251	TTATTTTGGC	ATTCAGGTCA	AGCATTTG
☐ Select all Primers			

SSR44 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGCCATTGTTGAAAGCACAT		
Start: 11	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 40.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TCAAATGCTTCATTGCCATT		
Start: 327	Length: 20 bp	Tm: 59.1 °C	GC: 35.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 317 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	ATCGCATTGC	TGCCATTGTT	GAAAGCACAT
51	TACAAAGATG	AAGATTTTCT	ACAATGTAGG
101	TGAAGTGGCA	GGTTC AATTA	ATGACTTCAT
151	ATATTTCAAG	TTGGTTAGCT	tttaaaatga
201	tgctgaaatt	tattatatgt	tggtAATTTG
251	AACTCAGGTG	ATGAAAGGGA	GTATTTAAGT
301	AGAAGCTAAT	GGCAATGAAG	CATTTGACGT
351	ATTCTTTGAC	AACATCAGGA	CTTCCAAATT
			TCAAGATCA
☐ Select all Primers			

SSR47 markerine ait primer dizaynı

Pair 4:			
☐ Left Primer 4:	Primer_3_F		
Sequence:	AACGTCCACAATGAGAAAAGC		
Start: 16	Length: 21 bp	Tm: 59.2 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☐ Right Primer 4:	Primer_3_R		
Sequence:	gccatttttgcaAAGTTCa		
Start: 213	Length: 20 bp	Tm: 58.9 °C	GC: 40.0 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
Product Size: 198 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			

SSR48 markerine ait primer dizaynı

Pair 5:

☐ Left Primer 5:

Sequence:

Start: 16 Length: 20 bp Tm: 59.9 °C GC: 50.0 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

☐ Right Primer 5:

Sequence:

Start: 170 Length: 20 bp Tm: 59.3 °C GC: 50.0 % ANY: 2.0 SELF: 0.0

Product Size: 155 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 3.0

SSR49 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help	
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code	
< Back				
Pair 1:				
☒ Left Primer 1:	Primer_F			
Sequence:	TGGTTGTTGCTATTCAACCT			
Start: 1	Length: 21 bp	Tm: 57.3 °C	GC: 38.1 % ANY: 6.0 SELF: 2.0	
☒ Right Primer 1:	Primer_R			
Sequence:	TGATTTGGGTCTCTTTTGCTT			
Start: 200	Length: 22 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 36.4 % ANY: 2.0 SELF: 0.0	
Product Size: 200 bp		Pair Any: 3.0	Pair End: 1.0	
Send to Primer3Manager Reset Form				
1	TGGTTGTTGC	TATTCAACC	TATCatgctt aaatatattt aaacacttGA	
51	AATCAGTTTT	GACAAAAGAA	ATATGCACCA AATAAGACTC ATTTGAAAGA	
101	CATATATATA	TGCCTCAAAA	TGCTCACATA TGAATTTTGT ACTTCATGCC	
151	ATAATCTTTT	TGGATTAGTT	GAGTTTAA	GCAAAAAGAG ACCCAAATCA
201	TTTAAATGAA	AACCAAACAT	ATATTATCTT GTTGTAAatcc ttaaaaaata	
251	aatcctaaac	aaggatatat		
☐ Select all Primers				

SSR50 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TTGTCTGAAGAATGCCACCTT		
Start: 56	Length: 21 bp	Tm: 59.7 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 3.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TTTGTGAAGCGTCACTCAGG		
Start: 199	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 50.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0
Product Size: 144 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	TAATAAATCC	ATGACGCATA	GTCATGTAAT CCACCTTACT GACAGACGCA
51	AAGAATTGTC	TGAAGAATGC	CACCTTACAA AAAAAGAATG Gtggaatgaa
101	ttatatatat	atattttctaa	gctttaaaaa taaaaattga ggaCTCACTA
151	TCCATCGTAT	TCCTGGCTTC	CTAGACCAGC CTGAGTGACG CTTACAAAT
201	GTAGTTTGAT	GCGCAAATCT	GAACC
☐ Select all Primers			

SSR51 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TCAACCCACGTGCTTTTGta		
Start: 24	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 45.0 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	CCGGTCAATATTTGCGAGT		
Start: 219	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 45.0 % ANY: 6.0 SELF: 1.0
Product Size: 196 bp		Pair Any: 3.0	Pair End: 1.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	ATTATTCCAA	GTCAATGATG	CAATCAACCC ACGTGCTTTT GTactctttt
51	ttaaataatta	aatgttttcT	AATTAAACAC ATATACTCCA ATTCGCAACT
101	TCAGAGGAAC	aatatacata	atatatatat tgtttgaaaA TTACTTCCTG
151	AAATAAGGGT	GAACAAGAAA	GATAACAAA TCCGCTAAAA AACAACTAA
201	CTCGCAAAAT	ATTGACCGGA	AACA
☐ Select all Primers			

SSR52 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AAACATTCTgcaattttgttta		
Start: 10	Length: 24 bp	Tm: 57.2 °C	GC: 20.8 % ANY: 6.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TCTCGTTGTTCAAACCCAAac		
Start: 171	Length: 21 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 42.9 % ANY: 4.0 SELF: 0.0
Product Size: 162 bp		Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	cactaaCAAA	AAACATTCTg	caattttgtt ttaaaacaaa tattaatctt
51	gagttaattt	aaaagcaata	attaattttt aaaaatgaat cacaattcaa
101	atctccttat	ttgtgattga	tattgtcact tcatatatat atatatccaa
151	gtTTGGGTTT	GAACAACGAG	ACataaattg tatttaaaaa aactgtGAAT
201	AAGTTACTCG	CATTCAATTA	AAAAGAATTA TGTGTACACC A
☐ Select all Primers			

SSR53 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	TGCCTTTGTACTCTTCTATATTGG		
Start: 13	Length: 25 bp	Tm: 58.1 °C	GC: 36.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	caaattgTTGCCTttgtttg		
Start: 242	Length: 22 bp	Tm: 59.5 °C	GC: 31.8 % ANY: 5.0 SELF: 0.0
Product Size: 230 bp		Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0
Send to Primer3Manager		Reset Form	
1	ACTTAGGTTG	GGTGCCTTTG	TACTCTTCTA TATTGGAAC TTTGTTttac
51	tcttaaaaaa	aaattaagat	acatataagt taattcataa aatttaccgc
101	aataagaaat	tgaagaaatt	tCCATATAAT TAAtggtttt gttttttatc
151	tttgaaatta	ttatttataa	aaataataat gacatgaaac aaattaaaaa
201	catatttaat	atatatat	caaacaaaAG GCAAAcaatt tgtttccaaa
251	tttCGGGCAA	TGTCTTCCAC	ATATAAGTCT AATTTTCTT CTGGAGGGTT
301	TTTTT		
☐ Select all Primers			

SSR54 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	GTTTCGTCATACgataagaagagaaa		
Start: 6	Length: 25 bp	Tm: 58.1 °C	GC: 36.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TATAGCGTCGGTTGtcaatttt		
Start: 155	Length: 23 bp	Tm: 59.9 °C	GC: 34.8 % ANY: 5.0 SELF: 1.0
Product Size: 150 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 3.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			
1	ACTGTGTTTCG	TCATACgata	agaagagaaa
51	TTAGAAGTGT	TTAAATATAA	GAGTCAACCA
101	atatttataat	aaaagaaaag	atatttgaat
151	CTATAATATT	AGTATATTAA	TGTTGTTTC
☐ Select all Primers			

SSR55 markerine ait primer dizaynı

☐ Select all Primers			
Pair 2:			
☐ Left Primer 2:	Primer_1_F		
Sequence:	GCACCCACACCTGCTAAGAG		
Start: 22	Length: 20 bp	Tm: 60.9 °C	GC: 60.0 % ANY: 3.0 SELF: 3.0
☐ Right Primer 2:	Primer_1_R		
Sequence:	TCCCAAGAACGTCTTTCACC		
Start: 183	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
Product Size: 162 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0	
Send to Primer3Manager Reset Form			

SSR56 markerine ait primer dizaynı

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
< Back			
Pair 1:			
☒ Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	AAGTCCTAATATTGGGCTGTTTAGA		
Start: 99	Length: 25 bp	Tm: 58.8 °C	GC: 36.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0
☒ Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	TATGCATGCAGAAACACACG		
Start: 250	Length: 20 bp	Tm: 59.3 °C	GC: 45.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0
Product Size: 152 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	ttcaTAAAGA	CTTTGTTTTA	GTAGCCTTAC CTGACTAATT TGTTTTTGAT
51	ATAGTACTTA	CTTATTTACC	TATTAGATGT AGTGTTTAGT ATATAGTTAA
101	GTCCTAATAT	TGGGCTGTTT	AGATAGCATT TGTGCAATTG TGCCAATGGT
151	TGTGGTCCTA	AGTCCTATCA	GTTTTATTTC TATGTGTAGA TGgatatgca
201	tgcatatata	tatactcata	tATATAAACA CGTGTGTTTC TGCATGCATA
251	CTCATATGTT	GATTTATGTT	AGAAAAATAT
☐ Select all Primers			

SSR57 markerine ait primer dizaynı

Pair 2:			
☐ Left Primer 2:	Primer_1_F		
Sequence:	GGTGTGATGTGTGgcagaga		
Start: 42	Length: 20 bp	Tm: 60.8 °C	GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF: 3.0
☐ Right Primer 2:	Primer_1_R		
Sequence:	GCCCCGAAATACAGGGATAC		
Start: 227	Length: 20 bp	Tm: 60.5 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
Product Size: 186 bp	Pair Any: 3.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		

SSR58 markerine ait primer dizaynı

ÖZGEÇMİŞ

DUYGU SARI YOL

duygusy07@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2013-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2013	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2006-2010	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2011-2019	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Esen, A., Sari, H., Erler, F., Adak, A., Sari, D., Eker, T., Canci, H., İkten, C., Kahraman, A., Toker, C. 2019. Screening and selection of accessions in the genus *Pisum* L. for resistance to pulse beetle (*Callosobruchus chinensis* L.). *Euphytica*, 215: 82.

- Ceylan, F.O., Adak, A., Sari, D., Sari, H., Toker, C. 2019. Unveiling of suppressed genes in interspecific and backcross populations derived from mutants of *Cicer* species. *Crop and Pasture Science*, 70 (3): 254-262.
- Celmeli, T., Sari, H., Canci, H., Sari, D., Adak, A., Eker, T., Toker, C. 2018. The nutritional content of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in comparison to modern carieties. *Agronomy*, 8: 166.
- Sari, H., Sari, D., Adak, A., Çancı, H., İkten, C., Erler, F., et al. 2018. Assessment of leaf miner [*Liriomyza cicerina* Rond. (Diptera: Agromyzidae)] resistance in *Cicer echinospermum* P.H. Davis genotypes. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 31: 71-75.
- Toker, C., Bakir, M., Sari, H., Sari, D., Adak, A., Eker, T., Canci, H., Mutlu, N. 2018. Relationship between transgressive segregations and genetic distances based on SRR markers in *Pisum* species. *Journal of Biotechnology*, 280: S28
- Toker, C., Adak, A., Sari, D., Sari, H., Ceylan, F.O., Canci, H., İkten, C., Erler, F. 2018. Registration of AWC 612M chickpea mutant germplasm line resistant to leaf miner (*Liriomyza cicerina*). *Journal of Plant Registrations*, 13 (1): 87-90.
- Ceylan, F.Ö., Sari, H., Sari, D., Adak, A., Erler, F., Toker, C. 2018. Revealing of resistant sources in *Cicer* species to chickpea leaf miner, *Liriomyza cicerina* (Rondani). *Phytoparasitica*, 46: 635-643.
- Eker, T., Erler, F., Adak, A., İmrek, B., Güven, H., Tosun, H.S., Sari, D., et al. 2018. Screening of chickpea accessions for resistance against the pulse beetle, *Collosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 76: 57.
- Talip, M., Adak, A., Kahraman, A., Berger, J., Sari, D., Sari, H., et al. 2018. Agromorphological traits of *Cicer reticulatum* Ladizinsky in comparison to *C. echinospermum* P.H. Davis in terms of potential to improve cultivated chickpea (*C. arietinum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65: 951-962.
- Adak, A., Çancı, H., İnci, N., Ceylan, F.Ö., Sari, D., Sari, H., et al. 2018. Essential selection criteria for dual uses of red pea (*Lathyrus cicera* L.). *Legume Research*, 41: 1-5.
- Sabır, A., İkten, H., Mutlu, N., Sari, D. 2017. Genetic Identification and conservation of local Turkish grapevine (*Vitis vinifera* L.) genotypes on the edge of extinction, *Erwerbs-Obstbau*, 60: 31-38.
- Tekin, M., Sari, D., Çatal, M., İkten, C., Symkal, P., Penmetsa, R.V., et al. 2017. Eco-geographic distribution of *Cicer isauricum* P.H. Davis and threats to the species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65: 67-77.
- Adak, A., Sari, D., Sari, H., Toker, C. 2017. Gene effects of *Cicer reticulatum* on qualitative and quantitative traits in the cultivated chickpea, *Plant Breeding*, 136: 939-947.

- Köseoğlu, K., Adak, A., Sari, D., Sari, H., Ceylan, F.O., Toker, C. 2017. Transgressive segregations for yield criteria in reciprocal interspecific crosses between *Cicer arietinum* L. and *C. reticulatum* Ladiz. *Euphytica*, 213 (116).
- Aykurt, C., Fehrer, J., Sari, D., Kaplan, Z., Deniz, İ.G., Aydemir, E., et al. 2017. Hybridization between the linear-leaved *Potamogeton* species in Turkey. *Aquatic Botany*, 141: 22-28.
- Tekin, M., Sari, D., Catal, M., Ikten, C., Penmetsa, R.V., Wettberg, E.J., Toker, C. 2016. Diagnoses of biotic stresses of *Cicer isauricum* P.H. Davis based on molecular and morphological data. *Journal of Biotechnology*, 231: 22-23.
- Aykurt, C., Deniz, I.G., Sari, D., Vural, M., Sumbul, H. 2016. Resurrection of *Ornithogalum brevipedicellatum* (Asparagaceae) with morphological and molecular evidence. *Acta Botanica Croatica*, 75 (1): 60-66.
- Sari, D., Mutlu, N., Toker, C. 2016. Assessment of resistance gene analog, peroxidase, and WRKY gene polymorphisms in the genus *Lens* Miller. *Turkish Journal of Botany*, 40 (2): 121-129.
- Deniz, I.G., Genc, I., Sari, D. 2015. Morphological and molecular data reveal a new species of *Allium* (Amaryllidaceae) from SW Anatolia, Turkey. *Phytotaxa*, 212 (4): 283-292.
- Sari, D., Mutlu, N., Toker, C. 2013. Resistance gene analog polymorphism in *Lens* species. *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (1): 127-128.
- Sari, D., Toker, C., Mutlu, N. 2013. Peroxidase gene polymorphism in *Lens* and *Vicia* species. *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (1): 127.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- Sari, D., Sari, H., Eker, T., Ikten, C., Uzun, B., Toker, C. Phenotyping for cold tolerance in RILs derived from an interspecific cross between *Cicer arietinum* L. and *C. reticulatum* Ladiz. 7th International Legume Conference, 28 August-2 September 2018, Sendai, Japan.
- Sari, H., Erler, F., Ceylan, F.Ö., Sari, D., Adak, A., Ikten, C., et al. Screening of chickpea accessions for resistance against the chickpea leaf miner, *Liriomyza cicerina* (Rondani). 1. International Gap Agriculture & Livestock Congress, 25-27 April 2018, vol.1, no.1, pp.222-222, Şanlıurfa, Turkey.
- Sari, H., Esen, A., Erler, F., Adak, A., Sari, D., Eker, T. et al. Evaluation of *Pisum* species for resistance to the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L., 1st International GAP Agriculture and Livestock Congress, UGAP 2018, pp.222-222, 25 Nisan-27 June 2018, Şanlıurfa, Turkey.
- Çancı, H., Sari, H., Sari, D., Adak, A., Doğdu, V., Toker, C. Xenia and metaxenia in seeds of interspecific crosses among *Pisum* species, EUCARPIA, Section Genetic Resources, "Crop diversification in a changing world. Mobilizing the

green gold of plant genetic resources. pp: 140-140, 8-11 May 2017, Montpellier, France.

Sari, D., Sari, H., Adak, A., Çatal, M., Toker, C. Detection of ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* in *Cicer isauricum* by using internal transcribed spacer sequences. VIII. International Scientific Agricultural Symposium (Agrosym 2017), pp.208-208, 5-8 October, Jahorina, Bosnia and Herzegovina.

Erler, F., Eker, T., İmrek, B., Güven, H., Toker, C., Tosun, H.S., Sari, D. Evaluation of chickpea genotypes for resistance against the pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development, pp:326-327, 21-24 September 2017, Isparta, Turkey.

Doğdu, V., Çancı, H., Sari, H., Sari, D., Adak, A., Toker, C. Transgressions in reciprocal interspecific crosses between the cultivated pea and its wild species.", The 4th International Conference "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology" (PlantGen2017), pp: 24-24, 29 May - 2 June 2017, Almaty, Kazakhstan.

Sari, D., Adak, A., Sari, H., Toker, C. Distribution of the genus *Lens* Miller in Turkey and its importance for plant breeding, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, pp: 199-199, 3-5 Nisan 2017, Antalya, Turkey.

Sari, H., Sari, D., Adak, A., Toker, C. Distribution of wild *Pisum* species and the genus *Vavilovia* in Turkey", In International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, pp.200-200, 3-5 April 2017, Antalya, Turkey.

Adak, A., Sari, D., Sari, H., Toker, C. Ecogeography and breeding achievement of wild *Cicer* species in Turkey, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, 3-5 Nisan 2017, Antalya, Turkey.

Köseoğlu, K., Adak, A., Sari, D., Sari, H., Baloğlu, F.Ö., Toker, C. Fruitful segregations in reciprocal interspecific crosses between the cultivated chickpea and its progenitor, EUCARPIA Genetic Resources 2017, 8-11 May 2017, Montpellier, France.

Toker, C., Sari, D., Sari, H., Çancı, H., İnci, N., Ceylan, F.Ö. et al. Interaction between Fe-deficiency chlorosis and temperature in chickpea (*Cicer arietinum* L.), Plant Nutrition, Growth & Environment Interactions III , 20-21 February 2017, Vienna, Austria.

Sari, D., Berger, J., Kahraman, A., Aydogan, A., Can, C., Bukun, B., Penmetsa, R.V., von Wettberg, E.J., Toker, C. Morphological and molecular characterizations of ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* in *Cicer anatolicum*. Second International Legume Society Conference, pp: 311, 11-14 October 2016, Tróia, Portugal.

- Sari, D., Toker, C. Interspecific hybridizations in cool season food legumes. 20th EUCARPIA General Congress, pp: 295. 29 Aug-1 Sep 2016, Zurich, Switzerland.
- Tekin, M., Sari, D., Chrigui, N., Talip, M., Toker, C. Genetic resources for resistance to ascochyta blight of chickpea. Agenda Chickpea Innovation Lab 2016 Meeting, 30 May-2 June 2016, İzmir, Turkey.
- Sari, D., Toker, C. Use of different molecular markers for resistance to ascochyta blight in chickpea II. International Plant Breeding Congress and EUCARPIA – Oil and Protein Crops Section Conference, pp: 149-49, 01-06 November 2015, Antalya, Turkey.
- Sari, D., Smýkal, P., Toker, C. Photosynthetic activity in *Pisum* species. Eucarpia International Symposium on Protein Crops - V Meeting AEL, pp: 175-175, 4-7 May 2015, Pontevedra, Spain.
- Sari, D., Cetin, A., Ozugur, Z., Ceylan, F.O., Toker, C. Ecogeography and distribution of forage legumes in Turkey. First Legume Society Conference 2013: A Legume Odyssey, pp: 36-36, 9-11 May 2013, Novi Sad, Serbia.
- Sari, D., Cetin, A., Ozugur, Z., Ceylan, F.O., Toker, C. Chlorophyll content of the cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.). International Plant Breeding Congress, pp: 186-186, 10-14 November 2013, Antalya, Turkey.
- Toker, C., Inci, N.E., Ceylan, F.O., Ozugur, Z., Sari, D., Koseoglu, K., Ikten, C. Genetic diversity for resistance to abiotic and biotic stresses in wild *Cicer* species. The 12th SABRAO Congress on Plant Breeding towards 2025, pp. 135, 13-16 January 2012, Chiang Mai, Thailand.
- Toker, C., Inci, N.E., Ceylan, F.O., Ozugur, Z., Sari, D., Koseoglu, K., Ikten, C. Determination of genetics and inheritance of induced male and female sterility in chickpea: A new hypothesis. The 12th SABRAO Congress on Plant Breeding towards 2025. pp. 136. 13-16 January 2012, Chiang Mai, Thailand.
- Ceylan, F.O., Sari, D. Weeds and struggle methods in cool season food legume crops. 1st National Agriculture Congress and Exposition on behalf of Ali Numan Kırac with International Participation. pp. 1325, April 27-30 2011, Eskişehir, Turkey.
- Toker, C., Inci, N.E., Ceylan, F.O., Ozugur, Z., Sari, D. Induced variation in *Cicer reticulatum* Ladiz., progenitor of cultivated chickpea. To serve and converse-European Plant Genetic Resources Conference, pp. 110, 5-7 April 2011, Wageningen, Netherlands.