

**Bazı Tescilli Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşitlerinin Simple Sequence Repeats (SSRs) Markörleri ile Karakterizasyonu**

Şeyda Nur TURKAY<sup>1</sup>, Melike BAKIR<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Nohut (*Cicer arietinum* L.) dünya çapında yetiştirilen ve ekonomik açıdan önemli olan yemeklik baklagil bitkisidir. Bu çalışmada, 2011 yılı sonrası tescil edilen 10 tescilli nohut çeşidi 15 SSR markörü içerisinde polimorfizm gösteren 6 SSR markörü kullanılarak genetik benzerlikleri incelenmiştir. Toplam allel sayısı 29 ve her bir lokus için ortalama allel sayısı 4.83 olarak belirlenmiştir. Ortalama heterozigotluk oranı 0.62, PIC (polymorphism information content) değeri 0.41 ile 0.74 arasında ve ortalama 0.58 olarak bulunmuştur. Genetik benzerlik matrisinden Neighbour-joining ve UPGMA kullanılarak oluşturulan genetik ilişki dendogramı ile 10 nohut çeşidinin iki ayrı gruba ayrıldığı görülmüştür. Genetik benzerlik açısından birbirine en yakın çeşitlerin Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Sezenbey ve Zuhul çeşitleri (%96) ile Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Ilgaz ve Aslanbey çeşitleri (%96) olduğu, birbirlerine en uzak çeşitlerin ise Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Seçkin ile Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Merkezi tarafından tescil edilen Akça çeşitleri (%21) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile bazı tescilli nohut çeşitlerinin genetik benzerlik ilişkisi belirlenmiş, nohut ıslah çalışmaları ve nohutta gerçekleştirilecek diğer genetik tabanlı çalışmalara katkıda bulunması amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Nohut, SSRs, genetik çeşitlilik, karakterizasyon

**Characterization of Some Registered Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Varieties with Simple Sequence Repeats (SSRs) Markers**

**ABSTRACT:** Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an economically important edible legume plant that is grown worldwide. In this study, genetic similarities of 10 registered chickpea varieties which are registered after 2011 were investigated by using 6 polymorphic SSR markers selected from 15 SSR markers. The total number of alleles were 29 and the average number of alleles for each locus were 4.83. The average heterozygous rate was 0.62, PIC (polymorphism information content) was between 0.41 and 0.74 and an average of 0.58. It was observed that 10 chickpea varieties were divided into two groups with the genetic similarity dendogram created using Neighbor-joining and UPGMA from the genetic similarity matrix. In terms of genetic similarity, Sezenbey and Zuhul varieties (96%) registered by the Black Sea Agricultural Research Institute (96%) and Ilgaz and Aslanbey varieties (96%) registered by the Eastern Mediterranean Agricultural Research Institute were found the closest varieties. On the other hand, Seçkin registered by the Mediterranean Agricultural Research Institute and Akça registered by Transitional Zone Agricultural Research Institute were found the farthest varieties (21%). With this study, determining of the genetic similarities some registered chickpea varieties was aimed to contribute to chickpea breeding studies and the other genetic-based studies.

**Key words:** Chickpea, SSRs, genetic diversity, characterization

<sup>1</sup> Şeyda Nur TURKAY (Orcid ID: 0000-0002-6605-0989), Melike BAKIR (Orcid ID: 0000-0003-3465-1453), Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Melike BAKIR, e-mail: melikecu@gmail.com

## GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisi kültürü yapılan en eski yemeklik baklagillerdendir (Arumuganathan ve Earle, 1991). Nohut kendine döllen diploid ( $2n=16$ ) bir bitkidir ve genom büyüklüğü yaklaşık 738 Mbp'dir (Varshney ve ark., 2013). Yüksek protein içeriği, mineral, vitamin ve lif oranı ile insan beslenmesi için önemli bir besin kaynağıdır (Şehirali, 1988; Friedman, 1996). Aynı zamanda azot fiksasyonu ile toprak verimliliğine de katkı sağlamaktadır (Şehirali, 1988; Brockwell ve ark., 1995).

Nohut, Akdeniz havzasında ve Batı Asya'da, Hindistan ve Etiyopya'da geleneksel tarım açısından önemli bir baklagil bitkisidir (Weiss ve Zohary, 2011). Türkiye'nin Güney-Doğusu ve Suriye'nin kuzeyi nohudun gen merkezleri olarak belirlenmiştir (Ladizinsky ve Adler, 1976). Kültür nohudu tane iriliğine, şekline ve rengine göre "kabuli ve desi" olmak üzere iki farklı tipe sahiptir. Kabuli tip nohut tarımı Güney Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika'da, desi tip nohut tarımı ise Doğu Afrika ve Hindistan'da yapılmaktadır (Cingilli ve ark., 2005; Singh ve ark., 2008; Metin, 2012). Dünyada nohut üretimi FAO verilerine göre 17.2 milyon tondur ve ekimi 17.8 milyon hektarlık bir alanda yapılmaktadır (FAOSTAT 2018). Türkiye nohut üretiminde, Hindistan ve Avustralya'dan sonra 630 bin ton ile üçüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2018). Ancak üreticilerde mevcut olarak bulunan yerel çeşitlerden istenildiği gibi verim ve kalite alınamaması nohut tarımı için genel bir sorun teşkil etmektedir (Yorgancılar ve ark., 2008).

Genetik çeşitlilik çalışmaları, bitki gen kaynaklarının korunması, genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve ıslah çalışmaları için oldukça önemlidir (De Giovanni ve ark., 2017). Bunun için DNA polimorfizmine dayanan RAPD, AFLP, SSR, ISSR ve SNP'ler gibi çeşitli dominant ve kodominant markörler kullanılmaktadır (De Giovanni ve ark., 2017). Mikrosatellitler ya da SSR (Simple Sequence Repeat) markörler genomda bol miktarda bulunması, polimorfik olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, kodominant özelliğe sahip olması nedeni ile moleküler markörler arasında önemli bir yere sahiptir (Varshney ve ark., 2005; Miah ve ark., 2013). SSR'lar 2-6 nükleotid uzunluğunda, genomun kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde yer alan PCR temelli markörlerdir. SSR'lar, baz çifti sayısına (di-, tri-, tetra-, penta- veya heksanukleotidler), tekrar motiflerinde nükleotidlerin düzenlenmesine (mükemmel, mükemmel olmayan ve bölünmüş) ve genom konumlarına (çekirdek (nuSSR), mitokondriyal (mtSSR) veya kloroplastik (ctSSR)) bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kalia ve ark., 2011). SSR markörler, haritalama çalışmaları, genetik karakterizasyon ve çeşit analizi, taksonomik ve filogenetik çalışmalar, markör destekli seleksiyon, popülasyon genetiği gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Kültür nohudu çeşitlerinde daha önce RAPD (Sudupak ve ark., 2002; Rao ve ark., 2007; Mandal ve ark., 2017), RFLP (Udupa ve ark., 1993), ISSR (Rajesh ve ark., 2003; Rao ve ark., 2007), SSR (Tar'an ve ark., 2007; Saeed ve ark., 2011) ve AFLP (Shan ve ark., 2005) markörleri kullanılarak varyasyon ve genetik ilişkinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Türkiye'de yerel ve tescilli nohut çeşitleri kullanılarak yapılan çalışmalar bulunmakla birlikte (Metin, 2012; Atalay ve Babaoğlu, 2012; Çevik ve ark., 2015), tescilli nohut çeşitlerine her geçen gün yenilerinin eklenmesi, yeni geliştirilen bu çeşitlerin korunması açısından genetik karakterizasyon çalışmalarını elzem kılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde 2011 yılından sonra tescil edilen ve daha önce karakterizasyonu yapılmamış tescilli çeşitlerin genetik benzerlik ilişkisini SSR markörler kullanarak belirlemek, ıslah çalışmalarına ve diğer genetik tabanlı çalışmalara katkıda bulunmaktır.

**MATERYAL ve YÖNTEM****Bitki Materyali ve DNA İzolasyonu**

Bu çalışmada, farklı enstitülerce tescil edilen 10 adet tescilli nohut çeşidi kullanılmıştır (Çizelge 1). DNA izolasyonu için, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda 24 °C sıcaklıkta yetiştirilen nohut bitkilerinin aynı çeşide ait 5 bitkinin toprak üstü kısımları toplanarak sıvı azotla ezilmiş ve Lefort ve ark. (1998) tarafından geliştirilen protokole göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) cihazında DNA'ların saflıkları ve konsantrasyonları belirlenmiştir.

**Çizelge 1.** Farklı enstitülerden temin edilen tescilli ve yerel nohut çeşitleri

| No | Çeşit Adı | Temin Edilen Tescil Merkezleri                        |
|----|-----------|---|
| 1  | Hasanbey  | Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü   |
| 2  | Seçkin    | Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü   |
| 3  | Aslanbey  | Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü   |
| 4  | İlgaz     | Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü   |
| 5  | Tavas     | Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü   |
| 6  | Arda      | GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi |
| 7  | Çakır     | Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Merkezi               |
| 8  | Akça      | Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Merkezi               |
| 9  | Sezenbey  | Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü      |
| 10 | Zuhal     | Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü      |

**SSR Analizleri**

SSR reaksiyonları için literatür taraması sonucunda seçilen 15 SSR markörü TA89, TA96, TAA170, GA20 (Winter ve ark., 1999), AGLC55, AGLC74, AGLC98 (Buhariwalla ve ark., 2005), CESSRDB18, CESSRDB47 (Choudhary ve ark., 2008), ICCM0001b, ICCM0010b, ICCM0120a, ICCM0192a, ICCM0242a, ICCM0272b kullanılmıştır (Nayak ve ark., 2010) (Çizelge 2).

Genetik çeşitlilik analizi için Schuelke (2000) tarafından geliştirilen M13-işaretli primer yöntemi kullanılmıştır ve her ileri primerin 5' ucuna M13 (-21) (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) evrensel dizisi eklenmiştir. PCR reaksiyonları, 20 ng genomik DNA, 0.1 µM SSR primeri, 0.1 µM M13 işaretli primeri, 0.2 mM dNTP, 1X DreamTaq Green Buffer (2mM MgCl<sub>2</sub> içerir) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5u DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) içerecek şekilde 15 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu koşulları 94 °C'de 3dk, 94 °C'de 1dk Tm°C -1dk, 72 °C'de 2dk. 35 döngü ve takiben 94 °C'de 1dk. 53 °C'de 1dk. 72 °C'de 2dk. 8 döngü ve son olarak 72 °C -10dk olarak Bio-Rad T100 thermocycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforez ile kontrol edilmiştir.

PCR reaksiyonları için, HEX, FAM ve ROX floresan boya ile işaretlenmiş M13 (-21) primeri kullanılarak kapilleri elektroforez yüklemeleri için üçerli gruplar oluşturulmuştur. Bunun için, PCR ürünleri işaretlemede kullanılan floresan boyalara göre farklı oranlarda (1:5, 1:10 gibi) seyreltilmiş, üzerlerine 0.2-0.5µl Gene Scan™ 600 LIZ® size standart eklenerek yükleme buffer (Hi-Di™ Formamide) ile 10 µl'ye tamamlanarak 95 °C'de 5dk denatüre edilmiştir. Denatüre edilen karışım Applied Biosystems® 3500 Genetik Analiz Sisteminde elektroforez edilmiştir. Daha sonra GENEMAPPER (Applied Biosystems) yazılım programı kullanılarak her bir lokusa ait pikler değerlendirilmiş, istatistik analizleri için hazır hale getirilmiştir.

**Çizelge 2.** Tescilli ve yerel nohut genotiplerinin karakterizasyonu için kullanılan SSR markör bilgileri

| Lokus      | Primer Dizisi (5' → 3')      | Uzunluk (Bç) | Tm (°C) |
|------------|------------------------------|--------------|---------|
| ICCM0001bF | TGCACAACGGCTATGTCTTC         | 118          | 60      |
| ICCM0001bR | GAGGTGAGCTGAAGTGAGGC         |              |         |
| ICCM0010bF | ACGCCAATTCTTTTGAGCAC         | 142          | 58      |
| ICCM0010bR | TCAGCACTGGTGGAAACCATA        |              |         |
| ICCM0120aF | TGTCTCGATAAAGAGTTTGTTATTTTTC | 220          | 58      |
| ICCM0120aR | CGTTTTGTTTCATATTCAAACCTCG    |              |         |
| ICCM0192aF | GCTGCCCAAATTTTGACATTA        | 279          | 50      |
| ICCM0192aR | CCGGGGATCAAATTCCTTCTT        |              |         |
| ICCM0242aF | TGCATTCATCTGTTTCGCTC         | 263          | 50      |
| ICCM0242aR | GAAAATATTTGTGGTTATCCGATTTT   |              |         |
| ICCM0272bF | CGCGGTTGAGTTAGAGTGGT         | 175          | 55      |
| ICCM0272bR | CAAATCGGGGATTTTGTTTG         |              |         |
| AGLC55F    | CAGGTCGCGTTGTTGCA            | 225          | 60      |
| AGLC55R    | GGCCGAGGTACACTTTTCCA         |              |         |
| AGLC74F    | CGTGGGATTGAAAAAGTTGCTA       | 400          | 62      |
| AGLC74R    | CACTACCAGCCAAAGCACTCA        |              |         |
| AGLC98F    | CTCTTTCTTTCCCTCTAGTTTCCA     | 405          | 62      |
| AGLC98R    | CGGCGAACTCGTGTGTTGCTA        |              |         |
| CESSRDB18F | TGCAAATAAAGCCTTCAAGT         | 242          | 50      |
| CESSRDB18R | GAAAGTGGGAAAATGCAATA         |              |         |
| CESSRDB47F | ACGAAGAAAGTTCCTGTGAA         | 240          | 50      |
| CESSRDB47R | ACCGAAAACCTGATTCATTA         |              |         |
| TA89F      | ATCCTTCACGCTTATTTAGTTTTTACA  | 233          | 58      |
| TA89R      | CAAGTAAAAGAGTCACTAGACCTCACA  |              |         |
| TA96F      | TGTTTTGGAGAAGAGTGATTC        | 275          | 48      |
| TA96R      | TGTGCATGCAAATTCCTACT         |              |         |
| TAA170F    | TATAGAGTGAGAAGAAGCAAAGAGGAG  | 259          | 50      |
| TAA170R    | TATTTGCATCAATGTTCTGTAGTGT    |              |         |
| GA20F      | TATGCACCACCTCGTACC           | 174          | 55      |
| GA20R      | TGACGGAATTCGTGATGTGT         |              |         |

Bç:baz çifti

### İstatistik Analizleri

Seçilen SSR markörleri için beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ), gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ) ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC) hesaplanmıştır. Beklenen heterozigotluk ( $H_e=1-\sum p_i^2$ ) (Nei, 1973), gözlenen heterozigotluk direkt sayımdan ve polimorfizm bilgi içeriği ( $PIC=1-\sum p_i^2-\sum p_j^2$ ) (Botstein ve ark., 1980) PowerMarker v.3.25 (Liu ve Muse, 2005) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Genetik benzerlik ilişkilerini gösteren dendogram, genetik benzerlik matriksinden, Neighbour-joining ve UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic average) kullanılarak MEGA6 (Tamura ve ark., 2007) ve PowerMarker software programları ile oluşturulmuştur.

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, 10 nohut çeşidi 15 SSR markörü kullanılarak analiz edilmiştir (Çizelge 2). Çalışmada kullanılan markörler, farklı araştırmacılar tarafından geliştirilen ve yüksek polimorfizm gösteren markörlerden seçilmesine rağmen bu çalışmada toplamda 6 markör polimorfizm göstermiş ve analizlerde kullanılmıştır. Winter ve ark. (1999) tarafından kültür nohudu ILC3279 çeşidi kullanılarak geliştirilen TA89, TA96, TAA170 ve GA20 markörleri, markörlerin geliştirildiği çalışmada 6 kültür çeşidi ve 2 adet yabancı (*C. reticulatum* Ladiz. ve *C. echinospermum* P. H. Davis.) nohut hattında test

edilmiş ve polimorfik bulunmuştur. Ancak, geliştirilen TA96 bu çalışmada amplifiye olmamıştır. Aynı çalışmada geliştirilen TA89, TAA170 ve GA20 lokuslarının ise polimorfizm oranları benzer şekilde yüksek bulunmuştur. Buhariwalla ve ark. (2005), tarafından geliştirilen ve yine yüksek polimorfizm gösterdiği için seçilen markörlerden AGLC74 ve AGLC98 lokuslarının monomorfik olması ve AGLC55 lokusunun ise çok bant vermesi nedeni ile çalışmadan çıkartılmıştır. Choudhary ve ark. (2008) tarafından geliştirilen polimorfik markörlerden seçilen CESSRDB18 ve CESSRDB47 markörleri ise monomorfik bulunmuştur. Nayak ve ark. (2010) tarafından kültür nohudu ICC 4958'de geliştirilen SSR markörlerinden seçilen ICCM0001b, ICCM0010b, ICCM0120a, ICCM0192a, ICCM0242a, ICCM0272b markörlerinin tamamı yüksek polimorfizm göstermesine rağmen, bu çalışmada ICCM0001b, ICCM0010b, ICCM0272b markörlerinin monomorfik olduğu görülmüştür.

Polimorfizm gösteren 6 SSR lokusu kullanılarak 10 nohut genotipinden toplamda 29 allel üretilmiştir. Locus başına düşen allel sayısı 3 ile 6 arasında olup, ortalama değerinin 4.83 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). Saeed ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 44 nohut çeşidinde 16 SSR markörü kullanılmış toplam allel sayısının 100, locus başına allel sayısının 2 ile 13 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 6.75 olduğu bildirilmiştir. Kültür nohudunda yapılan diğer bir çalışmada, 29 nohut çeşidi 10 SSR markörü kullanılarak analiz edilmiş, toplam polimorfik allel sayısı 122, locus başına allel sayısı 3 ile 28 arasında değiştiği ve ortalama 12.2 olduğu bildirilmiştir (Atalay ve Babaoğlu, 2012). Diğer bir çalışmada, 23 kültür nohudu ve yabani türe ait 2 hat (*C. reticulatum*), 10 SSR markörü kullanılarak analiz edilmiş ve toplam 58 allel üretilmiştir. Locus başına allel sayılarının 2 ile 11 arasında değiştiği ve ortalama değerin 5.8 olduğu bildirilmiştir (Çevik ve ark., 2015). Ek olarak, 22 SSR markörü 103 nohut çeşidini (*C. arietinum*) kullanarak yaptıkları çalışmada locus başına düşen allel sayılarının 2 ile 26 arasında değiştiği ve ortalama değerin 9.91 olduğu bildirilmiştir (De Giovanni ve ark., 2017). Farklı bir çalışmada, 51 nohut çeşidinde 30 SSR markörü kullanılarak yapılan çalışmada 28 SSR markörün polimorfik olduğu belirlenmiş ve polimorfik olan 28 SSR markörün toplam allel sayısı 217, locus başına düşen allel sayısı 6 ile 12 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 7.75 olduğu bildirilmiştir (Samyuktha ve ark., 2018). Afzal ve ark. (2018) tarafından 52 nohut çeşidinde 60 SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) ve 40 SSR markörü kullanarak yaptıkları bir çalışmada 7 SSR markörün polimorfik olduğu bildirilmiştir. Polimorfik olan 7 SSR markörün toplam allel sayısı 20, locus başına düşen allel sayısının ise 2 ile 5 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 2.85 olduğu bildirilmiştir. Vashist ve ark. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 50 nohut çeşidinde 102 SSR markörü kullanılmış olup polimorfik allel sayısı 184 ve monomorfik allel sayısı 35 olmak üzere toplamda 219, locus başına düşen polimorfik allel sayısı 0 ile 7 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının  $2.14 \pm 0.14$  olduğu bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada, 57 nohut çeşidi 24 SSR markörü ile analiz edilmiş, 10 SSR markörünün polimorfik olduğu belirlenmiştir. Polimorfizm gösteren bu markörlerden toplam 51 allel üretilmiştir. Locus başına düşen allel sayısının 3 ile 9 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 5.1 olduğu bildirilmiştir (Valadez-Moctezuma ve ark., 2019). Seyedimoradi ve ark. (2019) 167 nohut çeşidinde yaptıkları çalışmada 60 SSR markörü kullanılmış olup 37 SSR markörün polimorfik olduğu belirlenmiş ve polimorfik olan 37 SSR markörün toplam allel sayısı 110, locus başına düşen allel sayılarının 2 ile 6 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 3 olduğu bildirilmiştir. Son olarak, 54 nohut çeşidinde 9 SSR, 1 SCAR (Sequence Characterised Amplified Region) ve 1 Gen-Spesifik markörleri olmak üzere toplamda 11 markör kullanılarak yapılan bir çalışmada 9 SSR markör analizinde toplam 87 allel üretilmiştir. Locus başına düşen polimorfik allel sayılarının 2 ile 24 arasında değiştiği ve ortalama allel sayısının 9.6 olduğu bildirilmiştir (Belle mou ve ark., 2020). Yaptığımız çalışma sonucunda locus başına ve ortalama allel sayısı açısından yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde edilen veriler, Afzal ve ark. (2018) ve Vashist ve ark. (2019) tarafından yapılan

çalışmalardan yüksek, De Giovanni ve ark. (2017), Samyuktha ve ark. (2018), Atalay ve Babaoğlu (2012), Valadez-Moctezuma ve ark. (2019) ve Bellemou ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmalardan düşük, Saeed ve ark. (2011), Çevik ve ark. (2015) ve Seyedimoradi ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışma ile benzer bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardaki farklılığın, kullanılan markör sayısı ve popülasyonun büyüklüğüne göre değişiklik gösterdiği düşünülmektedir.

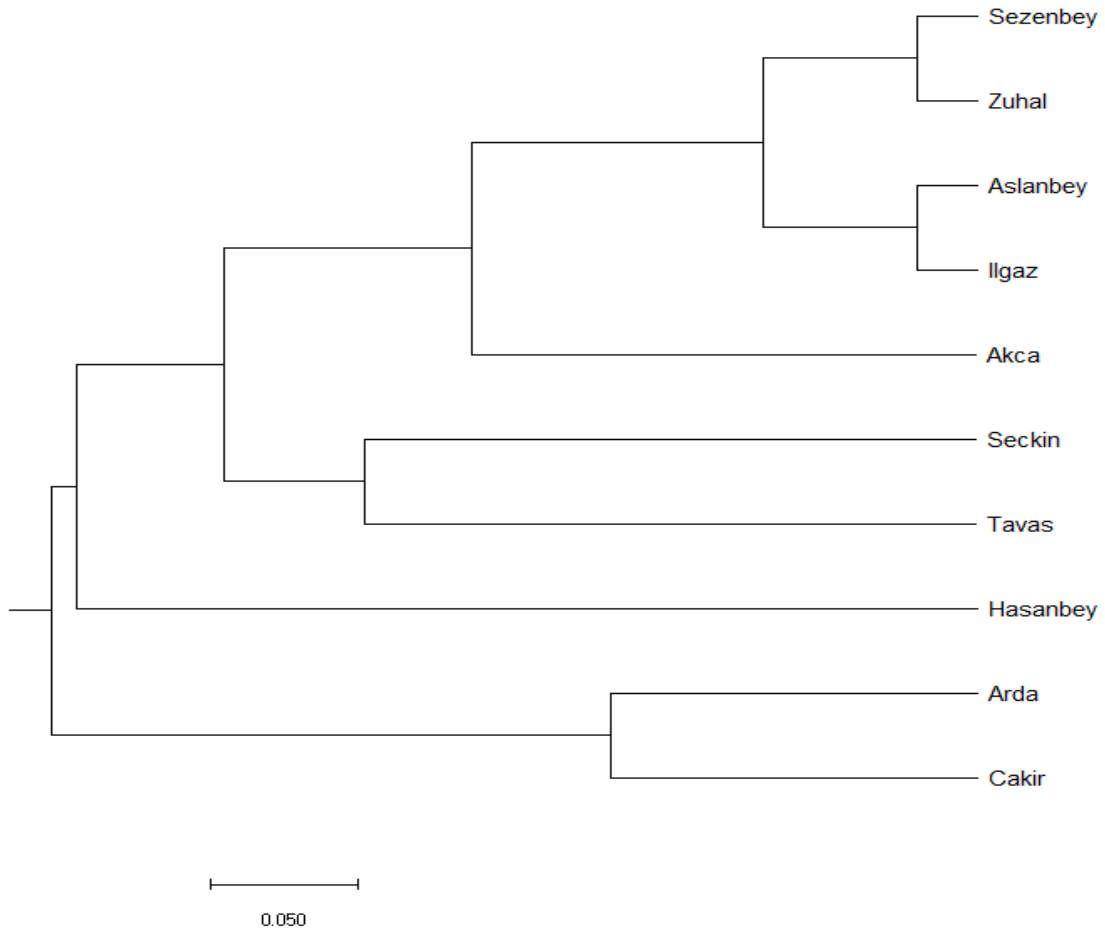
**Çizelge 3.** SSR markörleri için genetik parametreler, allel sayısı (n), beklenen heterozigot ( $H_e$ ) ve gözlenen heterozigot ( $H_o$ ), PIC (polimorfizm bilgi içeriği)

| Lokus           | n    | $H_e$ | $H_o$ | PIC  |
|-----------------|------|-------|-------|------|
| ICCM0120a       | 4    | 0.62  | 0.10  | 0.56 |
| ICCM0192a       | 6    | 0.67  | 1.00  | 0.63 |
| ICCM0242a       | 6    | 0.72  | 0.70  | 0.68 |
| TA89            | 6    | 0.77  | 0.30  | 0.74 |
| TAA170          | 3    | 0.46  | 0.00  | 0.41 |
| GA20            | 4    | 0.48  | 0.00  | 0.45 |
| <b>Toplam</b>   | 29   | 3.72  | 2.10  | 3.46 |
| <b>Ortalama</b> | 4.83 | 0.62  | 0.35  | 0.58 |

Yapılan çalışmada beklenen heterozigotluk değerinin 0.77 (TA89) ile 0.46 (TAA170) arasında değiştiği ve ortalama değer 0.62 olduğu tespit edilmiştir. Gözlenen heterozigotluk değerinin ise 1.00 (ICCM0192a) ile 0.00 (TAA170 ve GA20) arasında değiştiği ve ortalama değer 0.35 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). Saeed ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada beklenen heterozigotluk değerinin 0.85 ile 0.44 arasında değiştiği ve ortalama değer 0.69 olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada gözlenen heterozigotluk değerinin 0.89 ile 0.00 arasında değiştiği ve ortalamanın 0.36 olduğu görülmüştür. Diğer bir çalışmada, heterozigotluk oranının 0.23 ile 0.42 arasında değiştiği ve ortalamanın 0.31 olduğu bildirilmiştir (Atalay ve Babaoğlu, 2012). Çevik ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise beklenen heterozigotluk oranının 0.11 ile 0.84 arasında değiştiği ve ortalama 0.58 olduğu görülmüştür. Bu çalışmada gözlenen heterozigotluk 0.04 ile 1.00 arasında değiştiği ve ortalamanın 0.34 olduğu görülmüştür. Afzal ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada beklenen heterozigotluk değerinin 0.34 ile 0.63 arasında değiştiği ve ortalama değer 0.48 olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada gözlenen heterozigotluk 0.18 ile 0.78 arasında değiştiği ve ortalamanın 0.45 olduğu görülmüştür. Seyedimoradi ve ark. (2019) tarafından yapılan başka bir çalışmada, beklenen heterozigotluk oranının 0.33 ile 0.83 arasında değiştiği ve ortalama 0.59 olduğu görülmüştür. Gözlenen heterozigotluk oranının ise 0.07 ile 0.67 arasında değiştiği ve ortalama 0.35 olduğu görülmüştür. Bellemou ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada beklenen heterozigotluk değerinin 0.00 ile 0.167 ve ortalama 0.072 olduğu görülmüştür. Bu çalışmada gözlenen heterozigotluk değerinin ise 0.000 ile 0.333 arasında değiştiği ve ortalamanın 0.144 olduğu bildirilmiştir. Heterozigotluk oranlarına göre bu çalışma Saeed ve ark. (2011), Seyedimoradi ve ark. (2019) ve Afzal ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmalar ile benzer, Atalay ve Babaoğlu (2012) ve Çevik ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmalara göre yüksek, Bellemou ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmaya göre düşük bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerinin 0.74 (TA89) ile 0.41 (TAA170 ve GA20) arasında değiştiği ve ortalama 0.58 olduğu tespit edilmiştir. ICCM0192a, ICCM0242a ve TA89 markörü 6 allel ile en fazla allel sayısına sahip markörler olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Nayak ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmadan seçilen ICCM0192a, ICCM0242a, ICCM0120a markörleri sırası ile 11, 8, 12 allel üretirken bu çalışmada bu markörler sırası ile 6, 6, 4 allel üretmiştir. Saeed ve ark.

(2011) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.44 ile 0.84 arasında değiştiği ve ortalama değerin 0.80 olduğu bildirilmiştir. Atalay ve Babaoğlu (2012) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.89 ile 0.70 arasında değiştiği ve ortalama değerin 0.80 olduğu tespit edilmiştir. Samyuktha ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ortalama PIC değeri 0.75 olup, maksimum PIC değerini 0.85 ve minimum PIC değerini ise 0.53 olduğu sonucuna ulaşılmıştır. TA89 markörünün ortak kullanıldığı çalışmada bu markör 6 allel üretmiştir. Afzal ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.28 ile 0.55 arasında değiştiği ve ortalama değerin 0.40 olduğu bildirilmiştir. Vashist ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.20 ile 1.00 arasında değiştiği ve ortalama değerin  $0.62 \pm 0.02$  olduğu bildirilmiştir. Valadez-Moctezuma ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.56 ile 0.82 arasında değiştiği ve ortalama değerin 0.70 olduğu bildirilmiştir. Seyedimoradi ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.80 ile 0.27 arasında değiştiği ve ortalama değerin 0.51 olduğu bildirilmiştir. TA89, GA20 ve CESSRDB47 markörlerinin ortak kullanıldığı çalışmada bu markörler sırası ile 4, 3, 3 allel üretmiştir. Bellemou ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada PIC değerinin 0.63 ile 0.99 arasında değiştiği ve ortalama değerin 0.92 olduğu bildirilmiştir. PIC değerleri Atalay ve Babaoğlu (2012), Valadez-Moctezuma ve ark. (2019) ve Bellemou ve ark. (2020)'nin yaptıkları çalışmadan düşük, Saeed ve ark. (2011), Samyuktha ve ark. (2018), Afzal ve ark. (2018), Vashist ve ark. (2019) ve Seyedimoradi ve ark. (2019)'nin yaptıkları çalışma ile yaklaşık değerlerde bulunmuştur.



**Şekil 1.** Çalışmada kullanılan 10 nohut çeşidine ait 6 polimorfik SSR markörü kullanılarak oluşturulan genetik ilişki dendogramı

Altı SSR markörü ile Neighbour-joining ve UPGMA kullanılarak oluşturulan genetik benzerlik matrisine ait dendrogramda 10 genotipin iki farklı gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 1). İlk grupta Arda ile Çakır çeşitlerinin yer aldığı, geri kalan çeşitlerin ise ikinci grubu oluşturduğu görülmüştür. İkinci grupta yine kendi içinde 2 gruba ayrılmıştır.

Aynı enstitülerce geliştirilen ve tescil edilen çeşitler arasında genetik benzerlik açısından benzerlik oranı en yüksek çeşitlerin Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Sezenbey ile Zuhul (%96) ve Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Ilgaz ile Aslanbey (%96) çeşitlerin olduğu görülmüştür (Çizelge 4). Farklı enstitüler tarafından tescil edilen çeşitler arasında birbirlerine en yakın olan çeşitler ise, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Sezenbey ile Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Ilgaz (%92) ve Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Sezenbey ile Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Aslanbey (%92) olduğu tespit edilmiştir. Aynı Enstitü tarafından geliştirildiği halde benzerlik oranları en düşük çeşitler ise, Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Seçkin ile Hasanbey (%33), Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Merkezi tarafından tescil edilen Çakır ile Akça (%33) çeşitleri olarak belirlenmiştir. Farklı Enstitüler tarafından tescil edilen çeşitler arasında birbirlerine en uzak olan çeşitler ise, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Merkezi tarafından tescil edilen Akça ile Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilen Seçkin (%21) çeşitleri olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.** Çalışmada kullanılan 10 nohut çeşidine ait genetik benzerlik indeksi

|          | Akca | Arda | Aslanbey | Cakir | Hasanbey | Ilgaz | Seckin | Sezenbey | Tavas | Zuhul |
|----------|------|------|----------|-------|----------|-------|--------|----------|-------|-------|
| Akca     | 1.00 |      |          |       |          |       |        |          |       |       |
| Arda     | 0.33 | 1.00 |          |       |          |       |        |          |       |       |
| Aslanbey | 0.63 | 0.42 | 1.00     |       |          |       |        |          |       |       |
| Cakir    | 0.33 | 0.75 | 0.42     | 1.00  |          |       |        |          |       |       |
| Hasanbey | 0.33 | 0.25 | 0.42     | 0.25  | 1.00     |       |        |          |       |       |
| Ilgaz    | 0.63 | 0.38 | 0.96     | 0.38  | 0.38     | 1.00  |        |          |       |       |
| Seckin   | 0.21 | 0.54 | 0.54     | 0.38  | 0.33     | 0.50  | 1.00   |          |       |       |
| Sezenbey | 0.71 | 0.38 | 0.92     | 0.38  | 0.38     | 0.92  | 0.46   | 1.00     |       |       |
| Tavas    | 0.42 | 0.42 | 0.67     | 0.42  | 0.54     | 0.63  | 0.58   | 0.58     | 1.00  |       |
| Zuhul    | 0.67 | 0.33 | 0.79     | 0.33  | 0.33     | 0.79  | 0.38   | 0.96     | 0.50  | 1.00  |

## SONUÇ

Sonuç olarak; 10 nohut çeşidinin 15 SSR markörü arasından polimorfizm gösteren 6 SSR markörü ile genetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu markörler nohutta ileriye dönük genetik analiz çalışmalarında tercih edilebilir nitelikte bulunmuştur. Analizler sonucu, aynı enstitülerce geliştirilen bazı çeşitlerin benzerlik oranının oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçların genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Afzal M, Alghamdi SS, Migdadi HM, Khan MA, Farooq M, 2018. Morphological and Molecular Genetic Diversity Analysis of Chickpea Genotypes. *International Journal of Agriculture & Biology*, 20: 1062–1070.
- Arumuganathan K, Earle ED, 1991. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 208-218.
- Atalay E, and Babaoğlu M, 2012. Determination of Genetic Relationship in Turkish Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes Using SSR Molecular Markers and Capillary Electrophoresis, *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(2):369-375.



- Bellemou D, Millàn T, Gil J, Abdelguerf A, Laouar M, 2020. Genetic diversity and population structure of Algerian chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes: use of agro-morphological traits and molecular markers linked or not linked to the gene or QTL of interest. *Crop & Pasture Science*, 71, 155–170.
- Botstein D, White RL, Skolnick MH, Davies RW, 1980. Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32(3):314–33.
- Brockwell J, Bottomley PJ, Thies JE, 1995. Manipulation of Rhizobia Microflora for Improving Legume Productivity and Soil Fertility: a Critical Assessment-Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems. Springer Netherlands, No: 1/2, s. 143–180.
- Buhariwalla HK, Jayashree B, Eshwar K, Crouch JH, 2005. Development of ESTs From Chickpea Roots And Their Use in Diversity Analysis of the *Cicer* Genus. *BMC Plant Biology*, 5:16.
- Çevik S, Unyayar S, Ergül A, 2015. Genetic Relationships Between Cultivars of *Cicer arietinum* and Its Progenitor Grown in Turkey Determined by Using the SSR Markers. *Turkish Journal of Field Crops*, 20(1), 109-114.
- Choudhary S, Sethy NK, Shokeen B, Bhatia S, 2008. Development of Chickpea EST-SSR Markers and Analysis of Allelic Variation Across Related Species. *Theoretical and Applied Genetics*, 118:591–608.
- Cıngıllı H, Altınkut A, Akçın A, 2005. The Use of Microsatellite Markers in the Annual and Perennial *Cicer* Species Growing in Turkey, *Biologia, Bratislava*, 60(1):93-98.
- De Giovanni C, Pavan S, Taranto F, Di Rienzo V, Miazzi MM, Marcotrigiano AR, Mangini G, Montemurro C, Ricciardi L, Lotti C, 2017. Genetic Variation of a Global Germplasm Collection of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Including Italian Accessions at Risk of Genetic Erosion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 23(1):197-205.
- FAOSTAT 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Son erişim tarihi 22 Nisan 2020.
- Friedman M, 1996. Nutritional Value of Food Proteins from Different Food Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:6-29.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK, 2011. Microsatellite Markers: an Overview of The Recent Progress in Plants. *Euphytica*, 177:309-334.
- Ladizinsky G, Adler A, 1976. Genetic Relationships Among the Annual Species of *Cicer* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 48: 197-203.
- Lefort F, Lally M, Thompson D, Douglas GC, 1998. Morphological Traits, Microsatellite Fingerprinting and Genetic Relatedness of a Stand of Elite Oaks (*Q. robur* L.) at Tullynally Ireland. *Silvae Genetica*, 47:5–6
- Liu K, Muse SV, 2005. PowerMarker: an Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Analysis. *Bioinformatics*, 21:2128–2129.
- Mandal R, Pal S, Shit N, 2017. Unlocking Genetic Diversity in Selected Chickpea Genotypes using Morphological and Molecular Markers. *Current Agriculture Research Journal*, Vol. 5(1), 50-57.
- Metin A, 2012. Nohut Çeşitlerinde SSR Varyasyonu ve Genetik İlişkilerin Değerlendirilmesi, Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Miah G, Rafii MY, Ismail MR, Puteh AB, Rahim HA, Islam KN, Latif MA, 2013. A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 22499-22528.
- Nayak SN, Zhu H, Varghese N, Datta S, Choi HK, Horres R, Jüngling R, Singh J, Kavi Kishor PB, Sivaramakrishnan S, Hoisington DA, Kahl G, Winter P, Cook DR, Varshney RK, 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, 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:3321–3323.
- Rajesh PN, Sant VJ, Gupta VS, Muehlbauer FJ, Rajesh PK, 2003. Genetic Relationships Among Annual and Perennial Wild Species of *Cicer* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism. *Euphytica*, 129, 15-23.

- Rao AS, Usha Rani P, Deshmukh PS, Kumar PA, Panguluri SK, 2007. RAPD and ISSR Fingerprinting in Cultivated Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its Wild Progenitor *Cicer reticulatum* L. Genetic Resources and Crop Evolution, 54 (6): 1235- 1244.
- Saeed A, Hovsepian H, Darvishzadeh R, Imtiaz M, Panguluri SK, Nazaryan R, 2011. Genetic Diversity of Iranian Accessions, Improved Lines of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Their Wild Relatives by Using Simple Sequence Repeats, Plant Molecular Biology Reporter, 100(4): 433–440.
- Samyuktha SM, Kannan Babu JR, Geethanjali S, 2018. Molecular Genetic Diversity and Population Structure Analysis in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Germplasm using SSR Markers. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(2): 639-651.
- Schuelke M, 2000. An Economic Method for the Fluorescent Labelling of PCR Fragments. Nature Biotechnology, 18:233–234.
- Seydimoradi H, Talebi R, Kanouni H, Naji AM, Karami E, 2019. Agro-morphological description, genetic diversity and population structure of chickpea using genomic-SSR and ESR-SSR molecular markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 28(4):483–495.
- Shan F, Clarke HC, Plummer JA, Yan G, Siddique KHM, 2005. Geographical Patterns of Genetic Variation in the World Collections of Wild Annual *Cicer* Characterized by Amplified Fragment Length Polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 110(2), 381-391.
- Singh R, Sharma P, Varshney RK, Sharma SK, Singh NK, 2008. Chickpea Improvement: Role of Wild Species and Genetic Markers. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 25:267–314.
- Sudupak MA, Akkaya MS, Kence A, 2002. Analysis of Genetic Relationships Among Perennial and Annual *Cicer* Species Growing in Turkey using RAPD Markers. Theoretical and Applied Genetics, 105(8):1220-1228.
- Şehirli S, 1988. Yemelik Tane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1089, s. 314, Ankara- Türkiye.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24:1596–1599.
- Tar'an B, Warkentin T, Tullu A, Vandenberg A, 2007. Genetic Relationships Among Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes Based on the SSRs at the Quantitative Trait Loci for Resistance to Ascochyta Blight. European Journal of Plant Pathology, 119, 39–51.
- Udapa SM, Sharma A, Sharma AP, Pai RA, 1993. Narrow Genetic Variability in *Cicer arietinum* L. as Revealed by RFLP Analysis. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2: 83-86.
- Valadez-Moctezuma E, Cabrera-Hidalgo A, Arreguin-Espinosa R, 2019. Genetic variability and population structure of Mexican chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm accessions revealed by microsatellite markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 29(3):357–367.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME, 2005. Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications. TRENDS in Biotechnology, 23(1): 48-54.
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG, Cannon S, Baek J, Rosen BD, Tar'an B, Millan T, Zhang X, Ramsay LD, Iwata A, Wang Y, Nelson W, Farmer AD, Gaur PM, Soderlund C, Penmetsa RV, Xu C, Bharti AK, He W, Winter P, Zhao S, Hane JK, Carrasquilla-Garcia N, Condie JA, Upadhyaya HD, Luo MC, Thudi M, Gowda CL, Singh NP, Lichtenzweig J, Gali KK, Rubio J, Nadarajan N, Dolezel J, Bansal KC, Xu X, Edwards D, Zhang G, Kahl G, Gil J, Singh KB, Datta SK, Jackson SA, Wang J, Cook DR, 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. Nature Biotechnology, 31:240–246.
- Vashist U, Boora KS, Kumar M, 2019. Evaluation of Genetic Diversity Among Chickpea (*Cicer arietinum*) Genotypes Using PCR Based Simple Sequence Repeats Markers. The Pharma Innovation Journal, 8(2): 182-188.

- Weiss E, Zohary D, 2011. The Neolithic Southwest Asian Founder Crops. *Current Anthropology*, 52:4.
- Winter P, PfaV T, Udupa SM, Hüttel B, Sharma PC, Sahi S, ArrequinEspinoza R, Weigand F, Muehlbauer FJ, Kahl G, 1999. Characterization and Mapping of Sequence-Tagged Microsatellite Sites in the Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 262:90–101.
- Yorgancılar M, Atalay E, Bayrak H, Hakkı EE, Önder M, Babaoğlu M, 2008. ISSR Markörleri Kullanarak Konya Bölgesinden Toplanan Nohut (*Cicer arietinum* L.) Popülasyonları Arasında Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (46): 1-5.