

SSR MARKÖRLERİN MERCİMEK GENOM HARİTALAMASINDA KULLANILMASI**Abdullah Kahraman¹, Ümran Akgün Yıldırım², Melike Bakır³**¹Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa (0000 0002 8829 3797)²GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şanlıurfa (0000-0003-3843-1343)³Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri

Sorumlu yazar e-posta: umran__akgun@hotmail.com

Geliş (Received): 07.02.2019

Kabul (Accepted):25.02.2019

ÖZET

Bu çalışmada, mercimek (*Lens culinaris* Medik.) bitkisinin genomuna ait bağlantı (linkaj) haritasına SSR (Simple Sequence Repeats) markörlerinin katılımı amaçlanmıştır. Genom haritası oluşturulmasında WA8649041 ve Precoz ebeveynlerin çaprazlanmasıyla elde edilen 93 adet rekombinant saf hat (Rekombinant Inbred Lines, RILs) populasyonu kullanılmıştır. Çalışmada 175 SSR primeri kullanılmış, bu primerlerden 25 adedi polimorfik, 109 adedi monomorfik, 41 adedi çalışmamıştır. Polimorfik olduğu tespit edilen SSR markörlerinden, 13 adedi haritalanmış, haritalanan markörler, genetik bağlantı haritasında belirli bir kromozom veya grupta toplanmayıp farklı bağlantı gruplarına dağılmıştır. Hali hazırda mevcut 123 markörden oluşan genom haritasına (57 AFLP, 48 RAPD, 16 ISSR ve 2 morfolojik markör), bu çalışmayla 13 SSR markör ilave edilerek genom haritasındaki toplam markör sayısı 136 olmuştur. Genom haritası 11 bağlantı (linkaj) grubundan oluşmuş, toplam harita uzunluğu 1311.2 cM ve iki markör arası ortalama uzunluk 9.64 cM olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mercimek, Moleküler Markör, SSR (Basit Dizi Tekrarları), RIL (Rekombinant Saf Hat), Genom Haritası

ABSTRACT

The objective of this study was to integrate the SSR (Simple sequence Repeats) markers in lentil (*Lens culinaris* Medik.) genetic linkage map. To construct the linkage map, an F6 derived Recombinant inbred line (RIL) population with 93 lines developed from the cross of WA8649041 x Precoz was used. Linkage map was comprised of RAPD, ISSR, AFLP, ISSR and morphological markers. One hundred seventy five (175) SSR markers were used in the study. 25 SSR markers were polymorphic, while 109 SSR markers were monomorphic and 41 SSR markers did not work. SSR markers were distributed in different linkage groups rather than clustering in some linkage groups. Of the 21 SSR markers, 13 of them were mapped in lentil genome and the current genetic linkage map is comprised of 136 markers including 57 AFLP, 48 RAPD, 16 ISSR, 2 morphological and 13 SSR markers. Genetic linkage map is

comprised of 11 linkage groups with 1311.2 cM in length and average genetic distance between two markers is 9.64 cM.

Keywords: Lentil, Molecular Marker, SSR (Simple Sequence Repeats), RIL (Recombinant inbreed line), Linkage Map

GİRİŞ

Mercimek, Hindistan Yarımadası, Kuzey Afrika, Batı Asya, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Avustralya kıtası gibi geniş bir yetiştirilme alanına sahiptir. İçeriğindeki yüksek değerdeki proteinden ötürü insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Aynı zamanda, toprağa azot fikse edebilme yeteneğinden dolayı kuru tarımın yapıldığı alanlarda ikinci ürün olarak tahıllarla rotasyona dâhil edilebilmekte, toprağın yapısını iyileştirmektedir. Baklagiller familyasına ait kendine döllenmiş diploid ($2n=14$) tek yıllık serin iklim baklagil bitkisidir (Kumar ve ark. 2014). Yaklaşık 4Gb'lık oldukça büyük bir genoma sahip olan mercimeğin, genomunun genetik yapısının en iyi şekilde anlaşılabilmesi için çok sayıda moleküler markör ile etiketlenerek genetik bağlantı haritasının belirlenmesine ihtiyaç vardır (Tanyolaç ve ark. 2010).

Moleküler bağlantı haritaları, bitki moleküler genetiği ve ıslah araştırmaları için önemli bir araç haline gelmiştir. Son zamanlarda moleküler genetikte yaşanan gelişmeler bitki ıslahında geleneksel ıslaha oranla verim, adaptasyon, zararlı ve hastalık dirençli bitki geliştirilmesinde daha hızlı ve hassas bir yaklaşım sunmaktadır. Detaylı bir genetik bağlantı haritası ve araştırılan önemli karakterleri kontrol eden genlerin bitki genomundaki lokasyonlarının aydınlatılması, ıslah çalışmalarında oldukça önem taşımaktadır. Moleküler markörler genetik bağlantı haritalarının oluşturulmasında önemli araçlardır ve bitki türleri hakkında genetik bilginin artmasını sağlamışlardır (Hendre ve ark., 2007; Saha ve ark., 2013; Ates ve ark., 2018).

Mercimekte genetik bağlantı haritalarının oluşturulmasında morfolojik, izoenzim ve RFLP (Havey ve Muehlbauer, 1989), RAPD (Eujayl ve ark., 1998), AFLP (Eujayl ve ark., 1998), ISSR (Rubeena ve Taylor, 2003), SSR (Hamwieh ve ark., 2005), ITAP (intron-targeted amplified polymorphic) (Phan e ve ark., 2007) gibi gen bazlı farklı tip moleküler belirteçler kullanılmıştır. Mercimekte ilk genetik haritalama Havey ve Muehlbauer (1989) tarafından *L. cluniaris* ve *L. orientalisin* çaprazlanmasında RFLP markörü kullanılarak oluşturulmuştur. Bu harita, az sayıda markör kullanılarak gerçekleştirilmiş ve genomun küçük bir kısmını kapsamaktadır. Bu ilk çalışmanın ardından RFLP, RAPD, ISSR ve SSR gibi farklı moleküler markörlerin kullanıldığı mercimek genom haritaları oluşturulmuştur (Tahir ve ark., 1993; Eujayl ve ark., 1998; Duran ve ark., 2003; Rubeena ve Taylor, 2003; Hamwieh ve ark., 2005; Tullu ve ark., 2008; Tanyolaç ve ark., 2010; Saha ve ark., 2013; Kahraman ve ark., 2014; Ates ve ark., 2018). Ancak, tahıllar ve başlıca baklagil bitkileri ile karşılaştırıldığında, mercimekte moleküler markörlerin geliştirilmesi ve dağıtımı konusunda çalışmaların sınırlı kalması, mercimek genom haritalama çalışmalarını da sınırlandırmıştır.

Bağlantı haritalarının oluşturulmasında F₂, Geri melez (Backcross), F₁ populasyonları ve RIL (kendilenmiş hatlar) hatları gibi birçok segragasyon popülasyonları kullanılmaktadır. Haritalama çalışmalarında iyi bir bağlantı haritasının oluşturulmasında rekombinant saf hatlar çok iyi bir kaynaktır. RIL popülasyonları homolog başına iki kat daha fazla rekombinasyona ait bilgi içerir böylece kantitatif karakterlerin lokalizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca bu hatların bir diğer avantajı çok sayıda birey elde ederek tekrarlamalı çalışmalara izin vermesidir.

Mikrosatellitler veya SSR markörler, genellikle ökaryotik genomda 2-5 baz çifti uzunluğunda ve genom boyunca tekrarlanan dizilerdir. Eş baskın kalımları ve yüksek derecede polimorfizm göstermeleri sebebiyle bitkilerde genom haritalanmasında ve filogenetik analiz çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Röder ve ark., 1998; Winter ve ark., 1999; Cho ve ark., 2000; Toklu ve ark., 2009; Idrissi ve ark., 2015; Tsanakas ve ark., 2018).

Bu çalışmanın amacı, tek tohumaya dayalı (single seed descent) metotla 6 generasyon kendileme yapılarak elde edilen 101 adet rekombinant saf hatlardan (RIL, recombinant inbred lines) oluşan mercimek populasyonunda SSR markörlerinin mercimek genetik 1 haritasında kullanılması ve etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki Materyalleri

Çalışma materyali, Washington State Üniversitesi, Pullman, ABD den temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 101 adet rekombinant saf hat WA8649041 ile Precoz çeşidinin melezlemesinden tek tohumaya dayalı (single seed descent) metotla 6 generasyon kendileme yapılarak üretilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu

Her hattı temsilen yaklaşık 1-2 g civarında taze yaprak örnekleri çiçeklenme başlangıcında sürgün uçlarından alınarak sıvı azot içerisine alınmış ve laboratuvara getirilerek DNA izolasyonu aşamasına kadar -86°C derin dondurucularda muhafaza edilmiştir. Her bir RIL hattına ait olan yaprak örnekleri sıvı azot yardımı ile ezilmiştir. DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. DNA saflık ve kalitesini tayini için örnekler spektrofotometrede ölçülmüştür.

PCR Protokolü

PCR reaksiyonları 15 ng DNA, 10 pmol ileri ve geri primerler, 1X PCR buffer (2mM MgCl₂ içerir) , her bir dNTP'den 0.2 mM ve 1 U Tag DNA polimeraz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) enziminden oluşan 20µl'lik karışım hazırlanarak Bio-Rad Mycycler US cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü, Hamwieh ve ark. (2005), Rajesh ve ark. (2008), Duran ve ark. (2004) programlarına göre yapılmıştır. PCR işleminden sonra % 3 lük metaphore agaroz jelde elektroforez ile 100 Voltta serbest akımda yaklaşık olarak 180 dakika sürede ayrışması sağlanmıştır. Agaroz jel, EtBr kullanılarak boyanmış ve ultraviyole ışık altında gözlemlenmiştir.

SSR Analizleri

Mercimekte bugüne kadar 124 adedi Rajesh ve ark., (2008), 46 adedi Hamwieh ve ark., (2005), 5 adedi de Duran ve ark. (2004) tarafından olmak üzere 175 adet SSR primeri geliştirilmiştir. Bu primerlerden 35 adedi mercimek genetik haritalama çalışmalarında kullanılmıştır (Duran ve ark., 2004; Hamwieh ve ark., 2005). Bu çalışmada, öncelikle haritalanan 35 SSR primeri ve daha sonra da kalan 140 SSR primeri kullanılarak ebeveynler arasındaki genetik farklılıklar belirlenmiştir. Ebeveyn çeşitlerde polimorfik bulunan markörler kullanılarak, RIL hatları skorlanmış ve genetik harita oluşturulmuştur.

DNA Markörlerinin Skorlanması ve Bağlantı Haritasının Oluşturulması

Her bir RIL hattı için SSR primerlerine ait polimorfik bantlar, var olup olmama durumuna göre skorlanmıştır. Mercimek genetik bağlantı haritasının oluşturulmasında MAPMAKER V.2 (Lander ve ark., 1987) yazılım programı kullanılmıştır. Herhangi iki markör arasındaki genetik bağlantıyı (linkage) belirlemede LOD = 3 skoru alınarak, birbirleriyle bağlantılı olan markörlerin oluşturdukları gruplar ya da kromozomlar belirlenmiştir. Haritalama için markör uzaklıkları Kosambi (1944) fonksiyonu seçilerek yapılmıştır.

SONUÇLAR

SSR Primerleri Polimorfizm Analizleri

Çalışmada kullanılan 175 adet SSR primerinden 25 adedi polimorfik (14.3%), 109 adedi (62.3%) ise monomorfik olarak belirlenmiştir. 41SSR primeri (23.4%) için ise, herhangi bir amplifikasyon elde edilememiştir. Polimorfizm gösteren 25 SSR primerinden, 23 SSR primeri (13.14%) skorlanabilmiştir. Mümkün olduğunca yüksek sayıda SSR primerinin polimorfik olması ve haritada bulunması arzu edildiğinden her bir primer için çalışmalar tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait polimorfizm test sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan SSR primerlerine ait polimorfizm test sonuçları

Primerler	Test edilen	Polimorfik	Monomorfik	Çalışmayan	Skorlanan SSR
Hamwieh ve ark. (2005)	46	16	19	11	16
Rajesh ve ark. (2008)	124	8	86	30	6
Duran ve ark. (2004)	5	1	4	0	1
Toplam	175	25	109	41	23

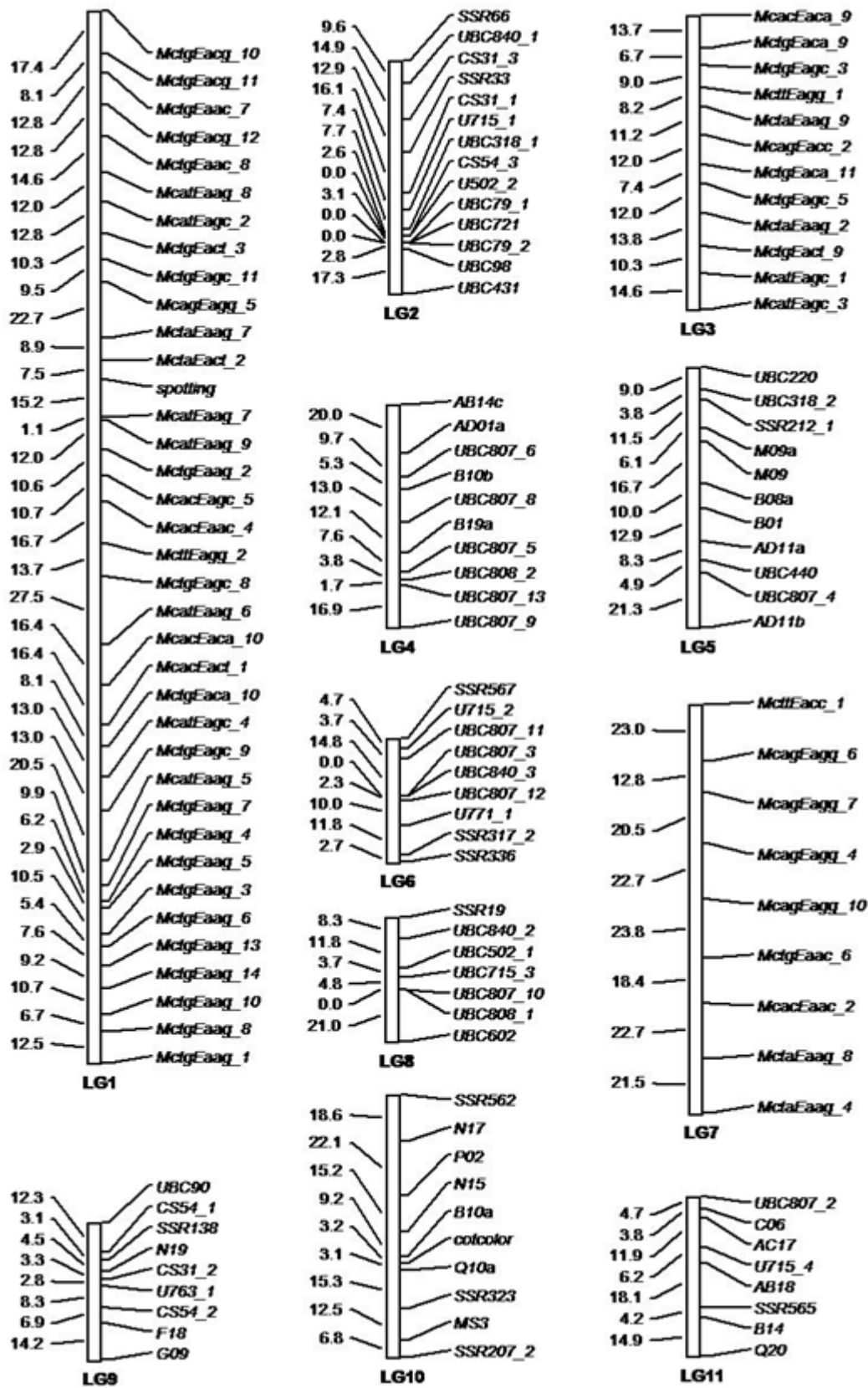
Polimorfizm testleri sonucunda, Hamwieh ve ark. (2005) tarafından geliştirilen 46 SSR primerinden, 16 adedi polimorfik, 19 adedi monomorfik ve 11 adedinin ise çalışmadığı tespit edilmiştir. Polimorfik SSR primerleri ile RIL hatları skorlanmıştır. Test edilen SSR primerinden 11 adedinin mono ya da polimorfik oldukları net olarak belirlenemediğinden çalışmayan primerler grubuna dahil edilmiştir. Duran ve ark. (2004), tarafından geliştirilen ve mercimek genom haritalamasında kullanılan 5 SSR primeri (MS1, MS3, MS6, MS11 ve MS5S), ebeveynler çeşitlerin polimorfizm testlerinde kullanılmış ve bu primerlerden sadece MS3 primeri polimorfik olarak değerlendirilmiş, diğerlerinin ise monomorfik olduğu belirlenmiştir. Rajesh ve ark. (2008) tarafından geliştirilen 124 SSR primerinden 8 tane SSR primerinin polimorfik olduğu belirlenmiş ve bunlardan 6 tanesi skorlanabilmiş, 86 SSR primeri monomorfik bulunmuş ve 30 tane SSR primeri çalışmamıştır.

Polimorfizm analizleri sonucunda, 23 SSR primeri (SSR19, SSR33, SSR66, SSR90, SSR107, SSR113, SSR138, SSR183-1, SSR183-2, SSR204, SSR207-1, SSR207-2, SSR212-1, SSR317-2, SSR323, SSR336, MS1, GLLC537, GLLC557, GLLC559, GLLC562, GLLC565 ve GLLC567) RIL hatlarında skorlanmış ve genetik haritalama analizlerinde kullanılmıştır. 2 SSR primeri net olarak skorlanamadığından değerlendirmeye alınmamıştır.

Genetik Bağlantı (Linkage) Harita Analizleri

Bağlantı analizleri sonucunda 23 SSR marköründen 13 SSR markörü değişik bağlantı gruplarında yer alırken (Şekil 1), 10 SSR markörü hiçbir bağlantı grubunda yer almamıştır. Mercimek genetik bağlantı haritası 11 bağlantı grubundan oluşmaktadır. LG1, LG3, LG4 ve LG7 grupları dışında diğer bağlantı gruplarında en az 1 SSR markörü bulunmaktadır. Bağlantı gösteren SSR primerlerinden SSR33 ve SSR 66 LG2 grubunda, SSR317-2, SSR336 ve SSR567 LG4 grubunda, LG4 grubunda, SSR565 LG5 grubunda, SSR212-1 LG6 grubunda, SSR 138 LG8, SSR19 LG 10 grubunda ve SSR207-2, SSR323, SSR567 ve MS3 LG 11 grubunda yer almıştır. SSR markörlerinin genomda farklı gruplarda dağılışı göstermesi istenilen bir sonuç olup, mercimekte geliştirilen diğer genetik haritalarla karşılaştırma imkânı sağlaması bakımından önemlidir. Genetik haritanın toplam uzunluğu 1311.2 cM olup, iki markör

arası ortalama uzaklık 9.64 cM ve ortalama kromozom uzunluğu 1311.2 cM olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. AFLP, RAPD, ISSR, SSR ve morfolojik markörlerinden oluşan mercimek genetik bağlantı haritası

TARTIŞMA

Mercimekte genetik haritaların oluşturulması, mercimek genomunun daha iyi anlaşılmasını mümkün kılmaktadır (Eujayl ve ark., 1998; Kahraman ve ark., 2004; Tanyolac ve ark., 2010, Saha ve ark., 2013; Ates ve ark., 2018). *Lens sp.*'de SSR markörleri kullanılarak gerçekleştirilen ilk genetik haritala çalışması Duran ve ark., (2004) tarafından yapılmış ve bu çalışmayı Hamwieh ve ark., (2005) tarafından 39 SSR primeri kullanarak gerçekleştirilen haritalama çalışması takip etmiştir. Duran ve ark., (2004) ile Hamwieh ve ark., (2005) çalışmalarında kullandıkları primerlerin polimorfizm oranı, aynı primerlerin kullanıldığı bu çalışmaya göre yüksek bulunmuştur. Farklı primerlerin kullanıldığı Gupta ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmada, mercimeğinde içinde olduğu baklagil türlerine ait SSR primerlerini içeren 766 SSR primeri ile haritalama çalışması yapılmış ve polimorfik primer yüzdesinin % 4.43, haritalanan markörlerin yüzdesinin ise %82.35 olduğunu bildirmiştir. Verma ve ark., (2015) ise, 146 adedi yayınlanmış toplamda 647 SSR primeri kullanılarak yaptığı haritalama çalışmasında, primerlerin % 33.8 oranında ebevenlerde polimorfizm gösterdiği, % 33.3'ünün ise haritalandığı bildirmiştir. Yapılan bu çalışma ile karşılaştırıldığında, tespit edilen polimorfizm yüzdesi Gupta ve ark., (2012)'a göre yüksek bulunurken, Verma ve ark., (2015)'a göre düşük bulunmuştur. ve Haritalanan markörlerin yüzdesi ise, Gupta ve ark., (2012)'a göre düşük bulunurken, Verma ve ark., (2015)'a göre yüksek bulunmuştur. Çalışmada kullanılan primerler kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, Rajesh ve ark., (2008) tarafından geliştirilen SSR primerlerinin polimorfizm oranının (% 6.45), Duran ve ark. (2004) ile Hamwieh ve ark., (2005) tarafından geliştirilen SSR primerlerinin polimorfizm oranını göre düşük olduğu bulunmuştur (sırasıyla, % 20 ve % 34.8). Andeden ve ark., (2015), yeni geliştirdikleri mercimek SSR primerleri ile Hamwieh ve ark., (2005) tarafından geliştirilen SSR primerlerini bağlantı haritasının oluşturmasında kullanmışlar ve ebevenlerde görülen toplam polimorfizm oranını %18 olarak bildirmişlerdir. Yeni geliştirilen primerlerin %79'unu haritalamışlardır. Elde edilen sonuçlar, bu çalışmaya göre yüksek bulunmuştur. Mercimek genomunda, moleküler markörlerin polimorfizm seviyesinin yüksek olduğu gözlemlenmesine rağmen (Kahraman ve ark., 2004; Hamwieh ve ark., 2005; Saha ve ark., 2013; Ates ve ark., 2018), bu çalışmada SSR primerlerinden beklenen polimorfizm oranı sağlanamamıştır. Bu durumun kullanılan populasyonun genetik yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

WA8649041 x Precoz melezinden elde edilen RIL populasyonunda hâlihazırda genetik bağlantı haritası çalışmaları yürütülmekte olup, bu haritada güncel olarak 123 markör (57 AFLP, 48 RAPD, 18 ISSR ve 2 morfolojik) bulunmaktadır. Bu çalışma ile 13 SSR markörü mercimek genomunda haritalanmıştır. Elde edilen genetik haritanın toplam uzunluğu 1311.2 cM olup, iki markör arası ortalama uzaklık 9.64 cM ve ortalama kromozom uzunluğu 1311.2 cM olarak belirlenmiştir. Çalışılan SSR markörlerinin mercimek genomunda toplu olmaktan ziyade genomda dağılım gösterdikleri görülmüştür. SSR markörlerinin genomda farklı gruplarda dağılım göstermesi, mercimekte geliştirilen diğer genetik haritalarla karşılaştırma imkânı sağlaması açısından önemlidir. Bu durum, mercimekte yeni SSR markörlerinin geliştirilmesi ile orantılıdır.

KAYNAKLAR

Kumar, S., Hamwieh, A., Manickavelu, A., Kumar, J., Sharma, T., R., And Baum, M. 2014. Advances In Lentil Genomics.6, 111 Springer Science Business Media

Tanyolac, B., Ozatay, Ş., Kahraman, A., And Fred Muehlbauer. 2010. Linkage mapping of lentil (*Lens culinaris* L.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*. 2(1); 001-006

Muehlbauer, F., J., Cho S, Sarker A, Ford R 2006. Application of modern technologies in lentil breeding for biotic and abiotic stress resistance. *Euphytica* 147:149–165

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

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

Rubeena, R., Taylor, W. J., Ford, P. And Ades, P. K., 2006. QTL Mapping of Resistance in Lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) to *Ascochyta* Blight (*Ascochyta lentis*), *Plant Breeding* 125, 506-512.

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

Tahir, M., Erksine, W., Hussan, A., Baksh, A., Ellis, R. H., Summerfield, R. J., And Roberts, E. H., 1993. Field Evaluation of a Model of Photothermal Flowering Responses in a World Lentil Collection. *Theor. Appl. Genet* 88: 423-428

Tullu, A., Tar'an, B., Warkentin, T., And Vandenberg, A., 2008. Construction of an Intraspecific Linkage Map and QTL Analysis for Earliness and Plant Height in Lentil. *Crop Sci* 48:2254-2264.

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

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

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

Kosambi D. D., 1944, The Estimation of map distances from recombination values, *Eugene* 12: 172-177

Kahraman, A., Kusmenoğlu, I., Aydın, N., Aydoğan, A., Erksine, W. And Muehlbauer, F. J., 2004. QTL Mapping of Winter Hardiness Genes in Lentil, *Crop Science*, 13-22.5

Phan, H., T., T., Ellwood, S., R., Hane, J., K., Ford, R., Materne, M., and Oliver, R., P. (2007) Extensive macrosyteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *Culinaris*. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 549–558.

Verma, P., Goyal, R., Chahota, R., K., Sharma, T., R., Abdin, M., Z., Bhatia, S. 2015. Construction of a Genetic Linkage Map and Identification of QTLs for Seed Weight and Seed Size Traits in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plos One*. 5;10 (10).

Andeden, E., E., Baloch, F., S., Çakır, E., Toklu, F., Özkan, H. 2015. Development, characterization and mapping of microsatellite markers for lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plant Breeding* 134: 589-598.

Arumuganathan, K., Earle, E., D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9:208–218.

Ates, D., Aldemir, S., Alsaleh, A., Erdogmus, S., Nemli, S., Kahriman, A., Ozkan, H., Vandenberg, A., Tanyolac, B. 2018. A consensus linkage map of lentil based on DArT markers from three RIL mapping populations. *PLoS ONE* 13(1): e0191375.

Saha, G., C., Sarker, A., Chen, W., Vandemark, G., J., Muehlbauer, F., J., 2013. Inheritance and Linkage Map Positions of Genes Conferring Agromorphological Traits in *Lens culinaris* Medik. *Int J Agron* 618926, 9 pages

Hendre, P., S., Aggarwal, R., K., 2007. DNA Markers: Development And Application For Genetic Improvement Of Coffee. In: Varshney RK, Tuberosa R. (ed) *Genomics-Assisted Crop Improvement*. Springer, Dordrecht, p 399–434.

Idrissi, O., Udupa, S., M., Houasli, C., De Keyser, E., Van Damme, P., De Riek, J. 2015. Genetic diversity analysis of Moroccan lentil (*Lens culinaris* Medik.) landraces using simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphisms reveals functional adaptation towards agro-environmental origins. *Plant Breed* 134, 322–332.

Toklu, F., Karaköy, T., Hakle, I., Bicer, T., Brandolini, A., Kilian, B., Ozkan, H. 2009. Genetic variation among lentil (*Lens culinaris* Medik.) landraces from Southeast Turkey. *Plant Breed*. 128:178–186.

Tsanakas, G., Mylona, P., Koura, K., Gleridou, A., Polidoros, A. 2018. Genetic diversity analysis of the Greek lentil (*Lens culinaris*) landrace ‘Eglouvis’ using morphological and molecular markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 1-9.

Tanyolac, B., Ozatay, S., Kahraman, A., Muehlbauer, F. 2010. Linkage mapping of lentil (*Lens culinaris* L.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. *J Agric Biotechnol Sustain Dev* 2:001—006.