



Mercimekte AG ve AC Tekrarları ile Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin TG ve TC Tekrarları ile Taranarak Yeni SSR Markörlerin Geliştirilmesi

Şehriban Demir¹, Melike Bakır^{2*}

¹ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye, (ORCID: 0000-0002-1367-507X), shrbn@hotmail.com
^{2*} Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-3465-1453), melikebakir@erciyes.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 17 Şubat 2022 ve Kabul Tarihi 19 Eylül 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1075391)

ATIF/REFERENCE: Demir, Ş. & Bakır, M. (2022). Mercimekte AG ve AC Tekrarları ile Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin TG ve TC Tekrarları ile Taranarak Yeni SSR Markörlerin Geliştirilmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (41), 54-58.

Öz

Simple sequence repeats (SSRs) markörler, bitkilerde genetik ve genomik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan önemli moleküler gereçlerdir. Ancak ekonomik öneme sahip serin iklim baklagil bitkilerinden mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) bugüne kadar geliştirilen SSR markörü sayısı oldukça sınırlı kalmıştır. SSR markörlerin bu eksikliği, mercimek moleküler ıslah çalışmalarını sınırlayan başlıca faktörler arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, mercimek bitkisinde SSR markörü geliştirmek için AC ve AG tekrarlarınca zenginleştirilmiş kütüphanelere ait 288 klon TG ve TC tekrarlarınca taranarak yeni 15 adet SSR markörü geliştirilmiştir. Polimorfizm gösteren markörlerden toplamda 18 allel üretilmiş ve Lc-MCu54 markörü en polimorfik markör olarak belirlenmiştir. Geliştirilen bu markörler mercimek bitkisinde moleküler temelli pek çok çalışmaya katkı sağlayacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: SSRs, Mercimek, Markör geliştirme, Zenginleştirilmiş kütüphane.

Development of New SSR Markers in Lentil by Scanning AG and AC Enriched Libraries with TG and TC Repeats

Abstract

Simple sequence repeats (SSRs) markers are important molecular tools widely used in genetic and genomic research in plants. However, the number of SSR markers developed in lentils (*Lens culinaris* Medik.) so far, which is an economically important cool season legume plant, has been very limited. The lack of SSR markers is among the main factors limiting lentil molecular breeding studies. In this study, 288 clones belonging to the enriched libraries with AC and AG repeats were screened by TG and TC repeats to develop SSR markers in lentil plants and 15 new SSR markers were developed. A total of 18 alleles were generated from markers showing polymorphism, and the Lc-MCu54 marker was identified as the most polymorphic marker. These developed markers are capable of contributing to many molecular-based studies in lentil plants.

Keywords: Keywords: SSRs, Lentil, Marker development, Enriched library.

* Sorumlu Yazar: melikebakir@erciyes.edu.tr

1. Giriş

Kültürü yapılan en eski baklagillerden biri olan mercimek (*Lens culinaris* Medik) bitkisi (Bahl vd. 1993), diploid bir genoma ($2n = 2x = 14$) sahip olup, kendine dölenen bir bitkidir (Muehlbauer, 1992). Genom büyüklüğü yaklaşık 4 Gb'dir ve tek yıllık serin iklim baklagilleri arasında yer almaktadır (Arumuganathan ve Earle, 1991). Kültür mercimeği *L. culinaris* Medik.'e ek olarak, *Lens* cinsi *L. ervoides*, *L. lamottei*, *L. nigricans* olmak üzere 3 yabancı türden oluşmaktadır (van Oss vd. 1997). *L. culinaris* Medik. ise hem kültür *L. culinaris* subsp. *culinaris* hemde yabancı *L. culinaris* subsp. *orientalis*, *L. culinaris* subsp. *odemensis*, *L. culinaris* subsp. *tomentosus* olmak üzere 4 alt tür içermektedir (Ferguson vd. 2000). *L. culinaris* subsp. *culinaris*'in *L. culinaris* subsp. *orientalis*'ten kültüre alındığı, orijinin ise Yakın Doğu olduğu ileri sürülmektedir (Zohari, 1972).

Mercimek dünyada 5,1 milyon hektar alanda üretilmektedir ve yıllık üretim 6,54 milyon tondur (FAO 2021). Kanada %44'lük bir üretimle lider mercimek üretici durumundadır. Türkiye ise, Hindistan ve ABD'den sonra 4. sırada yer almaktadır (FAO 2021). Mercimek, yüksek protein oranı (28%), yavaş salınan karbonhidratları içermesi, lif, vitamin ve mineral içermesi ve aynı zamanda sahip olduğu düşük yağ oranı ile önemli bir besin kaynağıdır (Muehlbauer vd. 2006; Ramdath vd. 2020). Aynı zamanda azot bağlama özelliği ile de toprak sağlığına, azotça zenginleştirilmesine ve tarımsal toprakların zenginleştirilmesine katkı sağlamaktadır (Singh vd. 2021). Bu nedenle, diğer baklagillerde olduğu gibi modern yoğunlaştırılmış tarım sistemlerinde ihtiyaç duyulan çeşitliliğe, ürün rotasyonu, karma ve birlikte ekim yoluyla katkıda bulunma potansiyeline sahiptir (Gan vd. 2015; Taha vd. 2018, Yolci, 2020).

Mercimek ekim alanlarında son 10 yıl içerisinde kayda değer ölçüde bir artış olmasına rağmen (FAO 2018), ürün miktarındaki artış biyotik ve abiyotik faktörlerin neden olduğu kayıp nedeni ile ekim alanındaki artışa paralel bir artış gösterememiştir (Rahimi vd. 2016; Singh vd. 2017; Sehgal vd. 2017). Bu bağlamda, yabancı türlere ait gen havuzu oldukça önemli bir genetik çeşitlilik kaynağıdır ve mercimeğin genetik gelişimi için pek çok önemli potansiyel özellikleri (abiyotik ve biyotik stres faktörlerine dayanıklı, verim parametreleri vb.) içermektedir (Sarker ve Erskine, 2006). Yabancı ve kültür mercimeği gen havuzunda yer alan arzu edilen bu özelliklerin genetik olarak belirlenebilmesi ve mercimek ıslah çalışmalarının ivme kazanması için etkili moleküler markörlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Mikrosatellitler veya SSR markörler (Simple Sequence Repeats), ko-dominant özelliğe sahip olmaları, lokus spesifik olmaları, polimorfizm oranının yüksek olması, genomda bol miktarda bulunmaları ve tekrar edilebilirliğinin yüksek olması nedeniyle DNA markörleri arasında oldukça önemli bir yere sahiptirler (Gupta vd. 1996). Mercimek bitkisinde bugüne kadar toplamda 389 SSR markörü geliştirilmiştir (Andeden vd. 2015; Bakır ve Kahraman, 2019; Durán vd. 2004; Hamwieh vd. 2005, 2009; Saha vd. 2010; Verma vd. 2014). Geliştirilen bu markör sayısı, büyük bir genoma sahip mercimek bitkisinde gerçekleştirilecek moleküler ıslah çalışmaları için oldukça yetersiz kalmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, "Mercimekte (*Lens culinaris* Medik.) AG ve AC mikrosatellitlerince Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerden Yeni SSRs (Simple Sequence Repeats) e-ISSN: 2148-2683

Markörlerin Geliştirilmesi (Proje no:2150088)" başlıklı proje kapsamında oluşturulan AC ve AG tekrarlarınca zenginleştirilmiş kütüphanelerin, TG ve TC tekrarları ile taranarak yeni SSR markörlerin keşfedilmesi ve bu markörlerin polimorfizm oranlarının belirlenmesidir.

2. Materyal and Metod

2.1. Bitki materyal

Geliştirilen SSR markörlerinin polimorfizm oranlarını belirlemek için bitki materyali olarak GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü tarafından geliştirilen Tigris, Seyran-9, Altın toprak ve Yerli Kırmızı çeşitleri, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından geliştirilen Kafkas, Ankara yeşili, Ceren çeşitleri, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından geliştirilen Erzurum-8 ve Emre-2, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Müdürlüğü tarafından geliştirilen Sazak-9 çeşidi kullanılmıştır.

2.2. DNA izolasyonu

Kontrollü koşullarda saksılara ekilerek 15 gün süre ile gelişimleri sağlanan bitkilerin toprak üstü kısımları toplanarak Lefort vd. (1998) tarafından geliştirilen protokole göre DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde görsel olarak kontrol edilerek, Nanodrop ND-1000 spektrofotometre ile DNA'ların saflık ve konsantrasyonları belirlenmiştir.

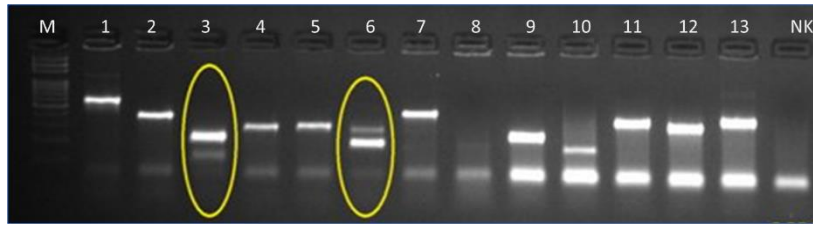
2.3. Mikrosatellitleri İçeren Dizilerin Analizi ve Primer Dizaynı

AG ve AC mikrosatellitlerince Techen vd. (2010)'a göre zenginleştirilen toplam 288 klon TG/TC tekrarları ile Bloor vd. (2001) tarafından geliştirilen koloni PCR koşulları modifiye edilerek taranmıştır. Buna göre, PCR reaksiyonları (15µl) stok kütüphanelerden 1µl, Oligo TG, Oligo TC ve Oligo LIBF3 (5'-CGGGAGAGCAACGAAGGAGT-3') primerlerinin her birinden 10 µM, her bir dNTP'den 0.2 mM, 1X DreamTaq Green Buffer (2 mM MgCl₂ içerir) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and 0.5u DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün PCR reaksiyonları Bio-Rad termal döngü cihazında yapılmıştır. Amplifikasyon programı 94 °C de 3 dk ilk aşamayı takiben, 35 döngü 94 °C de 1 dk, 55 °C de 1 dk, 72 °C de 2 dk ve son uzama aşaması 72 °C de 10 dk olacak şekilde uygulanmıştır. PCR ürünleri %2'lik jelde yürütülerek, 2 ve daha fazla bant verenler pozitif olarak belirlenmiş (Şekil 1) ve ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazında BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak kit protokolüne göre dizilenmiştir. Elde edilen dizilerden plazmid dizilerini belirlemek ve temizlemek için Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) programı kullanılmıştır. Dizilerde yer alan mikrosatellit tekrarlarının yerleri SSRfinder (<http://www.fresnostate.edu/ssrfinder/>) programı ile belirlenerek, Primer3 programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) ile primerler tasarlanmıştır (Tablo 1).

2.4. Geliştirilen SSR Primerlerinin Test Edilmesi

Geliştirilen markörleri en uygun bağlanma sıcaklığı (T_m) Fırat-87, Tigris, Seyran-96 çeşitleri kullanılarak optimize edilmiştir. Buna göre, PCR reaksiyonları (15 μ l) stok kütüphanelerden 1 μ l, her bir primerden 10 μ M, her bir dNTP'den 0.2 mM, 1X DreamTaq Green Buffer (2 mM MgCl₂ içerir) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and 0.5u DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon programı 94 °C de 3 dk ilk aşamayı takiben, 35 döngü 94 °C de 1 dk, 50-66 °C de 1 dk, 72 °C de 2 dk ve son uzama aşaması 72 °C de 10 dk olacak şekilde uygulanmıştır (Bakır ve Kahraman, 2019). PCR ürünleri %3'lik jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Bütün PCR reaksiyonları Bio-Rad termal döngü cihazında yapılmıştır.

Bağlanma sıcaklıkları optimize edilen primerlerin polimorfizm oranlarını belirlemek amacı ile 23 adet mercimek çeşidi Schuelke (2000) tarafından geliştirilen M13 tail metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında, 6-FAM, HEX ve ROX florasan işaretli M13 tail (-21) universal primeri (5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3') tercih edilmiştir. Bunun için, her bir primere ait 0,5 μ l PCR ürünü, 9 μ l Hi-Di formamid ve 0,5 μ l LIZ-600 size standart ile birlikte karışım oluşturularak termal döngü cihazında 95 °C'de 5 dk denature edilmiş ve ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sistemine yüklenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için GeneMapper (version 5.0) software programı kullanılmış, her bir marköre ait pikler değerlendirilmiş ve her bir markör için allel büyüklükleri belirlenerek istatistik analizleri için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 1. Koloni PCR ile SSR motifi içeren klonların belirlenmesi (Figure 1. Screening of the SSR included clones by colony PCR)

Tablo 1. Geliştirilen primerlere ait bilgiler (Tablo 1. The detailed information of the developed primers)

Lokus Adı	5'→3'	Tekrar motifi	bç	T _m (C°)
Lc_MCu 53_F	AGAACCGATCGTGTGTTGAGC	(GA) ₅ (GA) ₃ (GA) ₃ (GA) ₃ (GA) ₄ (GA) ₅	250	55
Lc_MCu 53_R	GGGTGGAAAACCCTAATTCC			
Lc_MCu54_F	GGAGTGCTTCATGTGTAATGAATC	(GT) ₃ (GT) ₃ (AATT) ₃ (GT) ₃	200	62
Lc_MCu54_R	CACCAACAATGAATGCATGA			
Lc_MCu55_F	TGAAAGAGGGAAAAGCGAAC	(GA) ₃ (GA) ₄ (GA) ₃ (GA) ₃ (GA) ₃ (GA) ₄ (GA) ₅ (GA) ₃ (GA) ₂ (GA) ₄	250	64
Lc_MCu55_R	CACAAGGGTTTAAGAACCCAAA			
Lc_MCu56_F	CACATGCATGACATTGTTGAG	(TA) ₃ (ATT) ₃	200	62
Lc_MCu56_R	CATCAACAAAGAAGGGGTGA			
Lc_MCu57_F	ATCTCCTCGCCTCCGTCTAC	(TC) ₆ (CAA) ₃ (AG) ₂	250	52
Lc_MCu57_R	TGCATCTTCTCCTGTGACAT			
Lc_MCu58_F	TGAGATTTAAATGCATAATACCATGA	(TG) ₃ (TG) ₄ (GT) ₃ (TAA) ₃ (AT) ₃ (TG) ₃ (TTG) ₃	250	55
Lc_MCu58_R	AAGGAGTACCACCCCAAAGG			
Lc_MCu59a_F	TTTCCTGAAAAATGGCGAAT	(TC) ₇ (TC) ₅	190	56
Lc_MCu59a_R	GGGAGAGCAACGAAGGAGTA			
Lc_MCu60a_F	CCCACAGGTGAACACGAAAT	(CT) ₅ (CT) ₆	-	-

Lc_MCu60a_R	ACGAAGGAGTTCGTCATGG			
Lc_MCu61a_F	TGCAAGATTGGTATTGAGAAGAA	(GA) ₇ (GA) ₃ (AG) ₃ (AG) ₄ (TGA) ₃ (AG) ₃	–	–
Lc_MCu61a_R	TGATTTGTTTTCTCGCCACA			
Lc_MCu62_F	CGTTGTTGTCTGTCAGGTTAGG	(ATG) ₃ (TG) ₃ (TGT) ₃ (TG) ₃	250	55
Lc_MCu62_R	TCCAGTCATCACACATACACAAA			
Lc_MCu63_F	GCCTTGAGGGTTAAATTGGTC	(AAGA) ₃ (GA) ₃ (GA) ₃ (AG) ₈ (AGA) ₃	250	55
Lc_MCu63_R	CAAGAAGTTGCCTTGCCCTA			
Lc_MCu64_F	GAGTCCTGAGTCTACGATCACC	(GT) ₅ (GA) ₄	250	55
Lc_MCu64_R	CAACACCCAATCGAAACTCC			
Lc_MCu65_F	GTGTTGGAATCTTGGGCAAT	(GA) ₃ (GC) ₃ (GT) ₃ (GT) ₃	200	62
Lc_MCu65_R	ACGCCCTCACCTTTCACACT			
Lc_MCu66a_F	GAACGAGCACCCATCATT	(GA) ₁₈	180	56
Lc_MCu66a_R	AGAGCAACGAAGGAGTGTGG			
Lc_MCu67_F	CGTATGGGCAGAAGTGTGATT	(TGT) ₃ (TAT) ₄ (ATG) ₃ (ATA) ₃ (AT) ₃ (TG) ₃ (TGT) ₃	300	66
Lc_MCu67_R	ATGGGCTATGCACGCTAAAT			

3. Sonuçlar ve Tartışma

Bu alışmada, AG/AC tekrarları ile zenginleştirilmiş 288 klon TG/TC tekrarları ile taranmış ve bu kütüphanelerin 17 adedinin (%5,9) SSR motifi içerdiği tespit edilmiştir. SSR motifi içeren bu klonlar diziler ve bunların 15 (%88,2) adedinin 65 SSR motifi içerdiği belirlenmiştir. AG/AC tekrarları ile yapılan zenginleştirilmiş kütüphanelerin yine AG/AC tekrarları ile taranması sonucu 350 klonun 68 adedinin (%19,4) SSR motifi içerdiği ve bu klonlar dizilendiğinde 53 (%79,1) adedinin 134 SSR motifi içerdiği tespit edilmiştir (Bakır ve Kahraman, 2019). Bu durum, zenginleştirilmenin yapılmış olduğu kütüphanelerin farklı markörlerle taranması ile düşük oranlarda da olsa yeni SSR markörlerin geliştirilebileceğini göstermektedir. Literatürde zenginleştirilen kütüphanelerin farklı tekrarlarla taranarak SSR markörü geliştirilmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte mercimek bitkisinde zenginleştirilmiş kütüphanelerden SSR markörü geliştiren diğer araştırıcılar ile karşılaştırıldığında geliştirilen markör sayısı Hamwieh vd. (2009) den daha yüksek ancak Verma vd. (2014) ve Andeden vd. (2015) den daha düşük bulunmuştur.

Geliştirilen 15 SSR markörünün polimorfizm oranları 23 tescilli mercimek çeşidinde test edilmiştir. Bu markörlerden Lc-MCu53, Lc-MCu54, Lc-MCu56, Lc-MCu57, Lc-MCu58, Lc-MCu61, Lc-MCu62, Lc-MCu63, Lc-MCu66, Lc-MCu67 markörleri ABI 3500 Genetic Analyzer sisteminde değerlendirilmiştir. Lc-MCu55, Lc-MCu59, Lc-MCu60, Lc-MCu64, Lc-MCu65 markörlerinin PCR ürünleri agaroz jelde çok sayıda nonspesifik bant verdiği için amplifiye olmadığı için fragment analizi çalışmalarında kullanılmamıştır. Kapilleri

elektroforez yüklemeleri sonrasında her bir marköre ait pikler değerlendirilmiş ve Lc-MCu53, Lc-MCu54, Lc-MCu62, Lc-MCu66 polimorfik bulunurken, Lc-MCu57, Lc-MCu58 ve Lc-MCu67 markörlerinin ise monomorfik pik profili verdiği görülmüştür. Lc-MCu56 ve Lc-MCu63 markörleri ise karışık pik profili göstermesi nedeni ile değerlendirilmemiştir. Yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında bu çalışmada polimorfik markör yüzdesi (%26,6), Verma vd. (2014) (%84), Bakır ve Kahraman (2019) (%58,4) ve Hamwieh vd. (2009) (%32)'den düşük, Andeden vd. (2015) (23,5%) yüksek bulunmuştur.

Polimorfizm gösteren Lc-MCu53, Lc-MCu54, Lc-MCu62 ve Lc-MCu66 markörlerine ait allel sayıları sırası ile 4, 10, 2 ve 2 olarak belirlenmiştir. Toplamda 18 allel üretilmiş ve Lc-MCu54 en polimorfik markör olarak belirlenmiştir. Tescilli 23 mercimek çeşidinin genetik ilişkisini belirlemek için oluşturulan dendrogram mercimek çeşitlerinin yeterli derecede ayrılmasını sağlayabilmiştir. Elde edilen sonuçların, aynı mercimek çeşitlerinin kullanarak oluşturulan sonuçların (Bakır ve Kahraman, 2019) ve 8 tescilli mercimek çeşitlerinin ortak kullanıldığı (Andeden vd. 2015) alışmalar ile benzer dağılım gösterdiği görülmüştür.

Bu çalışmada, mercimek bitkisinde oldukça kısıtlı olan SSR markörü sayısı var olan kütüphanelerin farklı oligo tekrarları ile taranması ve yeni markör geliştirilmesi stratejisi ile genişletilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen bu SSR markörleri mercimek bitkisi moleküler ışlah çalışmaları, haritalama çalışmaları, genetik çeşitlilik analizleri ve popülasyon yapısı çalışmaları için yararlı olacaktır.

4. Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir. Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezine sağladığı laboratuvar imkânı ve desteği için teşekkür ederiz.

Kaynakça

- 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.
- Bahl, P.N., Lal, S., & Sharma, B.M. (1993). Page: 1-10. “An overview of the production and problems in southeast Asia”. In: *Lentil in South Asia. Proceedings of the seminar on lentils in South Asia*, ICARDA. Editors: Erskine, W., Saxena, M.C. Aleppo, Syria.
- Bakır, M., & Kahraman, A. (2019) Development of new SSR (simple sequence repeat) markers for lentils (*Lens culinaris* Medik.) from genomic library enriched with AG and AC microsatellites. *Biochemical Genetics* 57, 338-353.
- Bloor, P.A., Barker, F.S., Watts, P.C., Noyes, H.A., & Kemp, S.J. (2001). Microsatellite libraries by enrichment. https://www.genomics.liv.ac.uk/animal/RESEARCH/MICR_OSAT.PDF Accessed 10 April 2018.
- Durán, Y., Fratini, R., García, P., & De La Pérez Vega, M. (2004). An intersubspecific genetic map of *Lens*. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1265–1273.
- FAOSTAT (2021) <https://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Accessed 7 April 2018.
- Ferguson, M.E., Maxted, N., van Slageren M., & Robertson, L.D. (2000). A reassessment of the taxonomy of *Lens* Mill. (*Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Vicieae*). *Bot. J. Lin. Soc* 133, 41–59.
- Gan, Y., Hamel, C., O’Donovan, J. T., Cutforth, H., Zentner, R. P., Campbell, C. A., Niu, Y., & Poppy, L. (2015). Diversifying crop rotations with pulses enhances system productivity. *Scientific Reports* 5, 14625.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1996). Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci* 70, 45–54.
- Hamwih, A., Udupa, S.M., Choumane, W., Sarker, A., Dreyer, F., Jung, C., & 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.
- Hamwih, A., Udupa, S.M., Sarkar, A., Jung, C., & Baum, M. (2009). Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils. *Breed Sci* 59, 77–86.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., & Douglas, G.C., (1998). Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tullyally Ireland. *Silvae Genet* 47,5–6.
- Muehlbauer, F.J. (1992). Page 49-73. “Use of introduced germplasm in cool season food legume cultivar development”. In: *Use Of Plant Introductions In: Cultivar Development (Part 2)*. Editors: Shands, H.L., Wiesner, L.E. *Crop Sci. Soc. Amer.*, Social publication.
- Muehlbauer, F. J., Cho, S., Sarker, A., McPhee, K. E., Coyne, C. J., Rajesh, P. N., & Ford, R. (2006). Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica*, 147, 149-165.
- Rahimi, M.H., Houshmand, S., Khodambashi, M., Shiran, B., & Mohammady, S. (2016). Effect of drought stress on agromorphological traits of lentil (*Lens culinaris* Medik.) recombinant inbred lines. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 41, 207-219.
- Ramdath, D. D., Lu, Z. H., Maharaj, P. L., Winberg, J., Brummer, Y., & Hawke, A. (2020). Proximate Analysis and Nutritional Evaluation of Twenty Canadian Lentils by Principal Component and Cluster Analyses. *Foods* 9, 175.
- Saha, G.C., Sarker, A., Chen, W., Vandemark, G.J., & Muehlbauer F.J. (2010). Inheritance and linkage map positions of genes conferring resistance to stemphylium blight in lentil. *Crop Sci* 50, 1831–1839.
- Sarker, A., & Erskine, W. (2006). Recent progress in the ancient lentil. *J. Agric. Sci* 100, 19–29.
- Sehgal, A., Sita, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K.H., & Nayyar, H. (2017). Effects of drought, heat and their interaction on the growth, yield and photosynthetic function of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes varying in heat and drought sensitivity. *Frontiers in Plant Science* 8, 1776.
- Singh, D., Singh, C.K., Taunk, J., Tomar, R.S.S., Chaturvedi, A.K., Gaikwad, K., & Pal, M. (2017). Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC Genomics* 18, 206.
- Singh, J., Sirari, A., Singh, H., Kumar, A., Jaidka, M., Mandahal, K. S., ... & Singh, S. (2021). Identifying and validating SSR markers linked with rust resistance in lentil (*Lens culinaris*). *Plant Breeding*. 00,1-9.
- Taha, K., Berraho, E. B., El Attar, I., Dekkiche, S., Aurag, J., & Béna, G. (2018). *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*. 41, 113–121.
- Techen, N., Arias, R.S, Glynn, N.C., Pan, Z., Khan, I.A., & Scheffler, B.E. (2010). Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. *Mol Ecol Resour* 10,508–515.
- Van Oss, H., Aron, Y., & Ladizinsky, G. (1997). Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens* Mill., *Theor Appl Genet* 94, 452–457.
- Verma, P., Sharma, T.R., Srivastava, P.S., Abdin, M.Z., & Bhatia, S. (2014). Exploring genetic variability within lentil (*Lens culinaris* Medik.) and across related legumes using a newly developed set of microsatellite markers. *Mol Biol Rep* 41, 5607–5625.
- Yolci, M. S. (2020). Erciş (Van) Ekolojik Koşullarında Bazı Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Çeşitlerinin Verim ve Verim Unsurlarının Belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (18), 562-567. DOI: 10.31590/ejosat.693862
- Zohari, D. (1972). The wild progenitor and place of the cultivated lentil (*Lens culinaris*). *Economic Botany*. 26, 236-332.