



**T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI PAMUK ÇEŞİTLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ ile  
KARAKTERİZASYONU**

**Cenk Burak ŞAHİN**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
MAYIS-2015**



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI PAMUK ÇEŞİTLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ ile  
KARAKTERİZASYONU**

**Cenk Burak ŞAHİN**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
MAYIS-2015**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


**BAZI PAMUK ÇEŞİTLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ ile  
KARAKTERİZASYONU**

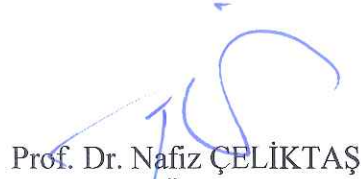
Cenk Burak ŞAHİN


TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Necmi İŞLER danışmanlığında hazırlanan bu tez 12/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Necmi İŞLER  
Başkan

  
Prof. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ  
Üye

  
Doç. Dr. Safder BAYAZIT  
Üye

Kod No: 826

Doç. Dr. Okan ŞENER  
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

12/05/2015

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Cenk Burak ŞAHİN**

## ÖZET

### BAZI PAMUK ÇEŞİTLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ ile KARAKTERİZASYONU

Bu çalışmada, kültürü yapılan 30 pamuk çeşidi (*Gossypium hirsutum* L.) arasındaki genetik ilişkinin ISSR yöntemi kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir. 30 pamuk çeşidinde polimorfizmin belirlenmesi amacıyla 24 ISSR primeri 8 pamuk genotipinde test edilmiştir. Primerlerin yalnızca 9 tanesi PCR ürünü oluşturmuş ve sonraki çalışmalar bu primerlerle sürdürülmüştür. Seçilen 9 adet ISSR primeri 30 adet pamuk genotipinde toplam 41 bant oluştururken bu bantlardan ortalama 22.3 tanesinin polimorfik olduğu saptanmış, primer başına polimorfik bant sayısı ortalama 2.5 olarak gerçekleşmiştir. Araştırmada kullanılan tüm primerler pamukta polimorfik bant üretirken, polimorfizm oranı primerlere bağlı olarak % 6 ile % 89 arasında değişim göstermiştir. ISSR primerlerine ilişkin polimorfik bilgi içeriği değerleri 0.19 ile 0.68 aralığında değişim göstermiştir. Genotipler arası ortalama Jaccard benzerlik katsayısı 0.77 olarak bulunurken, UPGMA kümeleme analiz sonucu 30 pamuk çeşidi genetik yakınlık açısından 2 ana kümeye ayrılmıştır.

2015, 44 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Pamuk, *Gossypium hirsutum* L., genetik çeşitlilik, ISSR.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION of SOME COTTON VARIETIES USING ISSR MARKERS

This study was conducted to determine the genetic diversity in 30 cotton cultivars extensively cultivated in Turkey by using ISSR DNA molecular markers. To investigate the genetic diversity in 30 cotton varieties by ISSR molecular marker, 24 ISSR primers were screened in 8 varieties. 9 of 24 which is produced a PCR product were selected according their polymorphism level. These ISSR primers totally produced 41 bands, and 22.3 were polymorphic. The percentage of polymorphic bands per primer was detected as 2.5. The rate of polymorphism depending on the primers ranged between 6% and 89%. Average polymorphism information content was 0.41, with minimum PIC 0.19 and maximum PIC 0.68. While the Jaccard similarity coefficient between the genotypes was detected as 0.77, 30 cotton varieties were grouped within two main clusters in respect to genetic similarity according to UPGMA analyses.

2015, 44 pages

**Keywords:** Cotton, *Gossypium hirsutum* L., genetic diversity, ISSR.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Necmi İŞLER'e,

Çalışmada kullanılan çeşitlerin temininde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Mehmet ARSLAN'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Yaşar AKIŞCAN'a,

Laboratuvar çalışmalarında her türlü imkânı sağlayan ve büyük katkısı olan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a, Sayın Esra ÇAKIR'a ve Sayın Vafa RUSTAMOVA'ya,

Tezin her aşamasında değerli vaktini harcayan, yazımı boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ'a,

Tez yazımı süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Safder BAYAZİT'e,

Her türlü konuda yardımcı olarak beni yalnız bırakmayan mesai arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Cem Tufan AKÇALI'ya, Sayın Arş. Gör. Ahmet DURSUN'a, Sayın Arş. Gör. Yunus Emre ŞEKERLİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca, eğitim ve öğrenimim süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	VIII
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal .....	16
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. DNA İzolasyonu ve Ölçümleri.....	18
3.2.2. Araştırmada Kullanılan Primerler .....	24
3.2.3. PCR Reaksiyonları ve Elektroforez .....	27
3.2.4. Verilerin Değerlendirilmesi .....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. Saksı ortamında yetiştiriciliği yapılan pamuk genotipi (Nazilli 342 pamuk çeşidi).....	18
Şekil 3.2. Liyofilizatör (FreeZone Freeze Dry Systems).....	18
Şekil 3.3. CTAB çözeltisi eklenip su banyosuna alınan yaprak örnekleri.....	19
Şekil 3.4. Su banyosu sonrasında çalkalayıcıya alınan örnekler.....	20
Şekil 3.5. Santrifüj edilen örnekler .....	20
Şekil 3.6. DNA'nın çökertildiği kurumaya bırakılan eppendorf tüpleri.....	20
Şekil 3.7. Genomik DNA miktarını tayin etmek amacıyla hazırlanan % 0.8'lik Agaroz Jel.....	21
Şekil 3.8. Elektroforez tanklarında agaroz jele yüklenen DNA'ların koşturulması.....	22
Şekil 3.9. Koşturulan DNA'ların çalkalayıcıda etidyum bromür ile muamelesi ....	22
Şekil 3.10. Görüntüleme ünitesinde jel görüntülerinin alınması .....	23
Şekil 3.11. Markör kıyaslaması ile DNA miktar tahminleri.....	24
Şekil 3.12. Markör kıyaslaması ile DNA miktar tahminleri, optimize edilmiş protokol.....	24
Şekil 3.13. Yapışma sıcaklığı 52°C olan ve polimorfizm açısından seçilen primerler.....	26
Şekil 3.14. Yapışma sıcaklığı 54°C olan ve polimorfizm açısından seçilen primerler.....	27
Şekil 3.15. PCR işlemlerinin gerçekleştirildiği Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient) cihazı.....	28
Şekil 3.16. "Size marker" olarak kullanılan, DNA'nın EcoRI ve HindIII kesim enzimleri ile hazırlanmış olan DNA'sı .....	29
Şekil 4.1. UBC 827 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	31
Şekil 4.2. UBC 835 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	31
Şekil 4.3. UBC 836 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	31
Şekil 4.4. UBC 841 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	31
Şekil 4.5. UBC 844 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	32
Şekil 4.6. UBC 855 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	32
Şekil 4.7. A105ISSR02 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	32
Şekil 4.8. A110ISSR03 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	32

Şekil 4.9.	B108ISSR05 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri.....	32
Şekil 4.10.	ISSR verileri kullanılarak hazırlanan kümeleme analizi .....	35
Şekil 4.11.	ISSR verileri kullanılarak UPGMA metoduna göre çizilen genetik benzerlik dengrogramı .....	36

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan pamuk ( <i>G. hirsutum</i> L.) genotipleri ve kökenleri .....	17
Çizelge 3.2. Screening yapılan primerlerin nükleotid dizilimleri ve DNA yapışma sıcaklıkları .....	25
Çizelge 3.3. Screening amaçlı PCR amplifikasyon reaksiyonu bileşimi.....	25
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler, baz diziliş ve sayıları ile DNA yapışma sıcaklıkları .....	27
Çizelge 4.1. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.....	30
Çizelge 4.2. ISSR primerlerinin nükleotid dizilimi ve PIC (polimorfik bilgi içeriği) değerleri.....	33
Çizelge 4.3. Genotipler arasındaki genetik mesafe (Genetic Distance) matrix çizelgesi .....	34

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

%	: Yüzde
da	: Dekar
dk	: Dakika
g	: Yerçekimi
g	: Gram
ha	: Hektar
kb	: Kilobaz
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
°C	: Santigrad derece
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki döngü sayısı)
$\lambda$	: Lambda
$\mu$ g	: Mikrogram
$\mu$ l	: Mikrolitre

### KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
bp (bç)	: Base pair (Baz çifti)
CTAB	: Hexadecyltrimethylammonium bromide
ddH <sub>2</sub> O	: Ultra saf su
dH <sub>2</sub> O	: Saf su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxynucleotide trifosfat
EST	: Expressed Sequence Tag (İfade edilmiş dizi etiketi)
ISSR	: Inter Simple Sequences Repeats (Basit dizi tekrarları arası)
MAS	: Marker-assisted selection (Markör destekli seleksiyon)
OD	: Optical Density (Optik yoğunluk)
PCR (PZR)	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir tepkimesi)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphisms (Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	: Ribonükleik asit
SSR	: Simple Sequences Repeats (Basit dizi tekrarları)
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	: Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Pamuk, gerek ülkemizde gerekse de dünyada tekstil sanayinin en önemli hammaddelerindendir. Pamuk, lifi yanında gıda ve yem ürünlerinin üretimi için yetiştirilen önemli bir bitkidir. Lifleri yanısıra, tohumlarından elde edilen yağı ile de önemli bir bitkidir. Pamuk yağı, yerel olarak, kızartma ve yemeklerde kullanıldığı gibi endüstriyel olarak margarin, mayonez, salata ve yemeklik yağ, sabun, kozmetik, yağlayıcı madde, sülfolanmış yağ ve koruyucu kılıf bir dizi ürünün işlenmesinde de kullanılır (Mert, 2009).

Ülkemizde 2008-2012 yılları arasında ortalama 485 bin ha alandan; 4 milyon ton pamuk (çiğit+kütlü+lif) üretimi gerçekleşmiştir. Ülkemiz toplam pamuk üretiminin %57'si Güneydoğu Anadolu Bölgesinde gerçekleşmektedir (TÜİK, 2014b). Ülkemiz, dünya pamuk üretimi sıralamasında Çin, Hindistan, ABD, Pakistan, Brezilya ve Özbekistan'ın arkasından 7. sırada yer almaktadır (FAO, 2014).

Diğer türlerde olduğu şekilde pamuk yetiştiriciliğinde, birim alandan yüksek verim ve daha kaliteli ürün elde etmek ve üretim masraflarını da azaltmak önemlidir. Birim alandan alınacak ürünün miktarını ve kalitesini, yetiştiriciliği yapılan çeşidin genetik potansiyeli, yetiştirildiği çevre koşulları ve uygulanan tarım teknikleri ile bunlar arasındaki etkileşim belirlemektedir.

Bütün ıslah yöntemlerinin ve projelerinin en önemli amaçlarından biri, farklı koşullara genel uyum sağlayan çeşitleri geliştirmektir. Bu amaca ulaşmak için çeşitler birden fazla yıl veya lokasyonda yetiştirilmektedir. Ancak, ortaya çıkan genotip x çevre interaksyonu çeşit performansının belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Genotip x çevre interaksyonu, farklı çevrelerde çeşit sıralanmalarının farklı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, çeşit performansını belirlemek için birçok istatistikî modeller geliştirilmiştir (Mert, 2009).

Pamuk ıslahında, lif verimi ve kalitesinin ön planda tutulması, tohum kalitesine ilginin azalmasına neden olmaktadır. Yağ içeriği, glandsızlık veya düşük gossypol içeriği, önemli tohum kalite özellikleridir. Glandsızlık, genellikle lif verimi ve kalitesini etkilememekte, ancak bazı zararlılara karşı pamuk bitkilerinin hassaslaşmasına neden olmaktadır. Glandsızlık, pamuk yağının yemeklik değerini yükseltir. Bu nedenle, tohum

kalitesi de ıslah programlarında göz önünde bulundurulması gereken seleksiyon ölçütleri arasında yer almalıdır (Mert, 2009).

Bitki ıslahçıları, verim potansiyelinin sınırlı olduğu yerlerde, erkenciliği artırmak ve bitki gelişimini sınırlamak isterler. Erkencilik, çok yıllık pamuk bitkisinin verimini, tek yıllık ekim sistemleri içinde maksimize etmek için gerekli bir özelliktir. Ayrıca, erkencilik üretim girdilerini azaltmak, iklim koşullarının olumsuz etkilerinden sakınmak ve ikinci ürün sistemlerini kolaylaştırmak için arzu edilen bir özelliktir (Kohel, 1989).

Elektroforetik analizler genetik kaynaklara ulaşılmasında, genotipler arası farkların gösterilmesinde oldukça güçlü ve ucuza mal olan tekniklerdir ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde direkt DNA veya RNA seviyelerindeki çalışmalardan ziyade bu yöntemin tercih edilmesi daha avantajlıdır. Ayrıca bu yöntemler bize; sayısı gittikçe artan çeşitlerin saflığını göstermek, çeşitler arası tanımlama yapmak, biyosistemik analizlere yardımcı olmak, türlerin filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmak, genetik çeşitlilik hakkındaki bilgileri arttırarak evrime destek sağlamak konularında da yardımcı olur (Peirce ve Brewbaker, 1973; Gorman ve Kiang, 1977; Cardy ve Beversdorf, 1984; Hamrick ve ark. 1991; Sammour, 1991).

Morfolojik ve biyokimyasal markırların (işaretleyicilerin) yerine son zamanlarda çeşitlerin karakterizasyonunda DNA işaretleyicileri kullanılmaya başlanmıştır. Bitkiler arasındaki genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için ilk olarak RFLP yöntemi kullanılmıştır (Tanksley ve ark., 1989). Fakat bu yöntem kısa sürede çok örneğin incelenmesine olanak sağlamadığından ve maliyetinin çok yüksek olmasından dolayı, PCR'a dayalı moleküler işaretleyicilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunlardan bazıları, AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphisms), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNAs), SSR (Simple Sequence Repeats) ve ISSR (Intersimple Sequence Repeats)'dır. RAPD, AFLP, SSR ve ISSR teknikleri, kültür bitkilerinde genetik çeşitliliğin saptanmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, polimorfizm oranı bakımından AFLP ve SSR işaretleyicileri, tekrarlanabilirlik bakımından AFLP, SSR, ISSR ve RFLP işaretleyicilerinin avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bunlara ek olarak çalışılacak laboratuvar olanakları göz önünde bulundurulduğunda; RAPD, SSR ve ISSR tekniklerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve araştırma koşullarının sınırlı

olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılabilir yöntemler olduğu bildirilmiştir (Belaj ve ark., 2003; Mignouna ve ark., 2003; Rana ve Bhat, 2004; Kwon ve ark., 2004).

Pamuk tür ve çeşitlerini DNA düzeyinde belirlemek için birçok moleküler yöntem kullanılmıştır (Pillay ve Myers, 1999; Chaudhary ve ark. 2010; Hussein ve ark. 2006). Tür ve çeşit ayrımlarında, önceleri izoenzim analizleri kullanılmış, fakat bu yöntem mutasyon ile oluşan farklılıkları belirlemede yetersiz kalmıştır (Roose, 1988; Herrero ve ark., 1996). RFLP, pamukta tür ve çeşit ayrımında genom haritalamalarında uzun yıllar oldukça etkili bir yöntem olarak uygulanmıştır (Reinisch ve ark. 1994). Ancak RFLP’de DNA’ların enzim ile kesilme gerekliliği, radyoaktif esaslı olması, uygulamadaki zorluğu ve pahalılığı alternatif bir metot olan PCR esaslı RAPD moleküler tekniğinin geliştirilmesine neden olmuştur (Williams ve ark., 1990). RAPD pamukta tür ve çeşit ayrımlarında RFLP’ye göre daha kısa sürede etkili sonuçlar verebilmektedir (Zhang ve ark., 2008). DNA markörleri arasında RAPD yöntemi oldukça basit, daha düşük maliyetli, güvenilir ve en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olup farklı pamuk çeşitleri arasında genetik benzerliğin veya farklılığın ortaya konmasında oldukça uygundur (Preetha ve Raveendran, 2008; Sheidai ve ark., 2007; Rana ve Bhat, 2005; Ghany ve Zaki, 2003; Lu ve Myers, 2002).

Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından geliştirilen dinükleotid, tetranükleotid ve pentanükleotid tekrar dizilerine dayanan bazlara sahip primerlerin kullanıldığı, uygulama maliyetinin diğer yöntemlere nazaran düşük olduğu, genotipleri birbirinden ayırma gücünün ise yüksek olması özelliğiyle bilinen ISSR (Basit Diziler Arası Tekrar) tekniği; pamuk (Liu ve Wendel, 2001), çeltik (Qian ve ark., 2001), arpa (Sanchez ve ark., 1996; Fernandez ve ark., 2002), mısır (Kantety ve ark., 1995), buğday (Nagaoka ve Ogihara, 1997) ve birçok kültür bitkisinde tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin tespit edilmesinde başarıyla kullanılmıştır.

Bu çalışma; Türkiye’de geliştirilen 30 pamuk çeşidini ISSR yöntemi kullanarak genetik benzerlik ve farklılıkları ortaya koymak ve çeşit geliştirmede ıslah programlarının planlanmasına yönelik kaynak sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Multani ve Lyon (1995) tarafından yapılan çalışmada, 12 çeşit ve 1 çeşit adayı *Gossypium hirsutum* L. ile *Gossypium barbadense* L.'ye ait 1 pamuk çeşidinde genetik çeşitlilik belirlenmeye çalışılmıştır. 30 RAPD primeri kullanılarak yapılan RAPD analizi sonucunda 14 çeşitte toplam 453 DNA bandı elde edilmiştir. Elde edilen toplam DNA bantlarının 69'u (%15.2) yalnızca *Gossypium barbadense* L.'ye, 128'inin (%33.3) ise *Gossypium hirsutum* L. çeşitlerine özgü olduğu tespit edilmiştir.

Tatieni vd. (1996) yaptıkları çalışmada, 19 pamuk (*Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L.) genotipinde 80 primer kullanarak genetik çeşitliliği belirlemeye çalışmışlardır. Genotiplerde 53 primerden toplam 135 polimorfik bant elde edilirken, 27 primer monomorfik bant vermiştir. Genotipler arasındaki uzaklık 0.25-2.05 arasında değişmiştir. Genotipler, *Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L. olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır.

Iqbal vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada, 22 upland pamuk çeşidi (*Gossypium hirsutum* L.) ve 1 tane *Gossypium arboreum* L. çeşidi olmak üzere toplam 23 çeşit materyal olarak kullanılmıştır. Analiz edilen 50 primerin, 49'unda polimorfik, 1'inde ise monomorfik bant vermiştir. %89.1'i polimorfik olan toplam 349 DNA bandı elde edilmiştir. 17 pamuk (*G. hirsutum* L.) çeşidi arasındaki benzerlik %81.51 ile %93.41 arasında değişmektedir. Diploid *Gossypium arboreum* var. Ravi ise %55.7 benzerlik oranı ile tetraploid olan *G. hirsutum* L. çeşitlerinden kesin olarak ayrılmıştır. Araştırmacılar, türler arası olduğu kadar türler içinde de polimorfizmi tespit etmeye çalışmışlardır. Bu doğrultuda, *Gossypium hirsutum* L.'ye ait S12 ve Krishma genotiplerinde tür içi genetik çeşitliliği de incelemişlerdir. Krishma genotipine ait 15 bitki 9 primer ile taranmış ve 2 primerde polimorfizm görülmüştür. S12 genotipine ait 20 bitki ise 13 primer ile taranmış ve bütün bitkilerde aynı bant modellerine rastlanmıştır. Bu durumu, S12 genotipindeki bireylerde yüksek oranda benzerlik olması bireylerin homozigot olduğunun kanıtı olarak; Krishma genotipine ait bireylerde ise bazı karakterlerde açılma olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Buna ek olarak, yapılan tarla denemelerinde Krishma genotipinde morfolojik farklılıkların görülmesinin popülasyondaki heterojenliği doğruladığını belirtmişlerdir.

Khan vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada, 31 tür, 3 alt tür ve 1 türler arası melez olmak üzere toplam 35 *Gossypium* türünde 45 RAPD primeri kullanılmıştır. Gözlemlenen toplam 579 DNA bandında primer başına ortalama 12.9 bant düşmüştür. Toplam 579 bant içerisinde yalnızca 1 bandın monomorfik (< 0.5 kb), 578 bandın ise polimorfik olduğu bulunmuştur. Türler içerisinde 289 bant ile en fazla DNA bandı *Gossypium herbaceum*'da, en az DNA bandı ise 119 bant ile *Gossypium lobatum*'da görülmüştür. Diğer türlerde bant sayısı 151 ile 283 arasında değişmektedir. Yapılan analiz sonucunda türler 6 ana gruba ayrılmıştır. Bu çalışma ile moleküler markör teknikleri ile yüksek oranda benzerlik gösteren pamuk genotiplerini ayırmanın mümkün olduğu görülmüştür.

Lu ve Myers (2002) tarafından yapılan araştırmada, 10 pamuk çeşidi arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla 86 primer kullanılmış, 63 primerden sonuç alınırken, 23 primerden sonuç alınamamıştır. Sonuç alınan primerlerden toplam 312 DNA bandı elde etmiş ve bu bantlardan sadece 42 bandın polimorfik (polimorfizm oranı %13.5) olduğu tespit edilmiştir. RAPD analiz sonuçlarına göre 10 pamuk çeşidi arasındaki genetik benzerliğin %92.7 ile %97.6 arasında değiştiği görülmüştür.

Rahman vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada amaç, Pakistan'da pamuk yetiştiriciliğinde sorunlara yol açan yaprak kıvrılma virüsü hastalığına (CLCD = cotton leaf curl virus disease) karşı yeni stratejiler geliştirmektir. Çalışma için CLCD'ye çok dayanıklı ve dayanıklı 20 pamuk genotipi seçilmiştir. Toplam 50 primer kullanılarak yapılan RAPD analizi sonucunda, 49 primer sonuç vermiş ve toplam 482 DNA bandı gözlenmiştir. Bu bantların %66.18'nin polimorfik olduğu saptanmıştır. Elit genotipler arasında genetik benzerlik, CLCD'ye çok dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinden önce %81.5 ile %93.41 arasında değişirken; yeni geliştirilen çeşitlerle birlikte genetik benzerlik %81.45 ile %90.59 arasında değişmiştir. Ortalama genetik benzerliğin ise çalışılan bütün genotiplerde %89.55 olduğu saptanmıştır.

Ghany ve Zaki (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *Gossypium barbadense* L. türüne ait kültürü yapılan dört çeşit arasındaki genetik farklılık geliştirilen RAPD-PCR tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Bu teknik 20-mer rastgele primer ve yüksek bağlanma sıcaklığını içermektedir. Kullanılan her 2 RAPD primeri ile de 5 DNA bandı gözlenmiştir. Bunlardan polimorfik olmayan 2 DNA bandının nükleotid sekansları

arasındaki homoloji oranının (%98.5), Rieseberg (1996) tarafından ayçiçeğinde yapılan çalışmadaki homoloji oranından (%91) daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Dongre vd. (2004) yaptıkları bir çalışmada, 25 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipini 45 ISSR ve 40 RAPD primeriyle analiz etmişlerdir. Bunlardan 19 ISSR ve 21 RAPD primerinden sonuç alınmış ve sırasıyla 90 ve 150 bant görülmüştür. Polimorfik olan 12 ISSR primeri 49 bant ve 15 RAPD primeri ise 76 bant oluşturmuştur. UPGMA küme analizi sonucunda; ISSR dendrogramında 3 ana küme oluşurken, RAPD dendrogramında 4 ana küme oluşmuştur.

Mehetre vd. (2004) yaptıkları bir çalışmada, sitoplazmik erkek kısır *Gossypium hirsutum* L. 76IH ile çok yıllık *G. barbadense* 'Kidney Cotton', *G. hirsutum* L. 'Vensil', 'Moco', 'Exotic-3' ve diploid yabancı *Gossypium sturtianum*, *G. anomalum* ve *G. raimondii* türleri ile türler arası melezleme sonucu erkek kısır melezler elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan 45 primerden en iyi sonucu veren 26 primer seçilmiştir. Seçilen primerlerden toplam 179 DNA bandı elde edilmiştir. 179 banttan 137 bandın polimorfik, 42 bantın ise monomorfik olduğu tespit edilmiştir. Melezlerin %64 oranında anaya (*G. hirsutum* 76IH) ve %65 oranında babaya (*G. raimondii*) benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, RAPD tekniği ile doğal melezlerin içerisinde doğru melezlerin tespit edilebileceğini belirtmişlerdir.

Punitha ve Raveendran (2004) tarafından yapılan çalışmada, farklı bölgelerden toplanan 4 beyaz ve 11 renkli pamuk (*Gossypium hirsutum*) genotipi arasındaki genetik benzerliğin RAPD yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. 15 genotipin analizinde, 32 farklı 10-mer'lik RAPD primerleri kullanılmıştır. Gözlenen toplam 287 DNA bandının 219'u polimorfik olup polimorfizm oranı %76.31 olarak bulunmuştur. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) küme analizi ile oluşturulan dendrogramda, üç ana grup gözlenmiş ve renkli ve beyaz pamuklar iki ayrı kümeye ayrılmıştır. Renkli pamuk genotipleri arasından Parbhani American ve Louisiana Brown aynı grupta yer alırken, kalan renkli pamuk genotipleri de diğer grupta yer almıştır. Araştırmacılar, RAPD yönteminin renkli ve beyaz pamuklar arasındaki genetik varyasyonun gözlenmesinde etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Rana ve Bhat (2004) yaptıkları bir çalışmada, *Gossypium herbaceum* L.'ye ait 7 pamuk genotipi, *Gossypium arboreum* L.'ye ait 8 pamuk genotipi ile *G. herbaceum* L. x *G. arboreum* L. melezi olan 1 pamuk genotipi kullanmışlardır. 16 pamuk genotipi

arasındaki genetik benzerliğin tanımlanmasında RAPD ve AFLP yöntemleri kullanılmıştır. AFLP yönteminde 9 primer çifti kullanılmış olup 736 polimorfik bant elde edilmiştir ve polimorfizm oranı %65.8 olarak bulunmuştur. RAPD yönteminde ise, 20 RAPD primeri kullanılmış olup toplam 224 DNA bandı elde edilmiştir. Bu bantlardan 127 bandın polimorfik olduğu belirlenmiştir ve polimorfizm oranı %56.7 olarak bulunmuştur. RAPD yönteminde primer başına 11.3 bant görülürken, AFLP yönteminde bu sayı 124'tür. UPGMA küme analizi sonucu oluşturulan her iki dendrogramda da genotipler 2 ana gruba ayrılmıştır. Bir grupta *G. arboreum* L. genotipleri bulunurken, diğer grupta ise *G. herbaceum* L. genotipleri yer almıştır. RAPD ve AFLP yöntemlerinin pamuk genotipleri arasındaki polimorfizmi belirlemede etkili yöntemler olduğu görülmüştür. Ancak, AFLP yönteminin RAPD yöntemine göre gerek yüksek oranda polimorfizm oluşturması gerekse de daha fazla sayıda bant vermesi, AFLP'nin RAPD'e göre daha etkili olduğunu göstermiştir.

Sun vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada, *Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium klotzschianum* L.'nin protoplast füzyonu ile elde edilen somatik melezleri materyal olarak kullanılmıştır. Yapılan flow sitometri analizi ile somatik melezlerde DNA içeriğinin, ebeveynlerin toplam DNA içeriğine çok yakın olduğu görülmüştür. Somatik hibritler ve ebeveynleri arasındaki polimorfizmi belirlemek amacıyla, 18 bitkide 10 RAPD primeri kullanılmıştır. Bunlardan 7 primer monomorfik bant vermiştir. 16 bitkinin her birinin, iki ebeveyne de ait en az bir bant içerdiği tespit edilmiştir.

Vafaie-Tabar vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada amaç, *Gossypium hirsutum* L.'ye ait 15 genotip ve *Gossypium arboreum* L.'ye ait 7 genotipin 50 RAPD primeri ile analiz edilerek genetik ilişkinin belirlenmesidir. 50 RAPD primerinden bant veren 26 primer seçilmiştir ve seçilen bu primelerden toplam 371 DNA bandı elde edilmiştir. Toplam bandın %88'i (325 bant) polimorfik bulunmuştur ve primer başına ortalama 14.3 bandın düştüğü görülmüştür. 7 diploid ve 15 tetraploid pamuklar arasındaki ortalama benzerlik indeksi 0.25 ile 0.95 arasında değişmektedir. Tetraploid pamuk genotipleri arasındaki benzerlik oranının (%65-95), diploid genotiplerden (%54-88) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. UPGMA küme analizine göre yapılan dendrogramda diploid ve tetraploid genotipler ayrı ayrı 2 gruba ayrılmışlardır. Bu

çalışma, diploid ve tetraploid genotipler arasındaki DNA polimorfizminin tespit edilmesinde RAPD tekniğinin etkili olduğunu göstermektedir.

Dongre ve Parkhi (2005) yaptıkları bir çalışmada, melez pamuk çeşidi (H'6') ve ebeveyn G.Cot.10 (erkek) ile G.Cot.100 (dişi) genotiplerinin tanımlanmasında PCR'a dayalı moleküler teknikleri (RAPD, ISSR, Microsatellite) kullanmışlardır. 20 RAPD primeri, 19 ISSR primeri ve 25 microsatellite primeri ile analizler gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, RAPD, ISSR ve SSR tekniklerinin ebeveynler ve melezlerin tanımlanmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Erkılınç ve Karaca (2005) yaptıkları çalışmada, 36 Türk pamuk çeşidinde 25 çift SSR primeri kullanarak çeşitler arasındaki genetik farklılığı belirlemeye çalışmışlardır. DNA ekstraksiyonu için yaprak örnekleri almadan önce ve sonra 36 pamuk çeşidinin çeşitli özelliklerini (koza sayısı, bitki şekli, çenette çiğit sayısı, çiçeklenme gün sayısı vb.) gözlemlemişlerdir. SSR analizi sonucunda toplam 32 bant oluşmuş ve 25 primer çiftinden sadece 4 primer çifti polimorfik bant vermiştir. Oluşturulan dendrogramda 36 çeşit 3 ana gruba ayrılmıştır. Araştırmacılar, çalışma sonunda Türk pamuk çeşitlerinde genetik çeşitliliğin çok düşük olduğunu ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi için yeni germplazmaların bulunmasının gerektiğini vurgulamışlardır.

Jana vd. (2005), özellikle soya (*Glycine max*) ve pamukta (*Gossypium sp.*) önemli bir patojen olan kökboğazı çürüklüğünü (*Macrophomina phaseolina*) SSR yöntemiyle karakterize etmiştir. Hindistan ve ABD'de yetiştirilen soya ve pamuktan izole edilen 40 *M. phaseolina* kültürü 3 SSR primeriyle (16-mer, 20-mer, 15-mer) analiz edilmiştir. UPGMA küme analizi sonucunda 3 ana küme oluşmuş, örnekler yetiştirildikleri bölgelerle paralel olarak kümelere ayrılmıştır. İlk ana kümede %80 benzerlik oranıyla soya kökünden izole edilen 27 kültür yer alırken, ikinci ana kümede %52 benzerlik oranıyla yine soya kökünden izole edilen 3 kültür yer almıştır. Üçüncü ana kümede ise %97'den fazla bir benzerlik oranıyla pamuk kökünden izole edilen kültürler yer almıştır. SSR primerleri kullanılarak yapılan bu ilk çalışma sonucunda, SSR yönteminin *M. phaseolina* patojeninin tanımlanmasında ve teşhisinde kullanılabileceği görülmüştür.

Rana ve Bhat (2005) yaptıkları çalışmada, kültürü yapılan 4 pamuk türüne (*Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium arboreum* L.) ait 59 genotipte genetik çeşitliliği belirlemeye çalışmışlardır.

Seçilen 18 RAPD primerinden 251 bant elde etmişlerdir. Bu bantlardan 244 bantın polimorfik olduğunu gözleyerek polimorfizm oranını %97.21 olarak tespit etmişlerdir. Kullandıkları bütün primerlerin polimorfik bantlar verdiğini ve her primerin polimorfizm oranının %85.71 ile %100 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. UPGMA küme analizine göre oluşturulan dendrogramda 4 ana grup gözlenmiştir. İki genotip dışında kalan bütün diploid genotiplerden *G. herbaceum* L.'ye ait olanlar birinci grupta, *G. arboreum* L.'ye ait olanlar ikinci grupta yer almıştır. Tetraploid genotiplerden *G. barbadense* L.'ye ait olanlar üçüncü ve *G. hirsutum* L.'ye ait olanlar ise dördüncü gruptadır. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde ve genetik polimorfizimin yüksek düzeyde açığa çıkarılmasında RAPD markörlerinin kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Sun vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, tetraploid pamuk genotipi (*Gossypium hirsutum* Coker 201) ile 2 yabancı diploid pamuk türünün (*Gossypium stockii* ve *Gossypium bickii*) protoplast füzyonu ile somatik melezler kullanılmıştır. Coker 201 + *G. bickii* ve Coker 201 + *G. stockii* melezlerinde, morfolojik, flow sitometri analizi, kromozom sayımı ve RAPD analizleri yapılmıştır. *Gossypium hirsutum* Coker 201 ve *Gossypium bickii* melezleri 2 primer (s471 ve s476), *Gossypium hirsutum* Coker 201 ve *Gossypium stockii* melezleri de 2 primer (S1358 ve S1360) ile taranmıştır. Sonucunda, bütün melezlerin ebeveynlere ait en az bir bant taşıdıkları tespit edilmiştir.

Abdurakhmonov vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada, seçtikleri 1000 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipinden fenotipik analiz sonucunda lif kalitesi ile ilgili en az 14 morfolojik özelliği belirlemişlerdir. 288 pamuk genotipi 100 SSR markörü primer çifti ile 384 genotip ise 9 kromozoma özgü 80 SSR primer çifti ile taranmıştır. Tarama sonucunda genotiplerde geniş bir genetik çeşitlilik olduğu belirtilmiştir. SSR yönteminin MAS programlarında pamuğun önemli agronomik özelliklerinin belirlenmesi bakımından önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Adawy vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, 21 pamuk (*Gossypium hirsutum* L. ve *G. barbadense* L.) genotipi 16 AFLP primeriyle analiz edilmiş ve toplam 940 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 474 tanesinin polimorfik (%50.4) olduğu görülmüştür. 15 AFLP primerinin 8 pamuk genotipine özgü olduğu saptanmıştır. RAPD, ISSR ve SSR teknikleriyle oluşturulan dendrogramlarda olduğu gibi; UPGMA küme analizi

sonucunda da *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. genotipleri iki ayrı ana kümeyi oluşturmuştur.

Bertini vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada, 53 pamuk genotipi (*Gossypium hirsutum* L.) arasındaki genetik farklılığı ve genotipler arasındaki ilişkiyi SSR yöntemiyle belirlemeye çalışmışlardır. Bu amaçla kullandıkları 31 çift SSR primerinden toplam 66 DNA bandı elde etmişlerdir ve primer başına ortalama 2.13 bant gözlemişlerdir. SSR analizi sonucunda genetik farklılık katsayısı 0.18 ile 0.62 arasında değişirken, benzerlik katsayısı 0.00 ile 0.41 arasında değişmiştir. UPGMA küme analizi sonucunda 7 ayrı grup oluşmuştur. SSR markörleri yardımıyla pamuk genotiplerindeki genetik çeşitlilik çalışmalarının, ıslahı yapılan genotiplerin gen havuzuna yeni allelleri kazandırabileceğini belirtmişlerdir.

Guo vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, 25 pamuk genotipi (*Gossypium sp.*) 207 EST-SSR primeriyle analiz edilmiştir. Bunlardan 124 EST-SSR primerinin 25 pamuk genotipinde de, kalan 83 EST-SSR primerinin ise yalnızca belirli bir genotip setinde ürün verdiği görülmüştür. 207 EST-SSR primerinden 1352 allel oluştuğu ve 2 EST-SSR primeri dışındaki bütün primerlerin polimorfik olduğu saptanmıştır. Polimorfizm oranı %99 bulunurken, primer başına ortalama 6.53 allel düşmüştür.

Murtaza (2006) yaptığı çalışmada, Pakistan ve A.B.D. orijinli 20 pamuk (*Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium arboreum* L.) genotipi kullanmıştır. Çalışmanın amacı, 20 pamuk genotipi arasındaki genetik çeşitliliğin AFLP yöntemiyle tespit edilmesidir. 4 AFLP primer çifti ve kombinasyonlarının kullanıldığı çalışmada, skorlanabilen ortalama 40-80 arasında bant elde etmiştir. UPGMA küme analizine göre yapılan dendrogramda 5 ana grup tespit etmiştir. Bu gruplardan sadece 1 tanesi *Gossypium arboreum* L.'ye, 4 tanesi ise *Gossypium hirsutum* L.'ye ait genotiplerden oluşmuştur.

Saravanan vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, 10 pamuk melezi (*Gossypium hirsutum* race palmeri, *Gossypium barbadense* var Sujatha, *Gossypium thurberi* Tod., *Gossypium anomalum*, *Gossypium raimondii*) kullanılmıştır. Taranan 20 RAPD primerinden toplam 284 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 197'si polimorfik olup polimorfizm oranı %69.37'dir. UPGMA küme analizi sonucunda çeşitler arasındaki genetik uzaklık %71.2 ile %88 arasında değişmiştir. Oluşturulan dendrogramda genotipler iki ana kümeye ayrılmışlardır. Bir kümede *Gossypium*

*hirsutum* race palmeri türevleri bulunurken diğer küme 3 alt kümeye ayrılmıştır. Birinci alt kümeyi *Gossypium thurberi* türevleri oluştururken, ikinci alt kümeyi *Gossypium hirsutum* × *Gossypium anomalum* melezlemesinin türevleri ve üçüncü alt kümeyi ise *Gossypium hirsutum* × *Gossypium raimondii* melezlemesinin türevleri oluşturmuştur.

Dongre vd. (2007), diploid ve tetraploid 19 pamuk genotipini (*Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium arboreum* L.) 19 ISSR ve 25 SSR primeriyle analiz etmişlerdir. 17 SSR primeri 56 tane polimorfik bant oluştururken, 4 SSR primeri monomorfik bant oluşturmuştur. Kalan 4 SSR primeri ise bant vermemiştir. Küme analizi sonucunda *G. hirsutum* L.'ye ait genotipler bir kümede, *G. arboreum* L.'ye ait genotipler ise diğer kümede yer alırken türler arası benzerlik katsayısı 0.59 bulunmuştur. 15 ISSR primeri 72 tane polimorfik bant oluştururken, 1 ISSR primeri ise monomorfik bant oluşturmuştur. Diğer 3 ISSR primerinde ise bant görülmemiştir. SSR ile oluşturulan küme analizinde olduğu gibi ISSR'da da iki tür ayrı kümelerde yer almıştır. Yine SSR'da olduğu gibi benzerlik katsayısı 0.59 bulunmuştur.

Hussein vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *Gossypium hirsutum* L.'ye ait 3 pamuk genotipi ile *Gossypium barbadense* L.'ye ait 8 pamuk genotipi materyal olarak kullanılmıştır. 11 pamuk genotipi arasındaki genetik çeşitlilik ve akrabalık ilişkisi 15 RAPD, 28 SSR, 17 EST ve 11 AFLP primeri veya primer kombinasyonları kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda RAPD 177, SSR 117, EST 47 ve AFLP 926 DNA bandı vermiştir. Polimorfik bant sayısı sırasıyla 112, 65, 33 ve 355 olarak tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, polimorfizm oranı ise RAPD yönteminde %63.2, SSR yönteminde %55.6, EST yönteminde %70.2 ve AFLP yönteminde %38.3 olarak bulunmuştur. Genotipler arasındaki genetik benzerlik ise RAPD %63.8 ile %95.9, SSR %13.8 ile %98.1, EST %70.4 ile %98.5, AFLP %13.7 ile %99.3 ve kombine edilen verilerde %78.2 ile %98 arasında değişmiştir. UPGMA küme analizine göre yapılan tüm dendrogramlarda 11 pamuk genotipi 2 ana gruba ayrılmıştır ve bu grupların biri *G. barbadense* L. türüne ait genotipleri içerirken, diğer grup *G. hirsutum* L. türüne ait genotipleri içermektedir. Pamuk genotipleri arasındaki polimorfizmin tespitinde PCR'a dayalı farklı DNA markörlerinin (RAPD, SSR, EST ve AFLP) başarılı sonuç verdiği görülmüştür. 24 RAPD, 25 SSR, 7 EST ve 184 AFLP markörü *Gossypium hirsutum* L. türüne özgü olduğu tespit edilmiş ve genotipler arasındaki koza ağırlığı ve bazı pamuk karakterlerinin bu markörlerle alakalı olabileceği düşünülmüştür.

Sheidai vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, 10 tetraploid pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşidinde sitogenetik çalışmalar yapılmış ve RAPD markörleri ile analiz edilmiştir. Kullanılan 30 RAPD primerinden 27 sinden başarılı sonuç alınmıştır. Gözlemlenen 362 DNA bandının 69'ü polimorfik (%19) ve geriye kalan 293 bandın ise monomorfik (%81) olduğu tespit edilmiştir. UPGMA küme analizine göre yapılan dendrogramda 2 ana grup oluşmuştur. Mantel testi, sitogenetik inceleme ve RAPD yöntemi arasında kısmen benzerlik göstermiştir. RAPD markörlerinin genomda tekrar eden kısımları çoğaltması ve sitogenetik analizlerin yalnızca kiazma frekansı ile kromozom ilişkileri göz önüne alınarak yapılması; bu iki markörün de genomun farklı bölümlerini açığa çıkarması olarak yorumlamışlardır.

Abdurakhmonov vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, 287 egzotik *Gossypium hirsutum* L. genotipi 95 SSR primeriyle taranmıştır. Analiz sonucunda 373 polimorfik SSR alleli oluşurken, primer başına ortalama allel sayısı 4 olarak bulunmuştur. Bunlardan 10 SSR allelinin %0.5'ine, 182 SSR allelinin ise yalnızca %5'ine özgü olduğu görülmüştür. Geriye kalan 181 SSR allelinin (%48) ise polimorfizm oranı yüksek bulunmuştur. SSR primerlerinin PIC değerleri 0.007-0.380 arasında değişmiş ve ortalama PIC değeri 0.122 bulunmuştur. Genotipler arasındaki genetik uzaklık değerleri 0.01 ile 0.50 arasında değişmiş ve ortalama genetik uzaklık değeri 0.13 bulunmuştur. MAS programlarında SSR tekniğinin etkili şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Jiang vd. (2008), 48 pamuk genotipindeki genetik çeşitliliği tespit etmek amacıyla ISSR yöntemini kullanmışlardır. 60 ISSR primerinden 11 tanesinden başarılı sonuç alınmıştır. Elde edilen toplam 92 banttan 77'sinin (%83.70) polimorfik olduğu görülmüştür. UPGMA küme analizi sonucunda genotipler arasındaki genetik benzerlik katsayısı 0.27 ile 0.93 arasında değişmiş ve genotipler 4 ana kümeye ayrılmıştır. Bu çalışma ile ISSR moleküler markör yönteminin genotipler arasındaki ilişkiyi tespit etmede etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Li-Wang vd. (2008), 35 pamuk genotipini 50 RAPD, 22 ISSR ve 30 SRAP primeri ile taramışlardır. Bunlardan 35 RAPD, 22 ISSR ve 17 SRAP primeri ürün vermiştir. 35 RAPD primerinden 352 tanesi polimorfik (%85.44) olmak üzere 412 bant; 22 ISSR primerinden 213 tanesi polimorfik (%85.2) olmak üzere 250 bant ve 17 SRAP primerinden 199 tanesi polimorfik (%85.41) olmak üzere 233 bant elde edilmiştir.

Primer başına düşen bant sayısı sırasıyla 11.77, 7.14 ve 13.71 bulunmuştur. Genetik benzerlik katsayıları ise 0.781, 0.787 ve 0.764 olarak bulunmuştur. UPGMA küme analizi sonucunda genotipler 3 ana kümeye ayrılmıştır.

Zhang vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Gossypium barbadense* L.'ye ait 56 pamuk genotipi ile *Gossypium hirsutum* L.'ye ait 4 pamuk genotipi materyal olarak kullanılmıştır. Analiz sonucunda, kullanılan 86 ISSR primerin 16 tanesinden (%18.6) sonuç alınamazken, 43 tanesinin (%50.0) ise polimorfizmi tespit edemediği görülmüştür. *G. barbadense* L. ile *G. hirsutum* L. pamuk genotipleri arasındaki genetik farklılığı tespit etmede 27 ISSR primerinin sonuç verdiğini belirtmişlerdir.

Zhu vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, 2 A geni içeren, 13 D geni içeren ve 8 AD geni içeren olmak üzere toplam 23 pamuk (*Gossypium sp.*) genotipi materyal olarak kullanılmıştır. 14 EST-SSR primeriyle yapılan analiz sonucunda 438 polimorfik PCR ürünü elde edilmiştir. D geni içeren 13 türün Fryxell'in alt bölüm taksonomisi ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Salunkhe ve Deshmukh (2010), 12 pamuk genotipini tanımlamak ve genetik çeşitliliği analiz etmek amacıyla 55 ISSR primeri kullanmıştır. Bu primerlerden yalnızca 15 tanesi başarılı sonuç vermiş ve 83 bantı polimorfik olmak üzere toplam 101 bant oluşturmuştur. En fazla polimorfik bantı IS-08 isimli ISSR primeri üretmiştir. Analiz sonucunda elde edilen dendrogram 2 ana kümeye ayrılmıştır. Farklı türlere ait genotiplerin birbirinden farklı kümelerde yer aldığı görülmüştür. ISSR yönteminin pamukta DNA polimorfizmini belirlemede ve genetik çeşitliliği analiz etmede etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Noormohammadi vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, 12 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipi 30 RAPD ve 10 ISSR primeriyle analiz edilmiştir. 21 RAPD primerinden 220 bant oluşmuş ve primer başına 10.47 bant görülmüştür. Polimorfizm oranı ise %80.12 bulunmuştur. 9 ISSR primerinden 113 bant oluşmuş ve primer başına 12.55 bant görülmüştür. Polimorfizm oranı ise %54.35 bulunmuştur.

Abdi vd. (2012), tuza dayanıklı ve hassas olan pamuk genotiplerini tespit etmek amacıyla 28 pamuk genotipiyle çalışmışlardır. Kullanılan 34 ISSR primerinden 14 tanesinden toplam 85 bant elde etmişlerdir. Bu bantlardan 65 tanesi polimorfiktir. Primer başına düşen bant sayısı 3 ile 8 arasında değişmiştir. Küme analizi sonucunda genotipler 3 ana kümeye ayrılmıştır.

Bardak ve Bolek (2012), Dünyanın farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan diploid ve tetraploid 25 pamuk genotipi (*Gossypium* spp.) arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için 5 ISSR ve 39 SSR primeri kullanmıştır. Elde edilen 173 allelden 155 tanesi (%89.60) polimorfiktir. Primer başına 3.93 allel düşmüştür. Polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri 0.0040 ile 0.9993 arasında değişirken, ortalama PIC değeri 0.4396 bulunmuştur. Bütün genotipler arasındaki genetik çeşitlilik oranı 0.04 ile 0.58 arasındadır. Bu oran, *G. hirsutum* L. genotipleri arasında 0.04-0.23, *G. barbadense* L. genotipleri arasında 0.07-0.26 ve diğer türler arasında 0.23-0.57 arasında değişmiştir. Gen havuzundaki çeşitliliği artırmak için yabancı pamuk türlerinin kullanımı önerilmiş ve arzu edilen özelliklerin seçiminde faydası olacağı belirtilmiştir.

Sheidai vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, materyal olarak Mehr, Sindose ve bunların melezi Mehr X Sindose pamuk genotipleri (*Gossypium hirsutum* L.) kullanılmıştır. 9 ISSR primeriyle taranan genotiplerden; Mehr çeşidinde, 65 tanesi polimorfik olmak üzere toplam 83 bant; Sindose çeşidinde, 50 tanesi polimorfik olmak üzere toplam 71 bant; Mehr X Sindose melezinde ise 79 tanesi polimorfik olmak üzere toplam 87 bant gözlenmiştir. SSR primerleriyle taranan genotiplerden; Mehr çeşidinde 10 tekrarlanabilir SSR alleli, Sindose çeşidinde ve Mehr X Sindose melezinde ise 8 tekrarlanabilir SSR alleli gözlenmiştir. Allellerin uzunlukları 217 bp ile 235 bp arasında değişmiştir.

Surgun vd. (2012), Türkiye’de geliştirilen 9 pamuk çeşidinin 42 RAPD mörkörü ile genetik farklılıklarını belirlemek amacı ile yürüttükleri çalışmada genetik polimorfizmin %18.1 düzeyinde olduğunu her hangi 2 çeşit arasında genetik benzerliğin %90.2 ile %96.5 arasında olduğunu kaydetmişlerdir.

Ahmed vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, Çin’in 3 bölgesinde yetiştirilen 38 upland ve 55 melez pamuk genotipi 324 SSR primeriyle taranmıştır. Sonuç veren 66 SSR primerinden 162 lokus oluştuğu ve primer başına 2.45 lokus düştüğü saptanmıştır. Ortalama PIC değeri 0.80 bulunurken, en düşük PIC değeri 0.34 ve en yüksek PIC değeri ise 0.86 olarak bulunmuştur. UPGMA küme analizi sonucunda genotipler 3 ana kümeye ayrılmıştır.

Noormohammadi vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, 11 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipi 26 RAPD, 20 ISSR ve 4 SSR primeriyle taranmıştır. Başarılı sonuç alınan 17 RAPD primerinden 261 bant ve 10 ISSR primerinden 206 bant

elde edilmiştir. Polimorfizm oranları sırasıyla %22 ve %49.4 bulunmuştur. 4 SSR primerinden ise 181-236 bç arasında değişen 12 allel elde edilmiş ve polimorfizm oranı %54 bulunmuştur.

Sofalian vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, 20 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipi materyal olarak kullanılmıştır. Kullanılan 34 ISSR primerinden yalnızca 12 tanesinden 69 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 48 tanesi (%69.57) polimorfiktir. Primer başına ortalama 4 bant düşmüştür. Genetik çeşitlilik indeksi 0.125 ile 0.353 arasında değişmiştir. UPGMA küme analizi sonucunda genotipler 4 ana kümeye ayrılmıştır.

Jia vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, kurak ve tuzlu alanlarda değerlendirilen 323 *Gossypium hirsutum* L. gen kaynağı 106 SSR primeri ile analiz edilmiş; 278 lokus ve 333 SSR alleli saptanmıştır. Markör başına ortalama 3.1 allel düşmüştür. 45 SSR allelinin toplam gen kaynaklarının sadece %5'ine özgü olduğu görülmüştür. SSR markörlerinin ortalama PIC değeri 0.53 olup 0.17 ile 0.79 arasında değişmiştir. Gen kaynakları arasındaki genetik uzaklık değeri ise 0.04 ile 0.57 arasında bulunmuştur.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 2013-2015 yılları arasında, Mustafa Kemal ve Çukurova Üniversiteleri Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümleri Biyoteknoloji ve Moleküler Genetik Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

#### 3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak, ülkemiz farklı Üniversiteleri ile Tarımsal Araştırma Enstitülerince geliştirilip tescil ettirilmiş, tamamı tetraploid *Gossypium hirsutum* L. ( $2n=4x=52$ , AADD) türüne ait, farklı ekolojilerde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmış ve halen yapılmakta olan 30 ticari pamuk çeşidi/genotipi kullanılmıştır. Çoğunluğu melezleme, bazıları ise seleksiyon ıslahı ile geliştirilmiş olan genotipler ile köken bilgileri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

Araştırmada kullanılan genotiplere ait tohumlar, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma Uygulama Alanında 2013 yılı Mayıs ayında ekilmiştir. Tarla koşullarında oluşabilecek olumsuzluklar düşünülerek, aynı genotipler MKÜ Tarla Bitkileri Bölümü net kaplamalı, kontrolsüz sera koşullarında, saksı ortamında da yetiştirilmiştir (Şekil 3.1). Normal sulama ve bakım işlemleri gerçekleştirilen 4-5 yapraklı genç fideler donör materyal olarak kullanılmıştır. Her bir genotipe ait 2-3 bitkiden steril bir makas ile kesilen yapraklar, alüminyum folyo ile sarılarak etiketlenmiş ve buz içerisinde laboratuvara taşınmıştır.

Hasat edilen yaprak örnekleri;

- liyofilizatörde 72 saat süre ile kurutma işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.2).

Kurutma sonrası örnekler öğütülmüş ve DNA izolasyonuna kadar +4 °C'de buzdolabı koşullarında muhafaza edilmişlerdir.

- alüminyum folyo içerisinde DNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

DNA izolasyonu ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) yönteminin uygulanması ve yürütülen işlemler aşağıdaki sıra ile yürütülmüştür.

##### 1. DNA İzolasyonu ve Ölçümleri

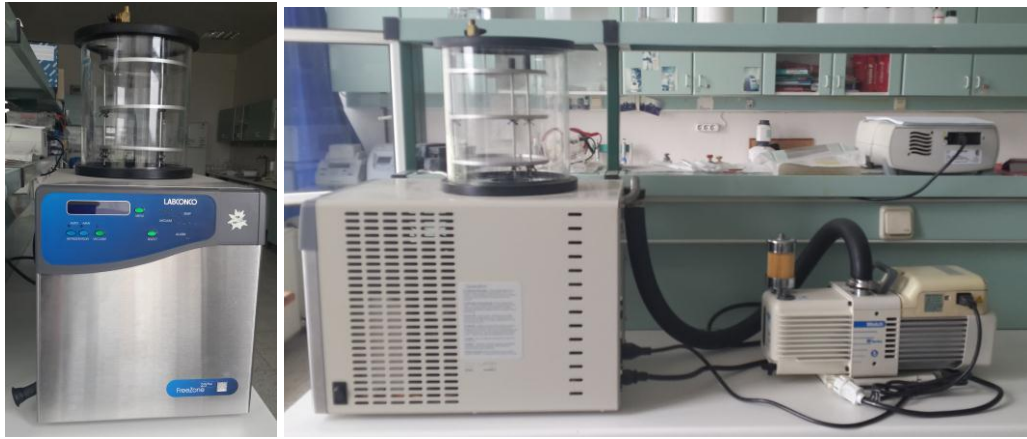
2. Araştırmada Kullanılan Primerler
3. PCR Reaksiyonları ve Elektroforez
4. Verilerin Değerlendirilmesi

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan pamuk (*G. hirsitum* L.) genotipleri ve kökenleri (TTSM, 2014a)

NO	GENOTİP ADI	TESCİL ETTİREN ISLAHÇI KURULUŐ
102	ADN P01	Doğu Akdeniz Tarımsal Arş. Enst. Müd.
105	Aydın-110	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
106	Ayhan 107	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
113	Barut 2005	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
125	Coşkun-1	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
129	Dicle 2002	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Mer. Müd.
156	GAPEYAM-1	GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
202	Gossypolsüz 86	Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi
161	Gürelbey	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
171	Menderes 2005	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
172	Nazilli 143	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
179	Nazilli 84 S	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
184	Nazilli M-342	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
194	Sayar 314	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müd.
134	Şahin-2000	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
124	Çukurova 1518	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müd.
101	Adana 98	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müd.
190	Özbek 142	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
185	Nazilli M39	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
183	Nazilli 663	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
182	Nazilli 66-100	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
181	Nazilli 342	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
169	Maraş-92	Doğu Akdeniz Geçit Kuőaęı Tarımsal Araş. İstasyonu Müd.
149	Erşan-92	Doğu Akdeniz Geçit Kuőaęı Tarımsal Araş. İstasyonu Müd.
180	Nazilli 954	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
147	Ekői 911	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
175	Nazilli 87	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
146	Ege 69	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
187	Nazilli M 503	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü
173	Nazilli 303	Pamuk Araştırma İstasyonu Müdürlüğü



Şekil 3.1 Saksı ortamında yetiştiriciliği yapılan pamuk genotipi (Nazilli 342 pamuk çeşidi)



Şekil 3.2 Liyofilizatör (FreeZone Freeze Dry Systems)

### 3.2.1 DNA İzolasyonu ve Ölçümleri

Analizler, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Hem liyofilizatörde kurutulan ve hem de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanan örneklerden DNA eldesi, Doyle ve Doyle (1987) tarafından bildirilmiş olan CTAB mini izolasyon yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

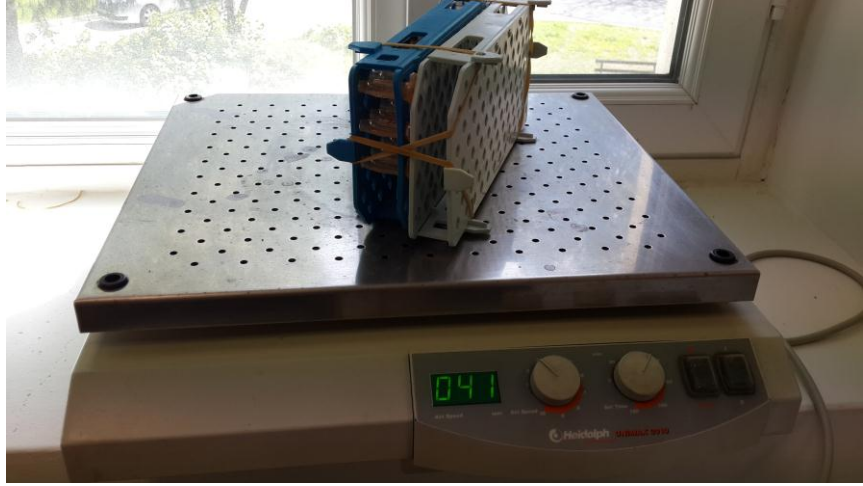
**Liyofilizatörde kurutulan örneklerden DNA izolasyonu:** Örnekler 2 ml'lik eppendorf tüplere konularak üzerine 0.9 ml CTAB DNA izolasyon çözeltisi eklenmiştir. Her 15 dakikada bir elle nazikçe çalkalamak koşuluyla,  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat 10 dakika süre ile su banyosunda bekletilmiştir (Şekil 3.3). Su banyosundan çıkarılan örnekler bir süre

soğumaya bırakılmış ve daha sonra 0.9 ml kloroform:isoamilalkol (1:24) karışımı eklenerek yine elle bir süre (1-2 dakika), daha sonra çalkalayıcı üzerinde, düşük hızda yavaşça 15 dakika çalkalanmıştır (Şekil 3.4). Daha sonra tüpler 15 dakika süre ile 13000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir (Şekil 3.5). Santrifüj edilen tüplerin üst fazları mikropipetle alınarak 2 ml'lik yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerine 600 µl isopropanol eklenmiş ve elle yavaşça alt üst yapıp tek faz haline getirilerek DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Bu aşama sonrasında tüpler -20 °C'de 1 saat bekletilmiş ve DNA'ların tam çökelmeleri temin edilmiştir. Derin dondurucudan çıkarılan eppendorf tüplerinden, DNA dipte kalacak şekilde tüm sıvı dökülmüş ve 0.9 ml Amonyum Asetat eklenerek yavaş devirde 15 dakika çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Daha sonra 10000 rpm'de kısa süreli santrifüj yapılmış ve içerisindeki sıvı dikkatli şekilde dökülmüştür. Örnekler kuruması için bir gece bekletilmiştir (Şekil 3.6).

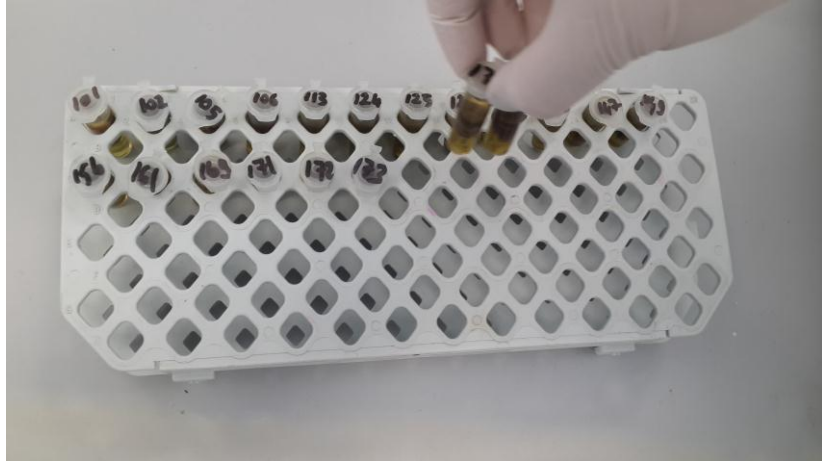
**-80°C'de bekletilen örneklerden DNA izolasyonu:** Alüminyum folyo içerisinde laboratuvara getirilen örnekler sıvı azot dolu bir kaba konulmuştur. Yaprak örnekleri sırasıyla havanlara alınarak öğütülmüş ve 2 ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır. Artan örnekler tekrar alüminyum folyoya sarılarak -80°'ye konulmuştur. Tüplerdeki örneklerin üzerine 0.9 ml CTAB DNA izolasyon çözeltisi eklenmiştir. Önceki bölümde kuru örnekler için yapılan izolasyon işlemleri aynı şekil ve sıra ile bu örnekler için de tekrarlanmış ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 CTAB çözeltisi eklenip su banyosuna alınan yaprak örnekleri.



Şekil 3.4 Su banyosu sonrasında çalkalayıcıya alınan örnekler.



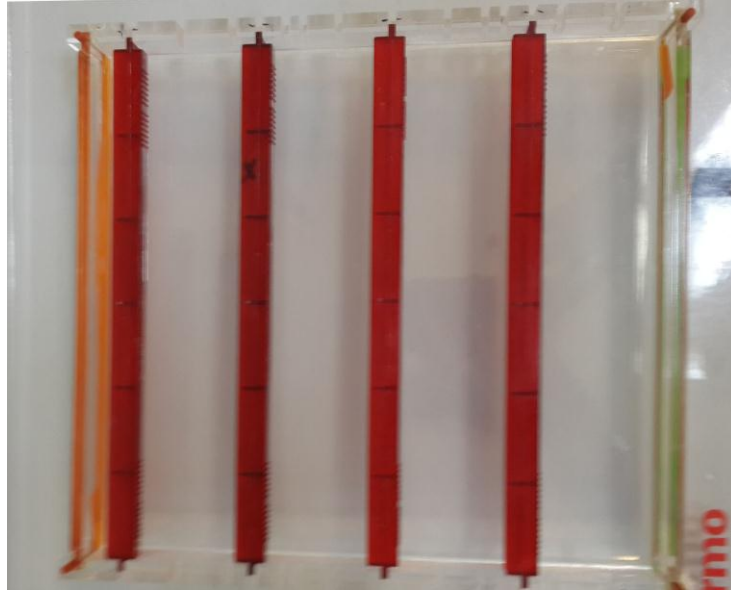
Şekil 3.5 Santrifüj edilen örnekler.



Şekil 3.6 DNA'nın çöktüğü kurumaya bırakılan eppendorf tüpleri.

Tüm bu işlemler sonrasında yapılan gözlemler kuru örneklerden, yaş örneklere nazaran daha temiz DNA elde edilebildiğini ortaya koymuştur.

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların miktarını tayin etmek için % 0.8'lik agaroz jel kullanılmıştır. 23 x 25 cm'lik tank için 2.3 g agaroz ile 290 ml 0.5 X TBE erlenmeyere konulmuştur. Agarozun çözünmesi için mikrodalga fırında 600 watt da ortalama 3-4 dakika işleme tabi tutulmuştur. Çözeltinin tanka konulabilmesi için sıcaklığın yaklaşık 55 °C'nin altına düşmesi gerektiğinden, çözelti manyetik çalkalayıcıya konularak karıştırılmış ve soğuması beklenmiştir. İstenilen sıcaklığa geldiği tahmin edilen çözelti, düz bir yüzeye konulan tanka dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir (Şekil 3.7). Agaroz jelin donması için yaklaşık yarım saat bekletilmiştir.



Şekil 3.7 Genomik DNA miktarını tayin etmek amacıyla hazırlanan % 0.8'lik Agaroz Jel.

İçlerinde DNA örnekleri bulunan kurutulmuş örnek tüplerine 50 µl ultra saf su konulmuştur. Örnekler vortekslenmeden, parmak uçlarıyla tüplere vurarak DNA'nın su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

Jele yükleme yapmak için, 1 µl DNA'ya karşılık 9 µl mavi boya (blue dye) eklenmiştir. Ancak, 1 µl'yi pipetleyip yüklemek zor olduğu için bu oranların 2 katı alınmıştır. Yani, 2 µl DNA'ya karşılık 18 µl mavi boya ve 12 µl dH<sub>2</sub>O 0.5 ml'lik tüplere konulmuştur ve düşük hızda kısa süreli mini santrifüj yapılmıştır.

Hazırlanan % 0.8'lik agaroz jel tankına 0.5 X TBE buffer solüsyonu, jelin üzerini kaplayacak miktarda doldurulmuş ve kısa bir süre sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Jelin üst kısmına kuru örneklerden, alt kısmına ise yaş örneklerden elde

edilen DNA'lar; ilk üç kuyuya sırasıyla 5  $\lambda$ , 10  $\lambda$  ve 20  $\lambda$  DNA markörleri ve sonrasında ise genotiplere ait DNA örnekleri gelecek şekilde 10'ar  $\mu$ l yüklenmiştir. Agaroz jele yüklenen DNA'lar 130 voltta 30 dakika koşturulmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Elektroforez tanklarında agaroz jele yüklenen DNA'ların koşturulması.

İşlem sonrasında jel çıkartılarak küvete alınmış ve jelin üstüne çıkacak şekilde etidyum bromür konulmuştur. Jelin yırtılmaması, tahrip olmaması için çalkalayıcının hızı düşük seviyede tutulmuş ve 5 dakika çalkalanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Koşturulan DNA'ların çalkalayıcıda etidyum bromür ile muamelesi.

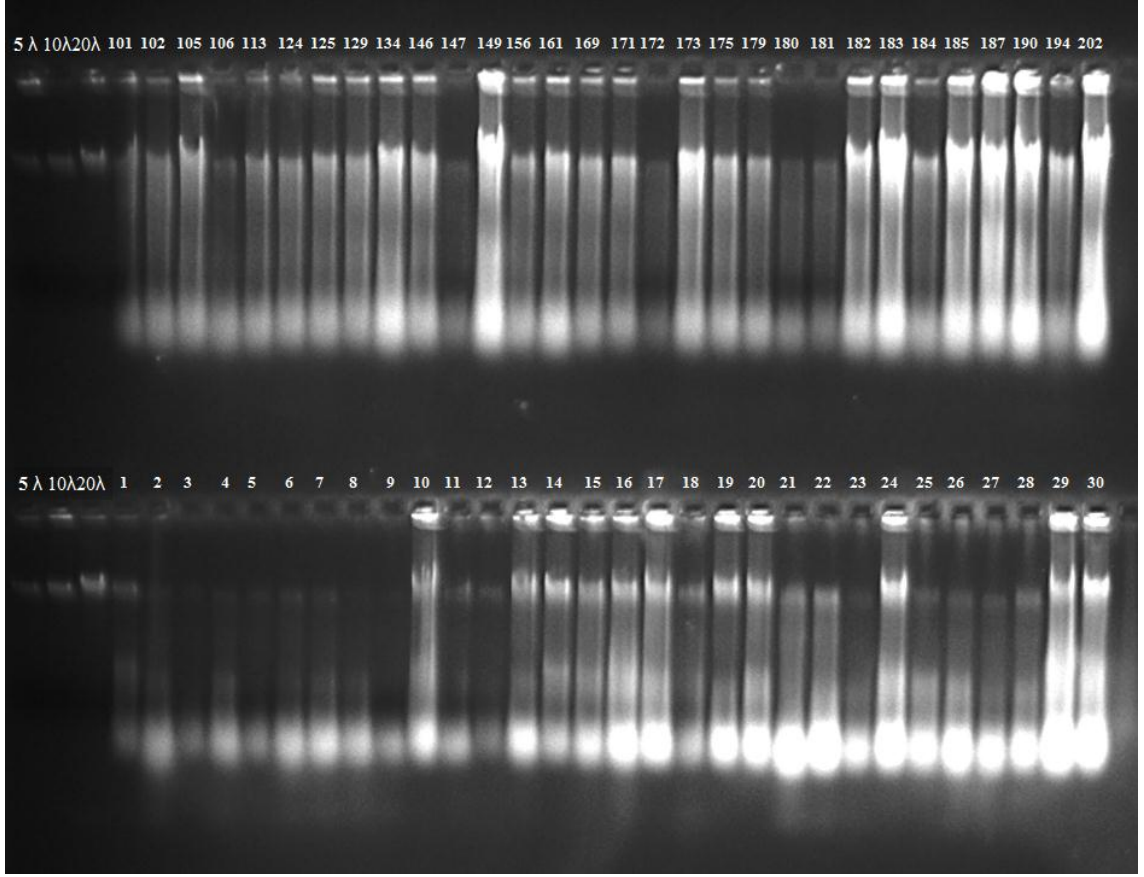
Sonrasında etidyum bromür kendi kabına alınarak, küvete bu sefer saf su eklenmiş ve durulanması için tekrar aynı hız ve sürede çalkalanmıştır. Süre bitiminde jel görüntüleme ünitesine alınarak fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.10).



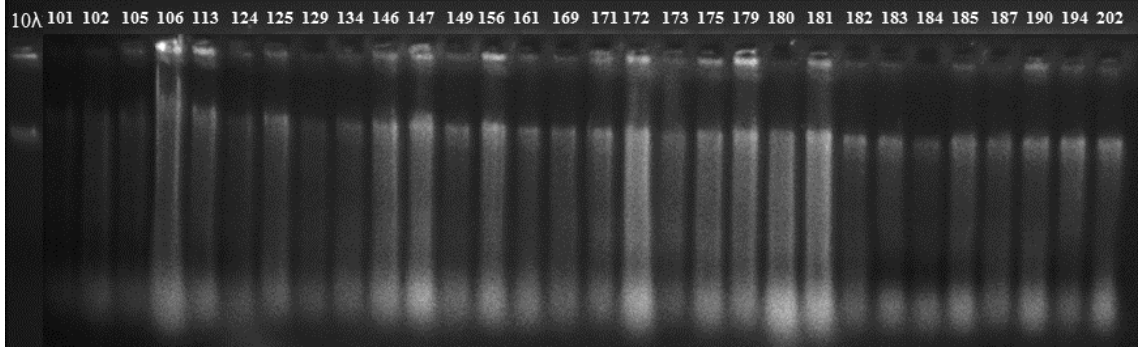
Şekil 3.10 Görüntüleme ünitesinde jel görüntülerinin alınması.

UV transilluminatör yardımıyla jel görüntüsünde gözlemlenen DNA yoğunlukları  $\lambda$  DNA' lar (5 ng-10 ng-20 ng) ile karşılaştırılarak belirlenmiş (Şekil 3.11) ve her bir genotip örneği için elde edilen DNA miktarı saptanmıştır.

Hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için DNA konsantrasyonları  $\mu$ l'de 10 ng/ug olacak şekilde ultra saf su ile seyreltilmiş ve yeniden jelde koşturulmuştur. Bu şekilde, her örneğin DNA miktarının 10 ng'a gelmesi sağlanmıştır. Jel hazırlama ve DNA koşturma işlemleri aynen tekrarlanmış ve jel görüntülenmiştir. Görüntü sonucunda DNA'ların istenen düzeye geldiği saptanmış ve sonraki işlemlerin liyofilize edilen kuru örneklerden elde edilen DNA'lar ile yürütülmesine karar verilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.11 Markör kıyaslaması ile DNA miktar tahminleri.



Şekil 3.12 Markör kıyaslaması ile DNA miktar tahminleri, optimize edilmiş protokol.

### 3.2.2 Araştırmada Kullanılan Primerler

Araştırmada, DNA'ya yapışma sıcaklığı daha önce yapılmış çalışmalarda belirlenmiş olan 24 adet primer screening (çalışacak-çalışmayacak primerlerin belirlenmesi) yapmak üzere, polimorfizm bakımından test edilmiştir. Seçilen primerler ve DNA'ya yapışma sıcaklıkları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Screening yapılan primerlerin nükleotid dizilimleri ve DNA yapışma sıcaklıkları.

Primer İsimleri	Yapışma Sıcaklıkları (°C)	Nükleotid Dizileri	Primer İsimleri	Yapışma Sıcaklıkları (°C)	Nükleotid Dizileri
UBC811	52	(GA) <sub>8</sub> C	UBC835	54	(AG) <sub>8</sub> YC
UBC823	52	(TC) <sub>8</sub> C	UBC844	54	(CT) <sub>8</sub> RC
UBC826	52	(AC) <sub>8</sub> C	UBC841	54	(GA) <sub>8</sub> YC
UBC827	52	(AC) <sub>8</sub> G	A105ISSR02	54	(TG) <sub>9</sub> T
UBC836	52	(AG) <sub>8</sub> YA	A112ISSR04	54	AG(GT) <sub>8</sub> T
B116ISSR02	52	(AC) <sub>8</sub> TAA	B116ISSR04	54	(AC) <sub>9</sub> T
B108ISSR02	52	(TC) <sub>7</sub> (AC) <sub>2</sub>	B108ISSR05	54	T(CA) <sub>9</sub>
UBC809	52	(AG) <sub>8</sub> G	B108ISSR03	54	(TC) <sub>7</sub> (AC) <sub>2</sub> A
UBC852	52	(TC) <sub>8</sub> RA	A217ISSR01	54	A(AG) <sub>7</sub> (GT) <sub>2</sub>
UBC858	52	(TG) <sub>8</sub> RT	A005ISSR01	54	(TG) <sub>9</sub> A
UBC855	52	(AC) <sub>8</sub> YT	A005ISSR04	54	(TG) <sub>8</sub> (TA) <sub>2</sub>
UBC840	52	(GA) <sub>8</sub> YT	A110ISSR03	54	A(GT) <sub>9</sub>

Primerleri polimorfizm bakımından test etmek amacıyla 113, 125, 146, 156, 179, 182, 183, 184 nolu genotipler seçilmiştir.

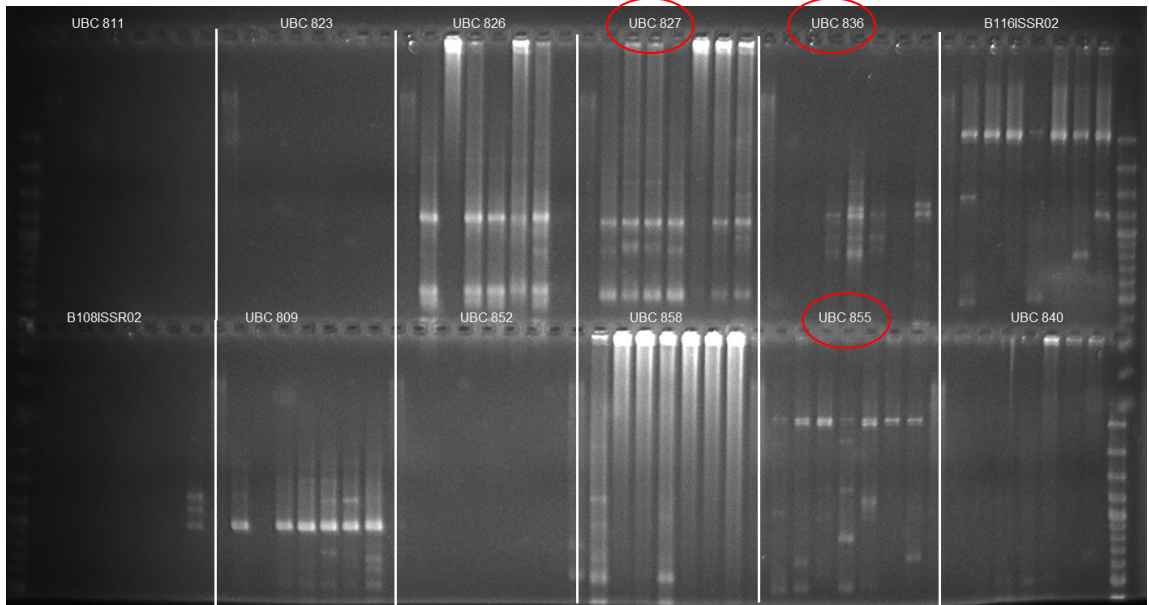
PCR işlemi için amplifikasyon reaksiyonu 2 µl genomik DNA, 1 ml dNTPs, 1 ml primer, 18.3 ml ddH<sub>2</sub>O, 2.5 ml Green Buffer ve 0.18 ml DreamTaq ile oluşturulmuştur. Pipetleme hatası da göz önüne alınarak 8 örnek için 10 örneklilik stok hazırlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Screening amaçlı PCR amplifikasyon reaksiyonu bileşimi.

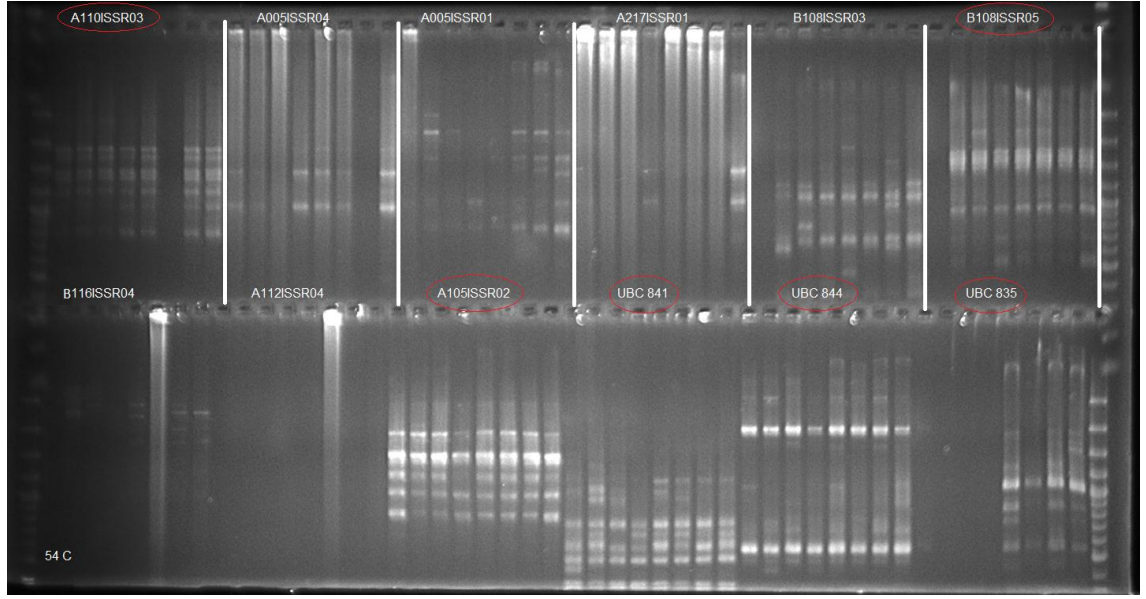
Kullanılan Malzemeler	x = 1	x = 10
ddH <sub>2</sub> O	18.3 ml	183 ml
dNTPs	1 ml	10 ml
Green Buffer	2.5 ml	25 ml
Primer	1 ml	10 ml
DreamTaq	0.18 µl	1.8 µl
<b>Toplam</b>	<b>23 ml</b>	

DNA'nın çoğaltımı için PCR sıcaklık ve döngü koşulları 3.2.3 PCR Reaksiyonları ve Elektroforez başlığında anlatıldığı gibi programlanmıştır.

PCR döngüsünün tamamlanması sonrasında PCR ürünleri protokolü daha önce anlatılmış olan % 1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 0.5 X TBE tampon çözeltisinde 120 voltta 90 dakika koşturulmuştur. İşlem sonrasında jel çıkartılarak küvete alınmış ve jelin üstüne çıkacak şekilde etidyum bromür konulmuştur. Jelin yırtılmaması, tahrip olmaması için çalkalayıcının hızı düşük seviyede tutulmuş ve 5 dakika çalkalanmıştır. Sonrasında etidyum bromür kendi kabına alınarak, küvete bu sefer saf su eklenerek durulanması için tekrar aynı hızda ve sürede çalkalanmıştır. Süre bitiminde jel görüntüleme ünitesinde UV transilluminatör yardımı ile görüntülenerek bant veren primerler seçilmiştir. Görüntülerin işlenmesinden 9 primerin polimorfizm oluşturduğu saptanmış (Şekil 3.13-3.14) ve çalışmaların bu primerler ile devam ettirilmesi kararlaştırılmıştır.



Şekil 3.13 Yapışma sıcaklığı 52°C olan ve polimorfizm açısından seçilen primerler.



Şekil 3.14 Yapışma sıcaklığı 54°C olan ve polimorfizm açısından seçilen primerler.

### 3.2.3 PCR Reaksiyonları ve Elektroferez

PCR amplifikasyonu işlemi için reaksiyon her bir tüp, 2 µl genomik DNA, 1 ml dNTPs, 1 ml primer, 18.3 ml ddH<sub>2</sub>O, 2.5 ml Green Buffer, 0.18 ml DreamTaq olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler, baz diziliş ve sayıları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerler, baz diziliş ve sayıları ile DNA yapışma sıcaklıkları.

Primer İsimleri	Primer Baz Dizileri 5' → 3'	Baz Sayısı	Yapışma Sıcaklıkları (°C)
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17	52
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	18	52
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	18	52
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	18	54
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	18	54
UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	18	54
A105ISSR02	(TG) <sub>3</sub> C(GT) <sub>6</sub>	19	54
B108ISSR05	T(CA) <sub>9</sub>	19	54
A110ISSR03	A(GT) <sub>9</sub>	19	54

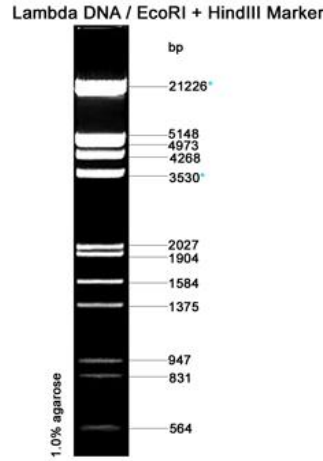
Genomik DNA'nın çoğaltımı için PCR reaksiyonları, thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient) cihazında (Şekil 3.15) yürütülmüştür. PCR döngü ve sıcaklık koşulları; 1. Adım- 94 °C'de 2 dakika 1 döngü, 2. Adım- 94 °C'de 1 dakika, 52 °C'de (ve 54°C'de) 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika 40 döngü ve 3. Adım- 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır.



Şekil 3.15 PCR işlemlerinin gerçekleştirildiği Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient) cihazı.

PCR reaksiyonu sonrasında amplifikasyon ürünleri % 1.8'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Bu amaçla 23x25 cm'lik elektroforez tankı için 5.2 g agaroz ile 290 ml 0.5 X TBE tampon çözeltisi erlenmayere konulmuş ve agarozun çözünmesi için mikrodalga fırında 600 watt'ta yaklaşık 6 dakika işleme tabi tutulmuştur. Sonrasında çözeltinin tanka konulabilmesi için sıcaklığın yaklaşık 55<sup>0</sup>C'nin altına düşmesi gerektiğinden manyetik karıştırıcıya konularak karıştırılmış ve soğuması beklenmiştir. İstenilen sıcaklığa geldiği tahmin edilen çözelti, düz bir yüzeye konulup su terazisi ile ayarlanan tanka dökülmüş ve taraklar takılmıştır. Donması için yaklaşık yarım saat bekletilmiştir.

Tarakların çıkarılması sonrasında jelde oluşan haznelere PCR ürünleri yüklenmiş ve 0.5 X TBE tampon çözeltisinde 150 voltda 3 saat koşturulmuştur. Bant büyüklüklerinin belirlenmesinde  $\lambda$  DNA'nın EcoRI ve HindIII kesim enzimleri ile hazırlanmış olan DNA standart markör olarak kullanılmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. “Size marker” olarak kullanılan, DNA’nın EcoRI ve HindIII kesim enzimleri ile hazırlanmış olan DNA’sı

Elektroforez işlemi sonrasında jel tanktan çıkartılarak küvete alınmış ve jelin üstüne çıkacak şekilde etidyum bromür konulmuştur. Otomatik çalkalayıcıda 5 dakika çalkalanarak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında etidyum bromür kendi kabına alınmış, küvete bu sefer saf su eklenerek jelin durulanması için tekrar aynı hızda ve sürede çalkalanmıştır. Bantların değerlendirilebilmesi için jeller boyama işleminden sonra UV transilluminatör yardımı ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 3.2.4 Verilerin Değerlendirilmesi

Genotipler arasındaki genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerleri, ISSR bantlarının polimorfik olup olmamasına göre varlığında 1, yokluğunda 0 olacak şekilde sınıflandırılarak hazırlanmış olan veri matrisinden yararlanarak Nei ve Li (1979) tarafından geliştirilen benzerlik oranı formülüne göre hesaplanmış ve genetik uzaklık matrisi elde edilmiştir. Çoğaltılan her ISSR primeri için polimorfizm bilgi içeriği (PIC) PowerMarker V 3.25 paket programı yardımı ile hesaplanmıştır. Genetik benzerlik indeksi Jaccard’a göre hesaplanmış ve NTSYS-version 2.0 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Rohlf, 1998) istatistik paket programında UPGMA (Unweighted pair-group method arithmetic average) gruplandırmasına göre genotiplere ait dendrogram elde edilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Pamuk (*G. hirsutum* L.) çeşitlerinde genetik çeşitliliği ortaya koyabilmek amacıyla öncelikle polimorfik olabilecek ISSR primerlerini saptamak üzere 8 pamuk çeşidinde 24 ISSR primeri test edilmiştir. Test sonucunda PCR ürünü meydana getiren 9 ISSR primeri belirlenmiş (Şekil 3.13-3.14) ve 30 pamuk çeşidinde moleküler analizler bu primerler ile devam ettirilmiştir. Jel görüntülerinin işlenmesi neticesinde, tüm genotipler için oluşan toplam bant sayıları ile elde edilen polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranı değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelgeden görüleceği gibi kullanılan 9 adet ISSR primerinin 30 adet pamuk genotipinde, 41 bant oluşturduğu ve bu bantlardan ortalama 22.3 tanesinin polimorfik olduğu görülmüştür. Primer başına polimorfik bant sayısı ortalama 2.5 bulunmuştur.

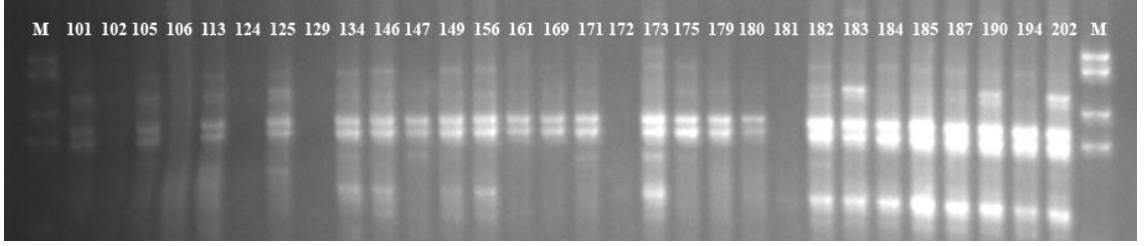
Polimorfizm oranları açısından primerler kıyaslandığında en yüksek polimorfizm oranının 0.89 ile A110ISSR03 ISSR primerinden elde edildiği görülmektedir. En düşük polimorfizm ise A105ISSR02 primerinde saptanmıştır. Öte taraftan diğer bazı primerlerde de polimorfizm oranı düşük olmakla beraber, kullanılan tüm primerlerin pamukta polimorfik bant üretebildikleri, polimorfik bant oranının % 6 ile % 89 arasında değiştiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. ISSR Primerlerinin Amplifikasyonu Sonucu Elde Edilen Toplam Bant Sayıları, Polimorfik Bant Sayıları ve Polimorfizm Oranları

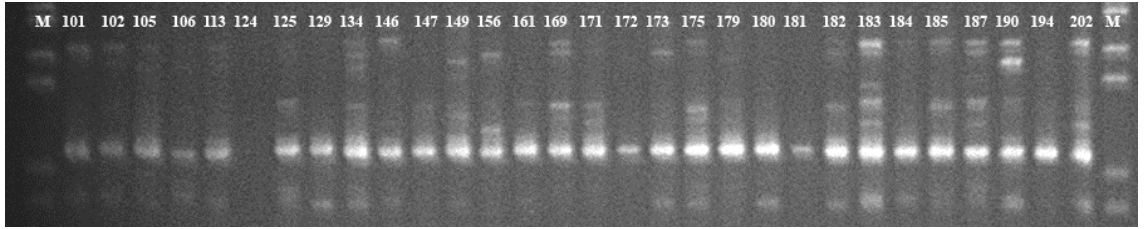
<b>Primer İsimleri</b>	<b>Toplam Bant Sayısı</b>	<b>Ort. Polimorfik Bant Sayısı</b>	<b>Polimorfizm Oranı</b>
UBC 827	5	2.4	0.48
UBC 836	5	3.3	0.65
UBC 835	6	1.2	0.19
UBC 841	5	2.4	0.49
UBC 844	3	2.6	0.88
UBC844	3	2.2	0.72
A105ISSR02	4	0.2	0.06
A110ISSR03	6	5.3	0.89
B108ISSR05	4	2.7	0.68
<b>Toplam</b>	<b>41</b>	<b>22.3</b>	<b>0.56</b>

İncelenen genotipler arasında polimorfik (allel farklılıkları) farklılıkların oranının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum seçilen primerlerin daha önceden test edilerek genotipler arasında polimorfik bant oluşturduğu tespit edilmiş olanlardan seçilmesi, çalışmada da polimorfizm oranını artırmıştır.

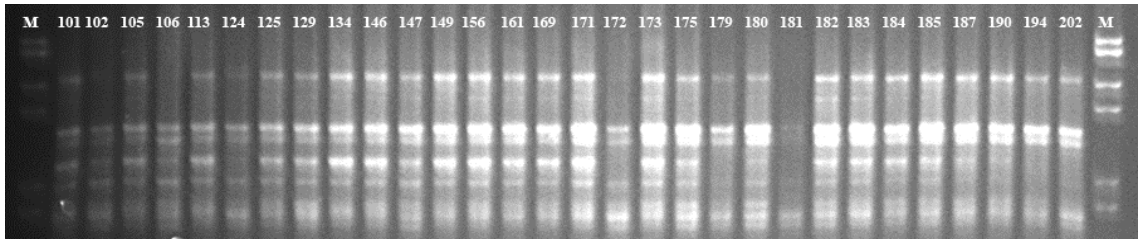
Amplifikasyon sonucunda oluşan her bir primer'e ait ISSR PCR ürünleri jel görüntüleri Şekil 4.1-4.9 aralığında sunulmuştur.



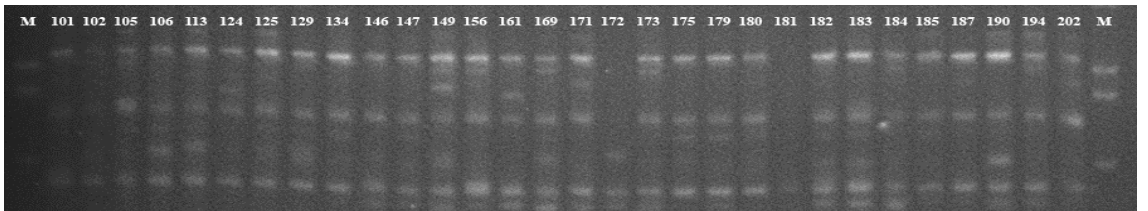
Şekil 4.1 UBC 827 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



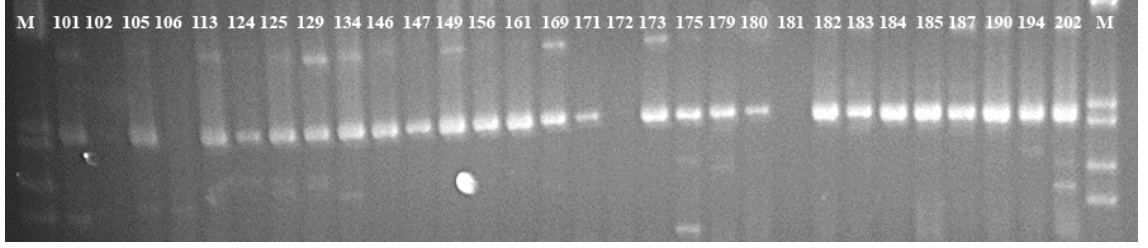
Şekil 4.2 UBC 835 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



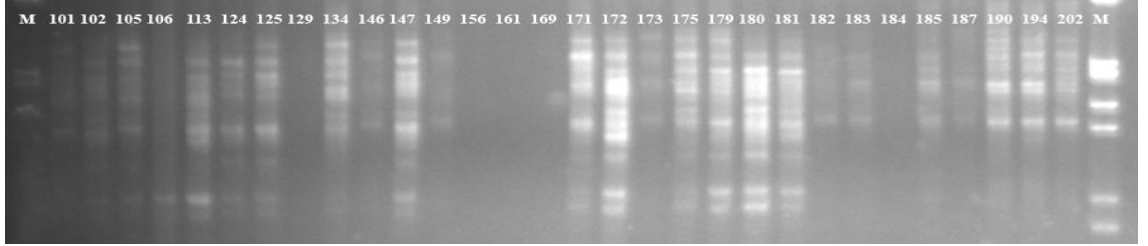
Şekil 4.3 UBC 836 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



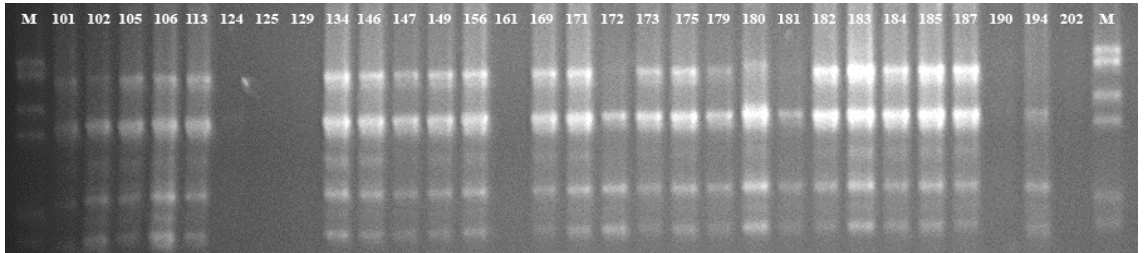
Şekil 4.4 UBC 841 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



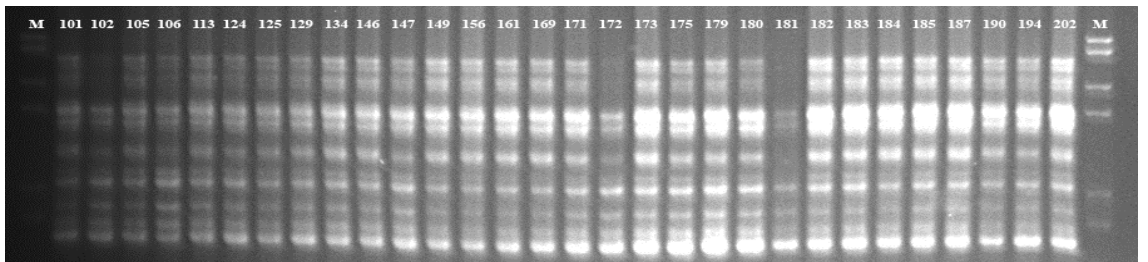
Şekil 4.5 UBC 844 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



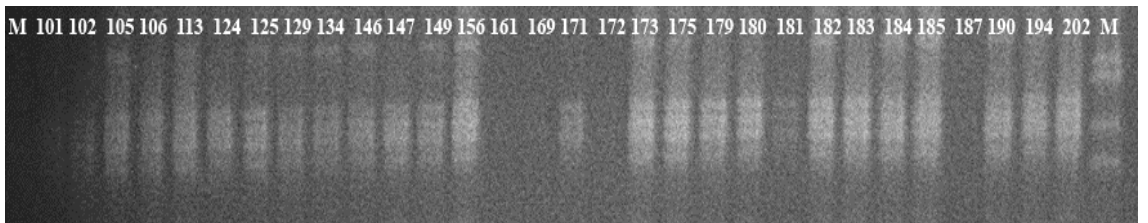
Şekil 4.6 UBC 855 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



Şekil 4.7 A105ISSR02 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



Şekil 4.8 A110ISSR03 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri



Şekil 4.9 B108ISSR05 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan ISSR PCR ürünleri

Araştırmada kullanılan primerlerin baz dizilimleri, baz sayıları ve polimorfik bilgi içeriği değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Polimorfik bilgi içeriği (PIC) incelendiğinde; en yüksek PIC değerinin 0.68 ile UBC 836 primerinden, en düşük PIC değerinin ise 0.19 ile UBC 841 primerinden elde edildiği görülmüştür. Ortalama PIC değeri ise 0.49 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. ISSR Primerlerinin nükleotid dizilimi ve PIC (polimorfik bilgi içeriği) değerleri.

Primer İsimleri	Primer Dizileri 5’-3’	Baz Sayısı	PIC Değerleri
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17	0.61
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	18	0.68
UBC 835	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	18	0.62
UBC 841	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	18	0.19
UBC 844	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	18	0.50
UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	18	0.40
A105ISSR02	(TG) <sub>3</sub> C(GT) <sub>6</sub>	19	0.48
A110ISSR03	T(CA) <sub>9</sub>	19	0.43
B108ISSR05	A(GT) <sub>9</sub>	19	0.48
<b>ORTALAMA</b>			0.49

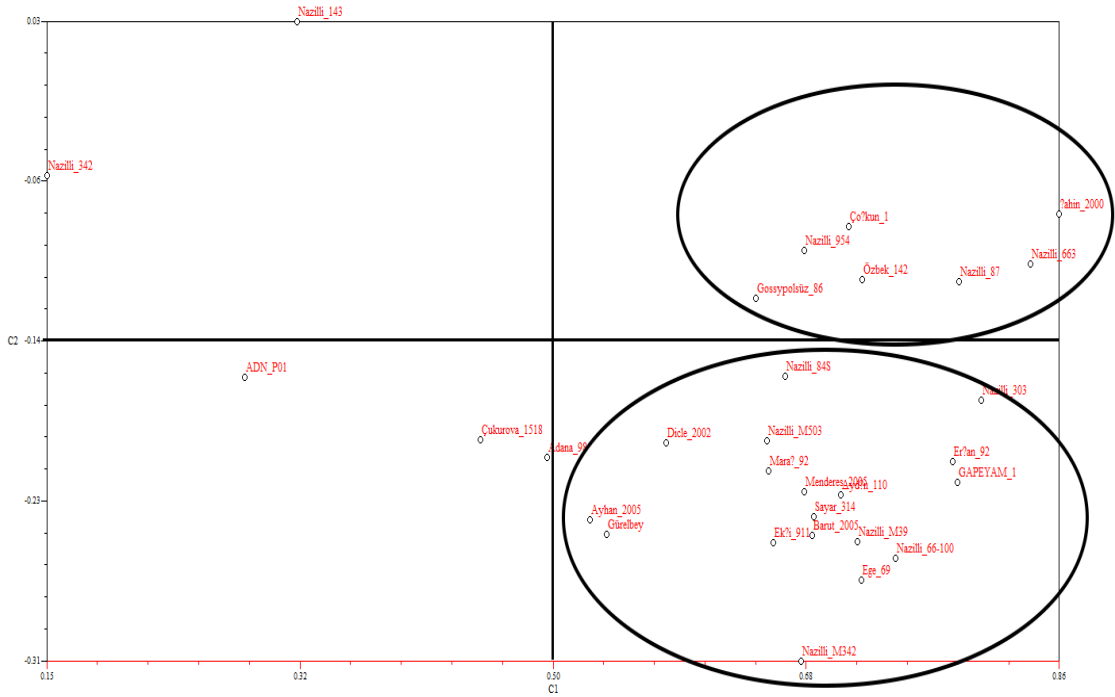
ISSR DNA markör verileri kullanılarak *G. hirsutum* L. genotipleri arasında Jaccard (1908) yöntemine göre hesaplanan Jaccard benzerlik katsayı değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Ortalama Jaccard benzerlik katsayısı 0,77 olarak bulunmuştur. Jaccard benzerlik katsayısına göre *G. hirsutum* L. genotipleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, genetik bazda en yakın Nazilli 303 genotipinin 0.20 benzerlik katsayısı ile Erşan-92 ve Gapeyam-1 genotipleri ile, Nazilli 66-100 genotipinin yine 0.20 benzerlik katsayısı ile Gapeyam-1 genotipi ile genetik yakınlık gösterdiği saptanmıştır. Genetik bazda en uzak genotipler için benzerlik katsayısı ise 1.41 olarak belirlenmiştir.

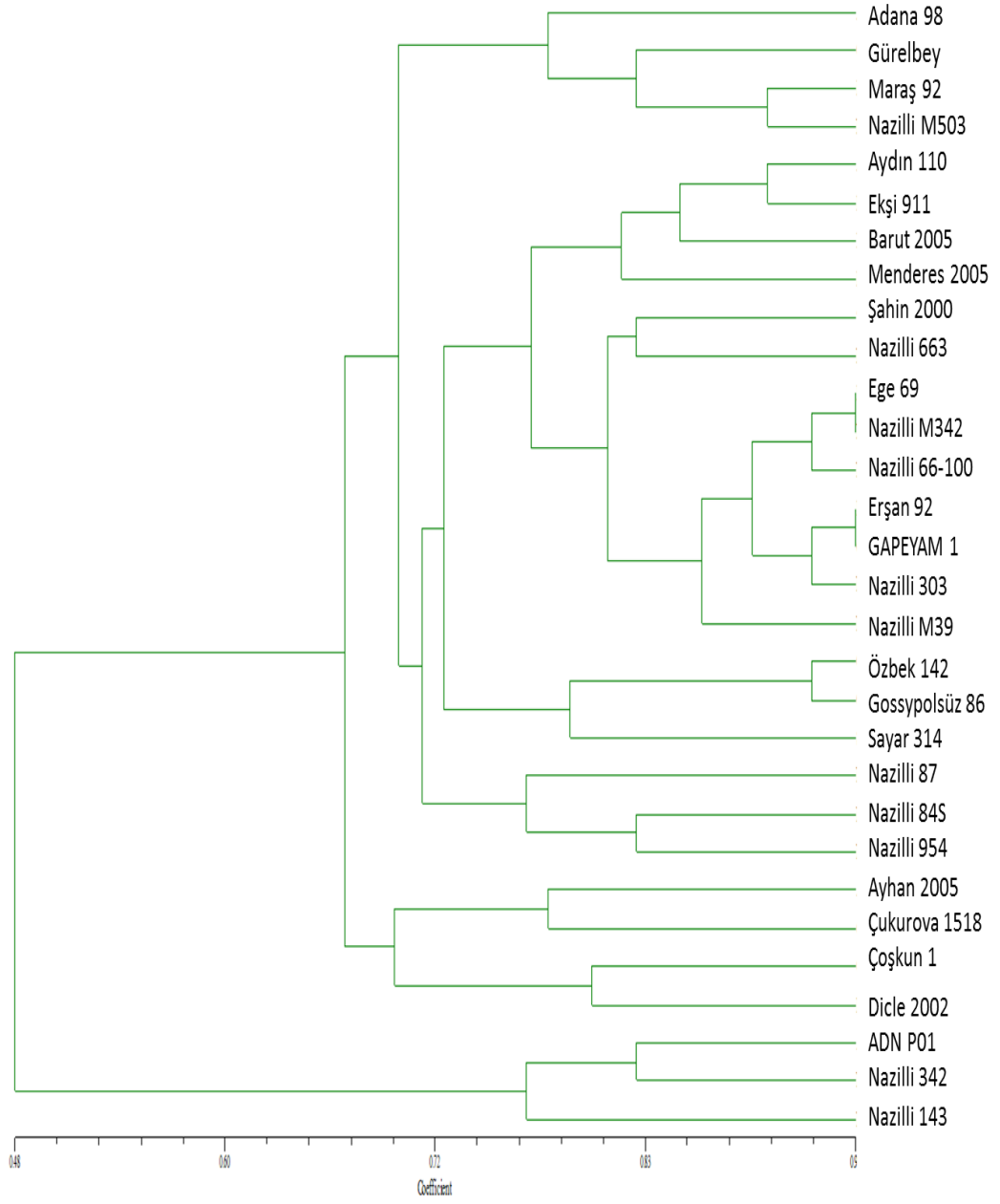
Çizelge 4.3. Genotipler arasındaki genetik mesafe (Genetic Distance) matrix çizelgesi

ÇEŞİT	Adana 98	ADN P01	Aydın 110	Ayhan 2005	Barut 2005	Coskun 1	Cukurova 1518	Dicle 2002	Ege 69	Eksi 911	Ersan 92	Gapeya m-1	Gossipo lsuz 86	Gurel bey	Maras 92	Menderes	Nazilli 143	Nazilli 303	Nazilli 342	Nazilli 66-100	Nazilli 663	Nazilli 84 S	Nazilli 87	Nazilli 954	Nazilli M 342	Nazilli M 39	Nazilli M 503	Ozbek 142	Sahin 2000	Sayar 314	
Adana 98	0,0000																														
ADN P01	1,4142	0,0000																													
Aydın 110	0,7071	1,4142	0,0000																												
Ayhan 2005	0,9428	0,7071	0,5303	0,0000																											
Barut 2005	0,9428	1,4142	0,3536	0,8839	0,0000																										
Coskun 1	0,8485	1,4142	0,2020	0,6061	0,6061	0,0000																									
Cukurova 1518	0,7071	1,4142	0,4714	0,4714	0,4714	0,7071	0,0000																								
Dicle 2002	0,7071	1,4142	0,2828	0,5657	0,5657	0,2828	0,8485	0,0000																							
Ege 69	1,1785	1,4142	0,4041	1,0102	0,6061	0,4714	0,8485	0,5657	0,0000																						
Eksi 911	0,9428	1,4142	0,7071	0,8839	0,3536	0,6061	0,4714	0,8485	0,8081	0,0000																					
Ersan 92	0,9428	1,4142	0,6061	1,0102	0,8081	0,7071	1,1314	0,2828	0,2020	1,0102	0,0000																				
Gapeyam-1	1,1785	1,4142	0,6061	1,2122	0,6061	0,7071	0,8485	0,8485	0,2020	0,8081	0,4041	0,0000																			
Gossipolsuz 86	1,1314	1,4142	1,4142	1,2122	1,2122	1,2122	1,1785	1,1314	0,9428	0,8081	0,7071	0,9428	0,0000																		
Gurelbey	1,4142	1,4142	0,5657	0,8485	0,5657	0,5657	0,7071	0,7071	0,2828	0,5657	0,5657	0,5657	1,1314	0,0000																	
Maras 92	0,9428	1,4142	0,7071	0,9428	0,7071	0,8485	1,0607	0,3536	0,4714	0,7071	0,2357	0,7071	0,8485	0,2828	0,0000																
Menderes 2005	1,4142	1,0607	0,7071	0,7071	0,7071	0,8081	0,7071	0,8485	0,6061	0,8839	0,8081	0,8081	1,2122	0,0000	0,4714	0,0000															
Nazilli 143	0,5657	1,0607	1,1785	1,1785	1,1785	1,4142	1,1314	1,4142	1,1314	1,1785	1,1314	1,1314	1,4142	1,4142	1,1314	1,4142	0,0000														
Nazilli 303	0,9428	1,4142	0,8081	1,2122	0,8081	0,9428	1,1314	0,5657	0,4041	1,0102	0,2020	0,2020	0,7071	0,8485	0,4714	1,0102	1,1314	0,0000													
Nazilli 342	1,4142	0,9428	1,4142	1,0607	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,4142	1,0607	1,4142	0,0000												
Nazilli 66-100	0,9428	1,4142	0,4041	1,0102	0,6061	0,4714	0,8485	0,8485	0,4041	0,8081	0,6061	0,2020	1,1785	0,5657	0,7071	0,8081	1,1314	0,4041	1,4142	0,0000											
Nazilli 663	0,9428	1,4142	1,0102	1,0102	1,0102	1,1785	0,8485	0,8485	0,6061	0,8081	0,4041	0,4041	0,4714	0,8485	0,4714	1,0102	1,1314	0,2020	1,4142	0,6061	0,0000										
Nazilli 84 S	1,1785	1,0607	0,8839	1,0607	0,7071	1,0102	0,7071	1,1314	0,6061	0,5303	0,8081	0,6061	1,0102	0,2828	0,4714	0,7071	0,9428	0,8081	1,4142	0,6061	0,6061	0,0000									
Nazilli 87	0,9428	1,4142	0,5303	0,7071	0,8839	0,4041	0,7071	0,8485	0,4041	0,5303	0,6061	0,6061	0,8081	0,2828	0,4714	0,7071	1,1785	0,8081	1,4142	0,4041	0,6061	0,5303	0,0000								
Nazilli 954	1,1785	1,0607	0,8839	0,7071	0,7071	0,6061	0,4714	0,8485	1,0102	0,3536	1,2122	1,0102	0,8081	0,8485	1,1785	0,8839	1,4142	1,2122	1,4142	1,0102	1,0102	0,8839	0,7071	0,0000							
Nazilli M 342	0,9428	1,4142	0,4041	1,0102	0,4041	0,4714	0,8485	0,8485	0,4041	0,6061	0,6061	0,4041	0,9428	0,5657	0,7071	0,8081	1,1314	0,6061	1,4142	0,2020	0,8081	0,6061	0,4041	0,8081	0,0000	0,0000					
Nazilli M 39	0,9428	1,4142	0,4041	1,0102	0,4041	0,4714	0,8485	0,8485	0,4041	0,6061	0,6061	0,4041	0,9428	0,5657	0,7071	0,8081	1,1314	0,6061	1,4142	0,2020	0,8081	0,6061	0,4041	0,8081	0,0000	0,0000					
Nazilli M 503	0,7071	1,4142	0,7071	0,9428	0,7071	0,8485	1,0607	0,7071	0,7071	0,7071	0,4714	0,7071	0,5657	0,8485	0,4714	0,9428	1,1314	0,4714	1,4142	0,4714	0,4714	0,7071	0,4714	0,9428	0,2357	0,2357	0,0000				
Ozbek 142	1,1314	1,4142	1,0102	1,2122	0,8081	1,0102	1,1785	0,5657	0,4714	1,0102	0,2357	0,4714	0,6061	0,8485	0,5657	1,0102	1,4142	0,2357	0,9428	0,7071	0,4714	1,0102	1,0102	1,0102	0,4714	0,4714	0,2828	0,0000			
Sahin 2000	1,4142	1,0607	0,5303	0,7071	0,7071	0,6061	0,7071	0,5657	0,2020	1,0607	0,4041	0,4041	1,0102	0,2828	0,7071	0,3536	1,4142	0,6061	1,4142	0,6061	0,8081	0,8839	0,7071	0,8839	0,6061	0,6061	0,9428	0,6061	0,0000		
Sayar 314	1,1785	1,4142	0,7071	0,7071	0,7071	0,8081	0,4714	1,1314	0,8081	0,7071	1,0102	0,8081	0,8081	0,5657	0,9428	0,7071	1,4142	1,0102	1,0607	0,6061	0,8081	0,7071	0,5303	0,7071	0,4041	0,4041	0,4714	0,8081	0,7071	0,0000	

ISSR verileri kullanılarak NTSYS paket programı yardımı ile Nei (1972)'ye göre yapılan UPGMA (Unweighted Pair Group With Arithmetic Average) kümeleme analiz sonucu Şekil 4.10'da verilmiştir. Elde edilen dendrogram haritası ise Şekil 4.11'de görülmektedir. Her iki şekilden de görüleceği üzere 30 pamuk çeşidi genetik yakınlık açısından 2 ana kümeye ayrılmıştır. Ana kümenin birinde ADN P01, Nazilli 342 ve Nazilli 143 çeşitleri yer almıştır. Diğer ana küme ise iki alt kümeye, alt kümelerden biri ise kendi içerisinde tekrar ikiye ayrılmıştır. Nitekim, Erkılınç ve Karaca (2005)'nin yaptığı çalışmada olduğu gibi Ege 69 ile Nazilli 66-100, Nazilli M503 ile Maraş 92, Nazilli 87 ile Nazilli 84S genotipleri aynı alt kümelerde yer almıştır. Ek olarak, Bardak ve Bolek (2012)'in yaptığı çalışma ile benzeşen sonuçlar bulunmaktadır. Şöyle ki, Sayar 314, Erşan 92 ve Maraş 92 genotipleri çalışmamızda da aynı küme içerisinde yer almıştır.



Şekil 4.10. ISSR verileri kullanılarak hazırlanan kümeleme analizi



Şekil 4.11. ISSR verileri kullanılarak UPGMA metoduna göre çizilen genetik benzerlik dendrogram.

Sonuç olarak; ISSR moleküler DNA tekniği analizinde UBC 827, UBC 836, UBC 835, UBC 841, UBC 844, UBC844, A105ISSR02, A110ISSR03 ve B108ISSR05 primerleri kullanarak ticari pamuk çeşitlerinin DNA bazında birbirlerinden ayrılabilceği, ISSR tekniğinin ucuz, kolay ve tekrarlanabilir özelliğinden dolayı bir dominant marker olarak olanakları kısıtlı laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada 30 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) genotipi genetik benzerlikleri DNA seviyesinde ISSR DNA markörü yardımıyla belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar kısaca aşağıda özetlenmiştir.

1. Çeşitleri DNA seviyesinde ayırmak için ilk önce 24 ISSR primer 8 pamuk çeşidinde ön araştırmada kullanılmış olup, bunlardan 9 adedinin PCR ürünü meydana getirdiği, 15 ISSR primerinin bir ürün meydana getirmediği saptanmıştır.
2. Kullanılan 9 adet 9 ISSR primerinin 30 adet pamuk genotipinde, 41 bant oluşturduğu ve bu bantlardan ortalama 22.3 tanesinin polimorfik olduğu saptanmıştır. Primer başına polimorfik bant sayısı ortalama 2.5 olarak bulunmuştur.
3. Polimorfizm oranları açısından primerler kıyaslandığında en yüksek polimorfizm oranı 0.89 ile A110ISSR03 ISSR primerinde elde edilirken, en düşük polimorfizm ise A105ISSR02 primerinde saptanmıştır.
4. Kullanılan tüm primerlerin pamukta polimorfik bant üretebildikleri, polimorfik bant oranının % 6 ile % 89 arasında değiştiği belirlenmiştir.
5. ISSR primerlerine ilişkin polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerleri 0.19 ile 0.68 aralığında değişim göstermiştir.
6. En yüksek polimorfik bilgi içeriği (PIC) olan 0.68 değer UBC 836 primerinde, en düşük PIC değer ise 0.19 ile UBC 841 primerinden elde edilmiş ve tüm primerler için ortalama PIC değer ise 0.49 olarak hesaplanmıştır.
7. Ortalama Jaccard benzerlik katsayısı 0.77 olarak bulunmuştur.
8. Jaccard benzerlik katsayısına göre Nazilli 303 genotipinin 0.20 benzerlik katsayısı ile Ersan -92 ve Gapeyam-1 genotipleri ile en yakın benzerlik gösterdiği, Nazilli 66-100 genotipinin yine 0.20 benzerlik katsayısı ile Gapeyam-1 genotipi ile genetik yakınlık içinde olduğu saptanmıştır. Genetik bazda en uzak genotipler için benzerlik katsayısı ise 1.41 olarak belirlenmiştir.
9. UPGMA kümeleme analiz sonucu 30 pamuk çeşidi genetik yakınlık açısından 2 ana kümeye ayrılmıştır. Ana kümenin birinde ADN P01, Nazilli 342 ve Nazilli

143 çeşitleri yer alırken diğer ana küme de iki alt kümeye, alt kümelerden biri ise kendi içerisinde yine tekrar iki alt kümeye ayrılmıştır.

10. ISSR moleküler markör tekniğinin pamukta genetik çeşitliliği belirleme çalışmalarında başarıyla uygulanabileceği, bununla birlikte göstermiş olduğu yüksek polimorfizm ve tekrarlanabilme özelliğinden dolayı, laboratuvar olanakları kısıtlı birçok laboratuvar da başarıyla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abdi, A.A., Sofalian, O., Asghari A., Shokrpour, M., Baqheri, H. and Seyyed Masoumi, S.Y., 2012. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers to Study Genetic Diversity Among Cotton Cultivars in Associated with Salt Tolerance. **Not Sci Biol**, 4(4):120-126
- Abdurakhmonov, I.Y., Kohel, R.J., Saha, S., Pepper, A.E., Yu, J.Z., Buriev, Z.T., Shermatov, S.E., Abdullaev, A.A., Kushanov, F.N., Jenkins, J.N., Scheffler, B. and Abdukarimov, A., 2006. Molecular Genetic Diversity of *G. hirsutum* Cotton Accessions From Uzbek Cotton Germplasm Revealed By Core Set And Chromosome Specific Microsatellite Markers. **Plant & Animal Genomes XIV Conference**, January 14-18, San Diego.
- Abdurakhmonov, I.Y., Kohel, R.J., Yu, J.Z., Pepper, A.E., Abdullaev, A.A., Kushanov, F.N., Salakhutdinov, I.B., Buriev, Z.T., Saha, S., Scheffler, B.E., Jenkins, J.N. and Abdukarimov, A., 2008. Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. **Genomics**, 92: 478–487.
- Adawy, S., Hussein, E. and El-Itriby, H., 2006. Molecular characterization and genetic relationships among cotton genotypes 2- AFLP Analysis. **Arab J. Biotech.**, 9: 477-492
- Ahmed, M.M., Guo, H., Huang, C., Zhang, X. and Lin, Z., 2013. Selection of core SSR markers for fingerprinting upland cotton cultivars and hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, 7(12):1912-1920
- Anonim, 2014a. www.ttsm.gov.tr Erişim tarihi: 11.11.2014
- Anonim, 2014b. www.tuik.gov.tr Erişim tarihi: 02.11.2014
- Anonymous, 2014. www.fao.org Erişim tarihi: 02.11.2014
- Bardak, A. and Bolek Y., 2012. Genetic diversity of diploid and tetraploid cottons determined by SSR and ISSR markers. **Turkish Journal of Field Crops**, 17(2):139-144
- Belaj, A., Satovic, Z., Cdpriani, G., Baldoni, L., Testolev, R., Rallo, L. and Trujtlo, I., 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. **Theoretical and Applied Genetics**, 107(4): 736-744.
- Bertini, C.H.C.M., Schuster, I., Sediya, T., Barros, E.G., Moreira, M.A., 2006. Characterization and Genetic Diversity Analysis of Cotton Cultivars Using Microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29(2): 321-329.
- Cardy, B.J. and Beversdorf, W.D., 1984. A procedure for the starch gel electrophoretic detection of isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Dep. Crop Sci. Tech. Bull** 119/8401. Univ. of Guelph, Ontario, Canada.
- Chaudhary, L., Sindhu, A., Kumar, M., Kumar, R. and Saini, M., 2010. Estimation of genetic divergence among some cotton varieties by RAPD analysis. **In Journal of Plant Breeding and Crop Science**, 2:39-43.
- Dongre, A. and Parkhi, V., 2005. Identification of Cotton Hybrid Through the Combination of PCR Based RAPD, ISSR and Microsatellite Markers. **J. Plant Biochemistry & Biotechnology**, 14: 53-55.
- Dongre, A.B., Bhandarkar, M. and Banerjee, S., 2007. Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium* spp.) using ISSR and microsatellite DNA markers. **Indian Journal of Biotechnology**, 6:349-353

- Dongre, A., Parkhi, V. and Gahukar, S., 2004. Characterization of cotton (*Gossypium hirsutum*) germplasm by ISSR, RAPD markers and agronomic values. **Indian Journal of Biotechnology**, 3:388-393
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochemical Bulletin**, 19(1): 11-15.
- Erkılınç, A. and Karaca, M., 2005. Assessment of Genetic Variation in Some Cotton Varieties (*Gossypium hirsutum* L.) Grown in Turkey Using Microsatellite. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 18 (2) : 201-206.
- Fernandez, M.E., Figueiras, A.M. and Benito, C., 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. **Theor. Appl. Genet.**, 104:845-851
- Ghany, A.G.A.A. and Zaki, E.A., 2003. DNA Sequences of RAPD Fragments in the Egyptian Cotton *Gossypium barbadense*. **African Journal of Biotechnology** 2 (5) : 129-132.
- Gorman, M. B. and Kiang, Y.T., 1977. Variety-specific electrophoretic variants of four soybean enzymes. **Crop Science** 17: 963-965
- Guo, W., Wang, W., Zhou, B. and Zhang, T., 2006. Cross-species transferability of *G. arboreum*-derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium*. **Theor. Appl. Genet.**, 112: 1573–1581
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Murawski, D.A. and Loveless, M.D., 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Genetic and conservation of rare plants (Falk DA and Holsinger KE, eds.). **Oxford University Press**, New York, 75-86.
- Herrero, R., Asins, M.J., Carbonell, E.A. and Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. **Theor. Appl. Genet.** 92: 599-609.
- Hussein, E.H.A., Mohamed, A.A., Attia, S. and Adawy, S.S., 2006. Molecular characterization and genetic relationships among cotton genotypes 1- RAPD, ISSR and SSR analysis. **Arab Journal of Biotechnology**, 9: 313-328.
- Hussein, E.H.A., Osman, M.H.A., Hussein, M.H. and Adawy, S.S., 2007. Molecular Characterization of Cotton Genotypes Using PCR-Based Markers. **Journal of Applied Sciences Research**, 3 (10): 1156- 1169.
- Iqbal, M.J., Aziz, N., Saeed, N.A., Zafar, Y. and Malik, K.A., 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Jan;94(1):139-44
- Jana, T., Sharma, T. and Singh, N., 2005. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Mycol. Res.** 109 (1): 81–86
- Jia, Y., Sun, J., Wang, X., Zhou, Z., Pan, Z., He, S., Pang, B., Wang, L. and Du, X., 2014. Molecular Diversity and Association Analysis of Drought and Salt Tolerance in *Gossypium hirsutum* L. Germplasm. **Journal of Integrative Agriculture**, 13(9): 1845-1853
- Jiang, W., Zhu, H. and He, J., 2008. Genetic diversity in germplasm resources of cotton from different area based on ISSR markers. **Cotton Science**, 20(5):348-353
- Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L. and Zehr, B.E., 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, 1 (4) : 365-373

- Khan, S.A., Hussain, D., Askari, E., Stewart, J.McD, Malik, K.A. and Zafar, Y., 2000. Molecular Phylogeny of *Gossypium* species by DNA Fingerprinting. **Theor. Appl. Genet.** 101: 931-938.
- Kohel, R.J., 1989. Cotton. (Robbelen, G., Downey, R.K., Ashri, A.) In: **Oil Crops of the World**, 404-415, McGraw-Hill, New York.
- Kwon, Y.S., Ryu, T.H., Kim, C.H., Song, I.H. and Kim, K.M., 2004. A Comparative Study of the RAPD and SSR Markers in Establishing a Genetic Relationship of the Various Types of Cucurbita. **Korean Journal of Genetics**, 26 (2): 115-122.
- Li-Wang, L., Li-Ping, Z., Yi-Qin, G., Ming-Xia, W., Li-Ming, C., Jin-Lan, Y., Yan, W., Fan-Min, Y. and Long-Zhi, W., 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, 116:240-247.
- Liu, B. And Wendel, J.F., 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, 1(3): 205-208.
- Lu, H.J. and Myers, G.O., 2002. Genetic Relationships and Discrimination of Ten Influential Upland Cotton Varieties Using RAPD Markers. **Theor. Appl. Genet.**, 105: 325-331.
- Mehetre, S.S., Gomes, M. and Eapen, S., 2004. RAPD Analysis of Hybrid Nature of the Offspring of *Gossypium hirsutum* x *G. raimondii*. **Current Science**, 87(1): 25-28
- Mert, M., 2009. Lif Bitkileri. **Nobel Yayın Dağıtım**, 1446, 278 s, Ankara.
- Mignouna, H.D., Abanf, M.M. and Fagbemi, S.A., 2003. A Comparative Assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for White yam (*Dioscorea rotundata* Poir )germ plasm characterisation. **Annals of Applied Biology**, 142 :269-276.
- Multani, D.S. and Lyon, B.R., 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. **Genome**, Oct;38(5):1005-8.
- Murtaza, N., 2006. Cotton Genetic Diversity Study by AFLP Markers. **Journal of Biotechnology**, 9 (4): 456-60
- Nagaoka, T. and Ogihara, Y., 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 94 (5) : 597-602
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106: 283-292
- Nei, M. and Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 76: 5269-5273.
- Noormohammadi, Z., Hasheminejad-Ahangarani Farahani, Y., Sheidai, M., Ghasemzadeh-Baraki, S. and Alishah, O., 2013. Genetic diversity analysis in Opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, 12 (1): 256-269
- Noormohammadi, Z., Shojaei-Jesvaghani, F., Sheidai, M., Farahani, F. and Alishah, O., 2011. Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. **African Journal of Biotechnology**, 10(56):11839-11847
- Peirce, L.C. and Brewbaker, J.L., 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hort. Science**, 8: 17-22

- Pillay, M. and Myers, G.O. 1999. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. **Crop Science**, November-December. 39:1881-1886.
- Preetha, S. and Raveendran, T.S., 2008. Combining ability and heterosis for yield and fibre quality traits in line x tester crosses of Upland cotton (*G. hirsutum* L). **International Journal of Plant Breeding and Genetics**, 2(2): 64-74.
- Punitha, D. and Raveendran, T.S., 2004. DNA Fingerprinting Studies in Coloured Cotton Genotypes. **Plant Breeding**, 123: 101-103.
- Qian, W., Ge, S. and Hong, D.Y., 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 440-449.
- Rahman, M., Hussain, D. and Zafar, Y., 2002. Estimation of Genetic Divergence among Elite Cotton Cultivars-Genotypes by DNA Fingerprinting Technology. **Crop Sci.**, 42: 2137-2144.
- Rana, M.K. and Bhat, K.V., 2004. A Comparison of AFLP and RAPD Markers for Genetic Diversity and Cultivar Identification in Cotton. **J. Plant Biochemistry & Biotechnology**, 13: 19-24.
- Rana, M.K. and Bhat, K.V., 2005. RAPD Markers for Genetic Diversity Study Among Indian Cotton Cultivars. **Current Science**, 88: 1956-1961
- Reinisch A.J., Dong J.M., Brubaker C.L., Stelly D.M., Wendel J.F. and Paterson A.H. 1994. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. **Genetics**, 138:829-847.
- Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0, User's Guide. New York: Exeter Software.
- Roose, M.L. 1988. Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. v.1, p.155-165. In: **Proceedings of the International Citrus Congress**, 6th, Tel Aviv.
- Sheidai, M., Noormohammadi, Z., Shojaei-Jeshvaghani, F., Ghsemzadeh-Baraki, S., Farahani, F. and Alishah, O., 2012. Simple sequence repeat (SSR) and inter simple sequence repeat (ISSR) analyses of genetic diversity in tissue culture regenerated plants of cotton. **African Journal of Biotechnology**, 11(56): 11894-11900
- Salunkhe, S.N. and Deshmukh, Y.A., 2010. Molecular characterization of elite cotton cultivars using ISSR markers. **Asian Journal of Bio Science**, 4(2):249-253
- Sammour, R. H. 1991. Using electrophoretic techniques in varietal identification, biosystematic analysis, phylogenetic relations and genetic resources management. **J. Islamic Acad. Sci.**, 4: 221-226.
- Sanchez de la Hoz, M.P., Davila, J.A., Loarce, Y., and Ferrer, E., 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. **Genome**, 39(1):112-7
- Saravanan, S., Arutchendhil, P., Raveendran, T.S. and Koodalingam, K., 2006. Assessment of Genetic Divergence Among Introgressed Cultures of *Gossypium hirsutum* L. Through RAPD Analysis. **Journal of Applied Sciences Research**, 2(12): 1212-1216.
- Sheidai, M., Shahriari, Z.H., Rokneizadeh, H. and Noormohammadi, Z., 2007. RAPD and cytogenetic study of some tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars and their hybrids. **Cytologia**, 72: 77-82.

- Sofalian, O., Azimy, S., Jahanbakhsh, S., Khomari, S. and Dezhsetan, S., 2013. Evaluating genetic diversity of chilling stress in cotton genotypes. **Plant Breeding and Seed Science**, 68:77-87
- Sun, Y., Zhang, X., Nie, Y., Guo, X., Jin, S. and Liang, S., 2004. Production and Characterization of Somatic Hybrids Between Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*) and Wild Cotton (*G. klotzschianum* Anderss) via Electrofusion. **Theor. Appl. Genet.**, 109: 472-479.
- Sun, Y., Zhang, X., Nie, Y. and Guo, X., 2005. Production of Fertile Somatic Hybrids of *Gossypium hirsutum* + *G. bickii* and *G. hirsutum* + *G. stockii* via Protoplast Fusion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 83: 303-310.
- Surgun, Y., Col, B. and Burun, B., 2012. Genetic diversity and identification of some Turkish cotton genotypes (*Gossypium hirsutum* L.) by RAPD-PCR analysis. **Turk J Biol**, 36: 143-150
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Peterson, A.H. and Bonierbale, M.W., 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for old sciences. **Biotechnology**, 7:257-264.
- Tatieni, V., Cantrell, R.G. and Davis, D.D., 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasms determined by morphological characteristics and RAPD. **Crop Science**, 36:186-192.
- Vafaie-Tabar, M., Chandrashekar, S., Rana, M.K. and Bhat, K.V., 2004. RAPD Analysis of Genetic Diversity in Indian Tetraploid and Diploid Cotton (*Gossypium* spp). **J. Plant Biochemistry & Biotechnology** 13: 81-84.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A. R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 6531-6535.
- Zhang, H.B., Li, Y., Wang, B. and Chee, P.W., 2008. Recent advances in cotton genomics. **Int. J. Plant Genomics**, ID: 742304.
- Zhang, P.P., Wang, X.Q., Yu, Y., Lin, Z.X. and Zhang, X.L., 2009. Isolation, Characterization, and Mapping of Genomic Microsatellite Markers in Sea-Island Cotton (*Gossypium barbadense*). **Acta Agronomica Sinica**, 35(6): 1013-1020.
- Zhu, H., Zhang, T., Yang, L. and Guo, W., 2009. EST-SSR sequences revealed the relationship of D-genome in diploid and tetraploid Species in *Gossypium*. **Plant Science**, 176:397-405
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20(2):176-183

## **ÖZGEÇMİŞ**

Yazar, 1987 yılında Çorum ili Mecitözü ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Çorum ve Mecitözü'ndeki okullarda tamamladı. 2007 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği programını kazandı. 2011 yılında Tarla Bitkileri Bölümü alt programından Ziraat Mühendisi unvanıyla mezun oldu. Aralık 2012'de Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.