



## Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Genotiplerinin Kısıntılı Sulama Koşullarında Çimlenme Analizleri ve Moleküler Karakterizasyonu

Eminur ELÇİ<sup>1\*</sup>, Tuğçe HANÇER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Niğde, TÜRKİYE

<sup>2</sup>ProGen Tohum A.Ş., Antakya-Hatay, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 19.02.2016

Kabul Tarihi/Accepted: 14.06.2016

\*Sorumlu yazar/Corresponding author: eminur@gmail.com

**Özet:** Pamuk bitkisi, ülkemiz için stratejik ve ekonomik öneme sahip olan bir üründür. Kuraklık stresi, dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de bitki büyüme ve verimini olumsuz yönde etkileyen en önemli çevresel stres faktörlerinden birisidir. Bu çalışmada, kuraklık stresine karşı toleranslı yeni yerli pamuk çeşitlerinin geliştirilmesi amacı ile tarımsal özellikleri bakımından seçilmiş olan 11 farklı pamuk çeşidinin kısıntılı sulama stratejileri altında çimlenme süresi ve çimlenme oranı incelenmiş ve mikrosatellit markörleri aracılığıyla moleküler olarak karakterize edilmiştir. Yapay ortamda % 25, % 50, % 75 ve % 100 sulama planı ile kısıntılı sulama uygulanarak kuraklık stresi uygulanmıştır. Bitkilerin % 50 ve % 25 sulama koşullarında strese girdikleri gözlenmiştir. Kısıntılı sulama koşullarında çimlenme süresi ve çimlenen bitki sayısı incelendiğinde; Tamcot Sphinx, Tamcot 94, Tamcot CamdEs ve BA525 çeşitlerinin diğerlerine oranla su stresine karşı daha toleranslı oldukları tespit edilmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları için ortalama 0.306 polimorfizm bilgi içeriğine (PIC, Polymorphism Information Content) sahip 28 adet markör kullanılarak Aritmetik Ortalama Kullanılarak Ağırlıksız Çift Grup Metodu (UPGMA) analizleri yapılmıştır. UPGMA analizleri sonucunda çeşitler iki grup altında sınıflanmıştır. Elde edilen bu verilerin, kuraklığa karşı toleranslı yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli bir bilgi sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Pamuk, kısıntılı sulama, moleküler markör, gruplandırma

## Molecular Characterization and Germination Analysis of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genotypes under Water Deficit Irrigation

**Abstract:** Cotton is an important crop in terms of economic and strategic impacts. Drought stress is one of the most important environmental stress factors which negatively affects growth and yield of plants in Turkey as occurred in many countries in the world. In this study, 11 different cotton cultivars selected based on their agronomical characters were tested under water deficit irrigation strategies. Thus, it was aimed to select and/or determine appropriate new varieties for breeding new national materials resistant to drought stress, and to characterize with the molecular microsatellite markers. According to the different irrigation levels (25%, 50%, 75% and 100%) plants were observed under the stressed conditions at the irrigation levels of 50% and 25%. Among the tested varieties, Tamcot Sphinx, Tamcot 94, Tamcot CamdEs and BA525 varieties were found to be more water stress tolerant than others in terms of germination time and germinated plant. The UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) analysis was carried out using 28 markers with average 0.306 polymorphism information content (PIC) for molecular characterization studies. Based on the UPGMA results, the varieties were clustered into two groups. It is expected that the results obtained from this study might provide considerable data for improving new drought tolerant varieties.

**Keywords:** Cotton, water deficit irrigation, molecular marker, clustering

## 1. Giriş

Pamuk, dünyanın önde gelen doğal lif kaynağı ve aynı zamanda biyoenerji üretimi için de önemli olan tek yıllık bir bitkidir (Chen ve ark., 2007). Malvaceae familyasının *Gossypium* cinsine ait olan pamuk, 45 diploid ( $2n=26$ ), 6 allotetraploid ( $2n=52$ ) olmak üzere yaklaşık olarak 51 tür içermektedir (Percival ve ark., 1999). *Gossypium* türleri kromozomal benzerliklerine dayanarak A'dan G'ye ve K olmak üzere 8 genomik grup içerisinde gruplandırılmakta ve her genom morfolojik olarak benzer türlerin bir grubunu temsil etmektedir. Allotetraploid türlerin A genomunda yer alan *G. arboretum* L. ( $2n=26$ ) ve *G. herbaceum* L. ( $2n=26$ ) ile D genomunda yer alan *G. raimondi* Ulbrich ve *G. gossypoides* L. ( $2n=26$ ) türlerinin melezlenmesi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir (Beasley, 1942; Wendel ve ark., 1992). Tetraploid pamuk türlerinden ekonomik olarak en önemli 2 tür, *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. türleridir. Dünyada pamuk üretiminde ilk sırada *G. hirsutum* L. gelmektedir ve dünyanın pamuk üretiminin % 90'ını karşılamaktadır (Chen ve ark., 2007).

Bitkiler yaşam süreleri boyunca çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz kalmaktadırlar. Bu stres faktörleri arasında bitki ürün verimini, metabolizmasını ve gelişimini en çok kısıtlayan faktörlerinden biri de kuraklıktır ve dünya üzerindeki ekilebilir tarım alanlarında görülen stres faktörleri içinde önemli bir paya sahiptir. Bitkiler üzerinde kuraklığın etkileri; kuraklığın şiddetine, süresine, diğer stres türleri ile etkileşimlerine, strese maruz kalan bitkinin genotipine, gelişim basamağına (çimlenme safhası, vejetatif safha ve üreme safhası), türüne, organ ve hücre tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Krieg, 1997). Bitkilerin ozmotik strese verdiği yanıt çok komplekstir (Blum, 1986) ve fizyolojik olarak dehidrasyon, bitkinin membran ve organel yapılarında, organellerin su ilişkileri, biyokimyasal ve fiziksel işlemlerinde köklü değişikliklere neden olmaktadır (Tuba ve ark., 1993; Sarafis, 1998).

Pamuk bitkisinin kuraklık stresine karşı toleranslı olduğu bilinmekte olup, toprağın nem seviyesi düştüğünde kuraklık stresine karşı koymak amacıyla bir takım koruma mekanizmaları geliştirdiği bildirilmiştir (Woodstock, 1998). Ancak bu koruma mekanizmalarının varlığına rağmen, çok şiddetli kuraklık stresine maruz kaldığında bitki büyümesinde ve ürün veriminde önemli derecelerde azalmalar görülebilmektedir (Blackman ve ark., 1992). Yer altı su kaynaklarının azalması ve bu nedenle de pamuk yetiştiriciliğinin maliyeti yüksek olan sulama teknikleri ile yapılması nedeniyle pamuk üreticileri

kuraklığa karşı toleranslı pamuk çeşitlerini tercih etmektedirler (Başal ve Ünay, 2006).

Uzun yıllardan beri bitkilerdeki kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmaları araştırılmakta ve bazı kuraklık stresi tarama yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden en eski, kolay ve güvenilir olanlardan bir tanesi de arazi koşulları altında yürütülen kuraklık stresi tarama yöntemidir (Zhang ve ark., 2007). Ancak yetiştirilme döneminde kısıntılı sulama koşulları altında yapılabilmesi, yoğun iş gücü gerektirmesi ve tekrar edilebilmesinin zaman alıcı olması nedeninden dolayı çok fazla tercih edilen bir tarama yöntemi değildir. Bu nedenle, yapay ortamlarda ozmotik strese neden olan Polyethylene Glycol-6000 (PEG-6000), mannitol, sodyum klorür (NaCl) gibi kimyasallar kullanılarak oluşturulan kuraklık stresi taramaları daha çok tercih edilmektedir (Michel ve Kaufmann, 1973; Macar ve ark., 2009; Turhan ve ark., 2014). Yine bir diğer yöntem olan yapay ortamda kısıntılı sulama stratejileri ile de bitkilerde kuraklık stresi taraması; tekrarlanabilir, kolay ve düşük maliyetli olarak güvenli bir şekilde yapılabilmektedir (Başal ve ark., 2009).

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da DNA parçasını temsil etmekte ve moleküler markör teknolojisi ile bitki materyalleri hızlı, etkili ve doğru bir şekilde geliştirilmektedir. Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin keşfinden sonra PCR yöntemine dayalı farklı moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA), Tek Primer Çoğaltma Reaksiyonu (SPAR, Single Primer Amplified Reaction), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism), Basit Dizi Tekrarları (SSR, Simple Sequence Repeats), Kesimlenmiş Çoğaltılmış Polimorfizm (CAP, Cleaved Amplified Polymorphism), Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP, Sequence-Related Amplified Polymorphism), Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) ve Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (ISSR, Inter Simple Sequence Repeats) gibi yaygın olarak kullanılan çok sayıda moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir (Gupta ve Varshney, 2000). Mikrosatellit olarak ta bilinen SSR'lar yüksek derecede polimorfizm göstermektedirler ve DNA dizileri boyunca art arda tekrar edilen en küçük birimlerdir. Genel olarak, tekrar motifleri 2 ile 6 baz çifti (bç) arasında değişmektedir. SSR'lar eş baskın (co-dominant) kalıtıma sahip olmaları, yüksek derecede polimorfizm göstermeleri, genom içinde bol miktarda ve dağınık halde bulunmaları,

tekrarlanabilir olmaları gibi birçok avantaja sahiptirler (Mondini ve ark., 2009).

Bu çalışmada, tarımsal özellikleri bakımından üstün olduğu bilinen bazı pamuk çeşitleri, kuraklık stresine karşı toleranslı yeni yerli çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılmak amacı ile kısıntılı sulama stratejileri uygulanarak yapay ortamda çimlenmeleri bakımından incelenmiş ve mikrosatellit markörleri aracılığıyla moleküler olarak karakterize edilmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bitki materyalleri

Bu çalışmada, ProGen Tohum A.Ş.'nin gen bankasından temin edilen 11 farklı pamuk çeşidi (Tamcot Sp21, Tamcot 22, Tamcot Sp23, Tamcot 94, Tamcot Camd-Es, Tamcot Sphinx, ST468, ST506, Flash, BA119, BA525) materyal olarak kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda, kuraklığa karşı toleranslı olduğu bildirilen "Tamcot Sphinx" (El-Zik ve Thaxton, 1996) ve duyarlı olduğu bildirilen "Stoneville 506" (ST506) (Pace ve ark., 1999) çeşitleri kontrol olarak kullanılmıştır.

### 2.2. Kuraklık stresi denemeleri

#### 2.2.1. Ön işlem

Temin edilen tohumlarda dormansi olması ihtimaline karşın, çimlenme analizlerini olumsuz etkilememesi açısından, tohumlar 45 °C'de, 72 saat boyunca etüvde tutularak dormansi kırılmıştır.

#### 2.2.2. Toprak su tutma kapasitesinin hesaplanması

Toprak su tutma kapasitesi Verdonck ve Gabriels (1992), tarafından geliştirilen ve Avrupa Birliği standardı olarak kabul edilen yöntem kullanılarak hesaplanmıştır. Bilinen hacimde (7 kg) toprak örneği önce çeşme suyu ile iyice doyurulmuş (24 saat), ardından bitkilerin maruz kalacağı su alma basıncında (1 kPa) drenaj sağlanmış (24 saat) ve yaş ağırlığı tartılmıştır. Daha sonra 105 °C'de sabit ağırlığa kadar kurutularak 24 saat bekletildikten sonra, kuru ağırlığı tartılmış ve tutulan toplam su miktarı hesaplanmıştır. Aradaki fark su tutma kapasitesi olarak belirlenmiştir.

#### 2.2.3. Kısıntılı sulama stratejisi ile kuraklık stresi oluşturma

Tohumlar, eşit aralıktaki elekler yardımı ile her bir saksıya 30 adet gelecek şekilde 3 tekerrürlü olarak ekilmiş ve % 25, % 50, % 75 ve % 100 sulama planı ile kısıntılı sulama uygulanmıştır. Plastik saksılar 25 cm x 22.5 cm ebatlarında olup,

her bir saksı 7 kg toprak içermektedir. Toprağın neme doymuş olduğu hacim (150 mm) % 100 olarak alınmış ve % 75 (~112 mm), % 50 (75 mm), % 25 (~40 mm) kısıntılı sulamalar 10 günde bir olacak şekilde 2 kere yapılmıştır. Saksılar, 16/8 fotoperiyotta % 65 nem ve 28/20 °C (gündüz/gece) sıcaklık koşullarındaki kontrollü iklim kabinlerinde tutulmuş ve bir ay boyunca incelenip, çimlenme süresi ve çimlenme oranları ölçülmüştür. Veriler, aritmetik ortalamalar alınarak analiz edilmiştir.

### 2.3. Moleküler karakterizasyon

#### 2.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonları Cetyl Trimethyl Amonyum Bromide (CTAB) metodu (Doyle ve Doyle, 1987) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taze yapraklar sıvı azot içerisinde homojenizatörde (TissueLyser, Qiagen, Almanya) parçalanmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır. Tüplere CTAB tampon solüsyonu (% 2 CTAB; 1M Tris-HCl, pH 7.5., 0.5 mM EDTA, pH 8.0; 5 M NaCl; % 2 β-mercaptoethanol) eklenerek 2 dakika homojenize edilmiş ve su banyosunda 65 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Tüplere fenol kloroform izoamilalkol (25:24:1) karışımı eklenip santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz temiz tüplere aktarıldıktan sonra üzerlerine kloroform izoamilalkol (24:1) karışımı eklenip santrifüj edilmiş ve aynı şekilde oluşan üst faz temiz tüplere aktarıp üzerine soğuk izopropanol eklenmiştir. DNA'nın yıkama ve çöktürme işlemi ise etanol ile yapıldıktan sonra izole edilmiş DNA'lar 50 µL TE solüsyonu pH 8.0 (0.1 Mm Tris-HCl; 0.1 mM EDTA) içerisinde su banyosunda 65 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. DNA'ların kalite ve konsantrasyonları spektrofotometre (NanoDrop 2000c, ThermoScientific, Almanya) ile ölçülmüş ve izole edilen DNA'lar -20 °C'de saklanmıştır.

#### 2.3.2. PCR analizleri

PCR analizleri, izole edilen DNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Toplam 28 adet SSR markörü kullanılmış (Tablo 1) ve PCR reaksiyonunda son hacim 25 µl olacak şekilde; steril su, 5X PCR solüsyonu, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM dNTP, 10 µM primer F ve R, 5 u µl Taq polimeraz ve 50 ng DNA eklenmiştir. PCR döngüsü; 2 dakika (denatürasyon), [94 °C'de 30 saniye, 50 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 1 dakika (bağlanma)] 35 döngü, 72 °C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde PCR (EpGradient Thermal Cycler Eppendorf, Almanya) cihazında yapılmıştır.

### 2.4. Veri analizi

Elde edilen PCR ürünleri, % 3'lük agaroz jel (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılarak 150 V

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan moleküler markörlerin primer dizisi, bağlantı noktaları, motifi, tekrar sayısı ve polimorfizm bilgi içerik (PIC) değerleri

Markör adı	İleri dizi (Forward sequence)	Ters dizi (Reverse sequence)	Bağlantı	Motif	Tekrar sayısı	PIC değeri
DPL 35	CATGGTTGTACCGGTTAGT ATGTG	CAGCAATGAGACCATTGTA TACCC	c06	GA	14	0.515
DPL 45	GCCCATGGAACCATATAGT AGTGT	CTGGTATAACATCTGTCCT TGCTG	c03	GA	16	0.489
DPL 62	AGTAATGGAACCTCAGACCC AATGT	CTACAACCCCTGAAGCAAA TTACC	c21	CT	19	0.545
DPL 68	GTTCAACAGGTCTGTACCA GTTCC	GCAAATGATCTCTGCCCTG TAA	c24	AG	27	0.155
DPL 71	GCAAACACCATCCTACCAC AA	GGTTCATGATCAAGGCTT GGTTT	c19	AG	32	0.489
DPL 75	GAGGTCATTTAGTCCAAC TCTTT	AGAGACCGGAAGAATTTT GAGTAT	c25	CT	20	0.155
DPL 136	TGCTCGTATCATAAGAACC CTAGC	AGATTCAATGGAGTTGCCT TAGAG	c07	AGA	2	0.340
DPL 140	TATAGTTAGAAGCCAATGC CAAGG	GAGAACCACCTTTCTTCAG CATC	c19	GA	17	0.155
DPL 146	ATATGTTGGAAGTTGGAAC TGCTG	AGAATTTGCCAAAGGTACA GAGAG	c24	GA	16	0.155
DPL 156	GGATTGTTTAGCATTAGGG ACAAG	AACTCTGTTCTTAAAGGTG CAAGC	c05	AG	14	0.405
DPL 212	TGATAATGCTGATGTCATA GACGC	AGAACTGGATGAAGAAAC TGATGAC	c19	TCA	8	0.405
DPL 220	GTTGGCCTAAGCCTATAAT GATGA	AACAAGGTTTATAAATTCT GGTGG	c08	CAT	12	0.571
DPL 253	TCATATCTCAAGACCACC TTCAA	AGTTCAAAGGACTCACCTG ATGAT	c11	ATC	6 2	0.155
DPL 273	ACCATTTCTTCCATAGACT TGCTG	AGATGAATATGGAGGTGAT CCTGT	c04	CAT	7	0.166
DPL 307	CCTCTCTTAATTAATGCTCC TCCA	AAGACAACAGAAGTTGTTA TCGGC	c23	GAT	7	0.155
DPL 322	AAACCTCGTAGTCATAGGC TCAA	AACTATGCACACAGATTTG GTACG	c15	TCA	11	0.373
DPL 348	AGAATGGTTGAAGTGATGG GTTAG	CCCATTCTGTCTTTTCATCA AT	c18	GCT	8	0.155
DPL 395	GTAACATCTTCAATCTTG CTCCC	TACCTGTGTTAGACCCTGA GATGA	c09	TTA	13	0.295
DPL 431	CTATCACCTTCTCTAGTTG CGTT	ATCGGGCTCACAAACATCA	c10	ATT	10	0.571
DPL 443	ACGATGACGTC AAGGATG GTAT	CGGATCCTCCTTTCCTCC	c12	ATA	9	0.420
DPL 486	CTTGATGCCTCTACTTATG CAACA	AATGGTGATAAGACCAGA AGGTGT	c20	ATT	13	0.155
DPL 490	AGTATCGTCACTTGTCAAA GTCCA	CTCATGCATGCTTATCACA CATC	c01	ATG	9	0.420
DPL 646	GGATTCTTGATCATAAAG GTCAG	GAAAGAAGAAAGTCCACC ATGAAC	c08	CTT	10	0.155
DPL 752	CACATCACCTAATTACCAT TGAAGC	TATCGTGAATATGTATGTG CGTGG	c01	AC	26	0.564
DPL 800	CTCCCTCTCCCTCTTACTCA AACT	CATTCTAATTATCAGTTGG CCCTG	c16	TC	14	0.155
DPL 866	AGAGTCAACTTCGACGCCA A	CTTGCTCACTTCGATATGC T	c12	TC	30	0.155
DPL 890	ACAGCATTAGCAGGCACCT T	TATGAACGATGTGCTAGCC G	c26	AG	25	0.155
DPL 901	GATGTGGTTAGGTGAGAAA GCA	CTTTCCAGCTGCAGGACT	c03	ATA	20	0.155
Ortalama						0.306

akımda 180 dakika yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanmış ve ultraviyole (UV) lamba altında görüntülenmiştir. Jelden elde edilen verilere göre moleküler markörlerin polimorfizm bilgisini veren Polimorfik Bilgi İçeriği (PIC) değerleri Eşitlik 1 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$PIC = 1 - \sum P_i^2 \quad (1)$$

Formülde yer alan  $P_i$ , allel frekansını ifade etmektedir (Anderson ve ark., 1993). Elde edilen bantlar Sayısal Taksonomi ve Değişkenli Analiz Sistemi (NTSyS, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) programına uygun olarak skorlanmış ve Aritmetik Ortalama Kullanılarak Ağırlıksız Çift Grup Metodu (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) metoduna göre sınıflandırılmıştır.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Bitkilerde kuraklık stresinin çimlenme üzerine etkileri, yapay ortamda kısıntılı sulama tekniği ile incelendiğinde; bitkilerin çimlenmelerinde 10. günden sonra bir değişim olmadığı gözlenmiş ve bu nedenle 14. günde veriler kaydedilmiştir. Kuraklığa karşı toleranslı ve hassas olarak bilinen kontrol çeşitleri kullanılarak 11 farklı pamuk çeşidi çimlenme süresi bakımından incelenmiş ve çimlenme sürelerinin 5 ila 9 gün arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tam ve % 75 kısıntılı sulama koşullarında çeşitlere bağlı olarak 5 veya 6 günde çimlenme gözlenirken, % 25 ve % 50 kısıntılı sulama koşullarında bu sürenin 8 veya 9 güne çıktığı tespit edilmiştir (Tablo 2). Tohumlarda dormansiyi kırmaya yönelik yapılan ön işlemin çimlenme süresi bakımından çeşitler arasında oluşabilecek farklılığı engellediği düşünülmektedir.

Farklı sulama stratejileri altında çimlenen bitki sayısı incelendiğinde; 14. günde toplam çimlenen bitkiler sayılarak yüzde oran şeklinde hesaplanmış olup, tam sulama ile % 75 kısıntılı sulamada oranların birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu iki sulama koşulunda tohumların tamamı ya da % 80'inin çimlendiği tespit edilmiştir. % 50 ve % 25 sulama koşullarında ise bu durum değişiklik göstermiş olup, çimlenme oranı % 53'lere kadar düşmüştür. Kuraklık stresine karşı toleranslı olduğu bilinen Tamcot Sphinx pamuk çeşidi, çimlenen bitki sayısı bakımından streten en az etkilenen çeşitler arasında yer almakta olup; Tamcot 94, Tamcot Camd-Es, BA525 ve Tamcot 22'nin de Tamcot Sphinx çeşidine benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Duyarlı olarak bilinen ST506 çeşidinin % 50 ve % 25 sulama koşullarında çimlenen bitki sayısında azalma gözlenmiştir (Tablo 2). Bazı çeşitlerde % 75 kısıntılı sulama koşulunda çimlenme oranının, tam sulama koşulundan daha yüksek olmasının nedeninin, tohumun çimlenme kapasitesinden kaynaklandığı ve tohum kalitesinin bu durumu etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca, tam sulama şartlarında toprak-su-hava dengesinin bozulmuş olabileceği ihtimali ile de tohum çimlenmesinde sıkıntıların olabileceği düşünülmektedir.

Tarımsal özellikleri bakımından seçilen bu 11 pamuk çeşidinden 3 adedi (BA119, BA525, Flash) yerli çeşitler olup, diğerleri yabancı çeşitlerdir. Her bir çeşidin özelliği farklı olduğundan, kuraklığa karşı toleranslı yeni yerli çeşitlerin geliştirilmesi amacı ile uygun anaç seçimi hedeflenmiştir.

Yapılan kuraklık stresi çalışmalarında, çeşitler tolerans durumlarına göre kendi içlerinde sınıflandırılmıştır. Fakat bu veri sadece kuraklık

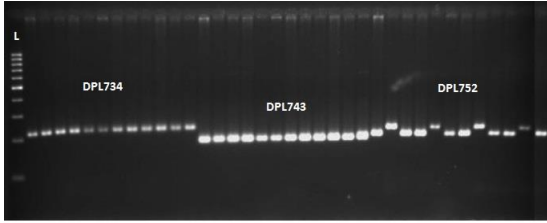
**Tablo 2.** Saksı denemeleri sonucu kısıntılı sulama uygulanan 11 farklı pamuk çeşidinin çimlenme analiz sonuçları

Pamuk çeşitleri	Çimlenme oranı (%)*				Çimlenme süresi (Gün)*			
	Kısıntılı sulama oranları				Kısıntılı sulama oranları			
	% 25	% 50	% 75	% 100	% 25	% 50	% 75	% 100
Tamcot Sphinx	80.0	80.0	96.6	100.0	8	8	5	5
Tamcot 94	83.3	96.6	100.0	100.0	8	8.3	5	5.3
Tamcot Camd-ES	80.0	83.3	96.6	100.0	8.3	8	5.6	6
BA525	70.0	76.6	96.6	100.0	8.3	8	6	5.6
ST468	63.3	80.0	80.0	100.0	9	8.6	6	5.3
Tamcot SP21	70.0	76.6	100.0	96.6	8	7.6	5	5.3
Tamcot 22	76.6	76.6	90.0	90.0	8	8	5	5.6
Tamcot SP23	73.3	76.6	100.0	100.0	8	7.3	5	6
Flash	66.6	66.6	90.0	93.3	9	8.6	6.3	6
BA119	63.3	66.6	93.3	100.0	9	8.3	6	6
ST506	53.3	70.0	93.3	96.6	9.3	9	6.3	6.6

\*: Değerler, 3 tekrerrün aritmetik ortalaması alınarak hesaplanmıştır.



stresine karşı çimlenme tepkileri hakkında bilgi içermektedir. Uygun anaç seçiminde önemli parametrelerden biri, birbirinden genetik olarak uzak genotiplerin seçimidir ve bu şekilde genetik çeşitlilik artabilmektedir. Bu çalışmada da, bu amaçla en etkili genotipleme yöntemlerinden biri olan mikrosatellit markörler kullanılmış ve çeşitler genetik olarak sınıflandırılmıştır. Pamuk genomu için tanımlanmış 28 adet moleküler markör PCR aracılığı (Şekil 1) ile tarandığında 123 lokus skorlanmıştır. Tekrar sayısı 2 ila 32 arasında olan markörlerin PIC değerleri 0.155 ile 0.571 arasında bulunmuş olup, ortalama olarak 0.306'dır. Kullanılan markörler arasında DPL431, DPL220 ve DPL752'nin 0.571 ve 0.564 PIC değerleri ile en polimorfik markörler olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).



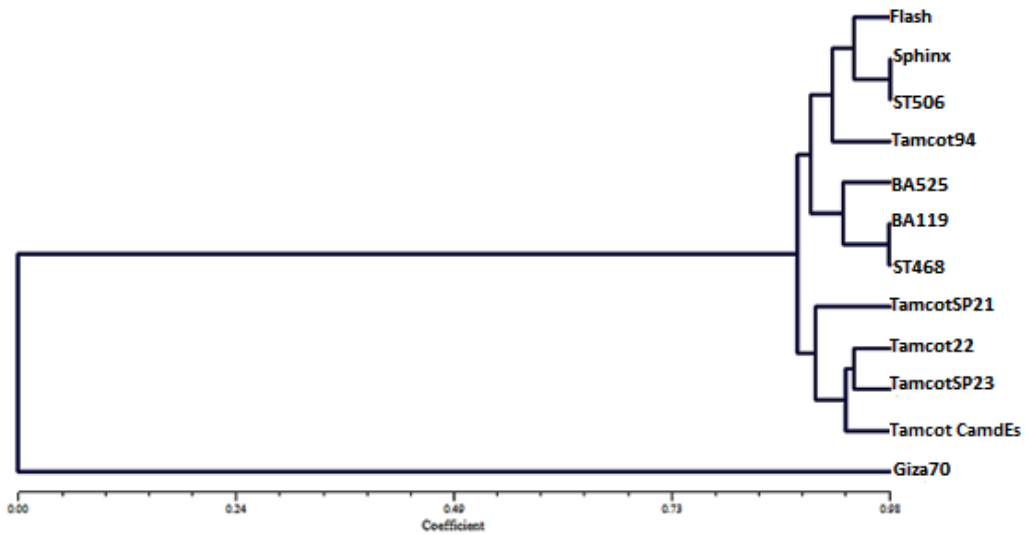
**Şekil 1.** Pamuk çeşitlerinin mikrosatellit markörleri (DPL734, DPL743, DPL752) kullanılarak yapılan PCR analizi sonucu metafor-agaroz jel görüntüsü

Çeşitler sırası ile Flash, BA525, BA119, ST506, Tamcot Sp21, Tamcot 22, Tamcot 94, Tamcot Camd-Es, Tamcot Sp23, Sphinx, St468, Giza 70 (*Gossypium barbadense L.* - kontrol olarak kullanılmıştır)

UPGMA analizi, iki ana küme ile bir kümeye ait iki alt küme ile sonuçlanmıştır. Birinci küme, sadece Giza 70'i içermektedir. Giza 70 kontrol amaçlı kullanılmış olup, kullanılan çeşitler

arasında farklı bir türe aittir (*G. barbadense L.*) ve beklenildiği gibi genetik olarak en farklı genotip olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Diğer küme ise 11 çeşidi içermektedir. Bu küme içerisinde, Tamcot Sp21, Tamcot 22, Tamcot Sp23 ve Tamcot Camd-Es aynı grup içerisinde alt kümede toplanmış iken; geriye kalan Flash, Tamcot Sphinx, ST506, Tamcot 94, BA525, BA119, ST468 ise diğer alt kümede sınıflanmışlardır (Şekil 2). Dendrograma bakılarak, genetik olarak birbirinde uzak çeşitler, istenilen diğer özellikleri bakımından seçilerek kuraklığa karşı toleranslı yeni yerli çeşitlerin geliştirilmesi sağlanabilecektir.

Tüm dünyada ve ülkemizde kuraklık hızla artan bir problem olduğundan dolayı kuraklık stresine karşı toleranslı/dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek üzere çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada 13 farklı pamuk çeşidi kullanılmış ve bu pamuk çeşitlerinin kuraklığa karşı gösterdikleri tolerans seviyeleri incelenmiştir. PEG-6000 ile oluşturulan kuraklık stresi sonucunda tohumların gelişmelerinin farklı aşamalarında kuraklık stresine karşı gösterdikleri tolerans seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda kuraklığa karşı tolerans kapasitesinin çimlenmenin erken safhasında düşmeye başladığı, tomurcuklanma safhasında en düşük seviyede olduğu ve gerçek yaprakların oluşma safhasında kuraklık toleransının giderek arttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2007). Pace ve ark. (1999), Tamcot HQ95 ve ST506 çeşitlerini kullanarak kuraklık stresinin bitkinin fizyoloji, morfoloji ve gelişimsel safhalarını nasıl etkilediğini araştırmış ve bu araştırmanın sonucunda "ST506"nın kuraklık stresine karşı hassas bir çeşit olduğunu



**Şekil 2.** Pamuk çeşitlerinin 28 adet mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan UPGMA analizi sonucu. Giza70 (*Gossypium barbadense L.*) kontrol olarak kullanılmıştır

bildirmişlerdir. Çalışmamızda kontrol olarak kullandığımız ST506 çeşidine ait elde edilen verileri, bu çalışma sonucunu desteklemektedir. Ayrıca, Karademir ve ark. (2011) tarafından rapor edilen bir başka çalışmada; çalışmamızda kullanmış olduğumuz BA119 ve ST468 çeşitlerinin arazi koşullarında iki yıllık deneme ile su stresi altında verim ve lif kalite parametreleri incelenmiş olup, ST468 çeşidinin stres koşullarında dahi yüksek verim verdiği ve BA119 çeşidinin ise lif kalitesinin yüksek olduğu bildirilmiş, bu veriler kısmi olarak çalışmamızı desteklemektedir.

#### 4. Sonuçlar

Değişen iklim koşullarına bağlı olarak, bitki verim ve kalitesini olumsuz olarak etkileyen en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olan kuraklık stresi altında, tarımsal özellikleri bakımından seçilmiş olan 11 farklı pamuk çeşidinin, kısıntılı sulama stratejileri altında çimlenme süresi ve çimlenme oranlarının incelendiği bu çalışmada, Tamcot Sphinx, Tamcot 94, Tamcot CamdEs ve BA525 çeşitlerinin testlenen çeşitler arasında diğerlerine oranla çimlenme süresinde kuraklığa karşı daha tolerant oldukları tespit edilmiştir. Yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda ise çeşitler genetik benzerliklerine göre sınıflandırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin, pamuk ıslahçılarına kuraklığa karşı tolerans/dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli bir bilgi sağlayacağı düşünülmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma; Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu / Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı (TÜBİTAK / TEYDEB, Proje No: 7090874) ve Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV, Proje No: 920/D61) tarafından desteklenmiş olup, ProGen Tohum A.Ş. Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### Kaynaklar

- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36(1): 181-186.
- Başal, H., Ünay, A., 2006. Water stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(3): 101-111.
- Başal, H., Dağdelen, N., Ünay, A., Yılmaz, E., 2009. Effects of deficit drip irrigation ratios on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) yield and fibre quality. *Journal of Agronomy and Crop Sciences*, 195(1): 19-29.

- Beasley, J.O., 1942. Meiotic chromosome behaviour in species, species hybrids, haploids and induced polyploids of *Gossypium*. *Genetics*, 27(1): 25-54.
- Blackman, S.A., Obendorf, R.L., Leopold, A.C., 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology*, 100(1): 225-230.
- Blum, A., 1986. Breeding crop varieties for stress environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2(1): 199-237.
- Chen, Z.J., Scheffler, B.E., Dennis, E., Triplett, B.A., Zhang, T.Z., Guo, W.Z., Chen, X.Y., Stelly, D.M., Rabinowicz, P.D., Town, C.D., 2007. Toward sequencing cotton (*Gossypium*) genomes. *Plant Physiology*, 145(4): 1303-1310.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11-15.
- El-Zik, K.M., Thaxton, P.M., 1996. Registration of cultivars. *Crop Science*, 36: F1074.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3): 163-185.
- Karademir, Ç., Karademir, E., Ekinçi, R., Bereketoğlu, K., 2011. Yield and fiber quality properties of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under water stress and non-stress conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10(59): 12575-12583.
- Krieg, D.R., 1997. Genetic and environmental factors affecting productivity of cotton. In: Proceedings Beltwide Cotton Production Research Conference, 7-10 January, New Orleans, LA, pp. 1347.
- Macar, T.K., Turan, Ö., Ekmekçi, Y., 2009. Effects of water deficit induced by PEG and NaCl on chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars and lines at early seedling stages. *Gazi University Journal of Science*, 22(1): 5-14.
- Michel, B.E., Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5): 914-916.
- Mondini, L., Noorani, A., Pagnotta, M.A., 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1): 19-35.
- Pace, P.F., Cralle, H.T., Halawany, S.H.M., Cothren, J.T., Senseman, S.A., 1999. Drought-induced changes in shoot and root growth of young cotton plants. *The Journal of Cotton Science*, 3(1): 183-187.
- Percival, A.E., Wendel, J.F., Stenart, J.M., 1999. Taxonomy and germplasm resources. In: Smith CW, Cothren JT (Eds) *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*. Wiley, New York, pp. 33-63.
- Sarafis, V., 1998. Chloroplasts: A structural approach. *Journal of Plant Physiology*, 152(2): 248-264.
- Tuba, Z., Lichtenthaler, H.K., Csintalan, Z., Pocs, T., 1993. Regreening of desiccated leaves of the *poikilochlorophyllous xerophyta scabrida* upon

- rehydration. *Journal of Plant Physiology*, 142(1): 103-108.
- Turhan, A., Kuşçu, H., Özmen, N., Demir, A.O., 2014. Farklı tuzluluk düzeylerinin sarımsakta (*Allium sativum* L.) verim ve bazı kalite özelliklerine etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(3): 208-287.
- Wendel, J.F., Brubaker, C.L., Percival, A.E., 1992. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of Upland cotton. *American Journal of Botany*, 79(11): 1291-1310.
- Woodstock, L.W., 1998. Seed imbibition: A critical period for successful germination. *Journal of Seed Technology*, 12(4): 1-15.
- Verdonck, O., Gabriels, R., 1992. Reference method for the determination of physical and chemical properties of plant substrates. *Acta Horticulturae*, 302(1): 169-179.
- Zhang, X.Y., Liu, C.L., Wang, J.J., Li, F.G., Ye, W.W., 2007. Drought-tolerance evaluation of cotton with PEG water-stress method. *Cotton Science*, 19(3): 205-209.