



## CAPS-SSR MARKIRLARI KULLANILARAK PAMUK KROMOZOM SUBSTİTÜSYON HATLARININ BELİRLENMESİ

Adnan AYDIN<sup>1\*</sup>, Mehmet KARACA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Iğdır University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, 76000, Iğdır, Türkiye

<sup>2</sup>Akdeniz University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, 07000, Antalya, Türkiye

**Özet:** Pamuk (*Gossypium L.*) dünya genelinde tekstil endüstrisi için en önemli doğal lif kaynağı ve aynı zamanda önemli bir yağ bitkisidir. Pamuk lifleri tekstil için ana kaynak olmakla birlikte lifi, tohumu ve bitkisi ev izolasyon materyali olarak enerji tasarrufunda, proteince zengin hayvan yemi, yağı gıda olarak insan beslenmesinde, bitkisi ise altlık ve biyomateryal olarak ta değişik kullanım alanlarına sahiptir. Pamukta ıslah çalışmaları genellikle verim ve lif kaliteleri yönünden seçkin genotipler arasında yapılan melezlemeler ve daha önce geliştirilmiş çeşitlerden seleksiyon çalışmalarına dayanmaktadır. Ancak pamuk ıslah programları, kültür çeşitlerinde dar olan genetik çeşitlilikten olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu durum araştırmacıları türler-arası melezleme ile introgresyona teşvik etmiştir. Türler-arası melezlemelerde kompleks antagonistik ilişkiler, farklı ploidi seviyelerinden dolayı sitogenetik farklılıklarla translokasyonlar ve inversiyonlar, kromozom yapısal farklılıkları, linkaj etkisi ile arzu edilmeyen tarımsal özelliklerin varlığı, rekombinasyonun azlığı, erken generasyonlarda introgresyonun kaybolması, kısırılık, Muller-Dobzhansky kompleksi nedeni ile ölümcül epistatik interaksiyonlar ve Mendel açılımının oluşmaması gibi nedenlerden dolayı sorunlar yaşanmaktadır. Kromozom substitüsyon hatlarının kullanılması ile yukarıda sözü edilen türler-arası melezlemelerdeki olumsuzluklar ortadan kaldırılabilmektedir. Bu çalışmada 17 kromozom substitüsyon hattının tanımlanması için genik CAPS-SSR markırları kullanılmıştır. Toplamda 11 CAPS-SSR markırı ve 16 restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Bu bağlamda 11 monomorfik olan SSR markırı CAPS-SSR yöntemi ile 9 polimorfik markır olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak CAPS-SSR markır yöntemi kullanılarak kromozom substitüsyon hatlarının kromozom lokasyonlarının tespit edilebileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** EST-SSR, -CAPS-SSR, CS-B, Pamuk


### Determination of Cotton (*Gossypium L.*) Chromosome Substitution Lines Using CAPS-SSR Markers


**Abstract:** Cotton (*Gossypium L.*) is the most important natural fiber source for the textile industry worldwide and is also an important oil plant. Although cotton fibers are the main source for textiles, its fibers, seeds and plants are used in energy saving as home insulation materials, protein-rich animal feed, oil in human nutrition as food, and its plants as litter and biomaterial. Breeding studies in cotton are generally based on cross-breeding between distinguished genotypes in terms of yield and fiber quality and selection studies from previously developed varieties. However, cotton breeding programs are negatively affected by the narrow genetic diversity in cultivars. This situation has encouraged researchers to investigate introgression through interspecies hybridization. Complex antagonistic relationships in interspecies hybridizations, translocations, and inversions with cytogenetic differences due to different ploidy levels, chromosome structural differences, the presence of undesirable agricultural traits due to the linkage effect, lack of recombination, loss of introgression in early generations, sterility, lethal epistatic interactions due to the Muller-Dobzhansky complex and problems occur due to reasons such as Mendel expansion not occurring. By using chromosome substitution lines, the negativities in interspecies hybridizations mentioned above can be eliminated. In this study, genic CAPS-SSR markers were used to identify 17 chromosome substitution lines. A total of 11 CAPS-SSR markers and 16 restriction enzymes were used. In this context, 11 monomorphic SSR markers were converted to 9 polymorphic markers by the CAPS-SSR method. As a result, it was concluded that the chromosome locations of chromosome substitution lines can be determined by using the CAPS-SSR marker method.

**Keywords:** EST-SSR, -CAPS-SSR, CS-B, Cotton

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Iğdır University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, 76000, Iğdır, Türkiye

E mail: adnan.aydin@igdir.edu.tr (A. AYDIN)

Adnan AYDIN  <https://orcid.org/0000-0002-8284-3751>

Mehmet KARACA  <https://orcid.org/0000-0003-3219-9109>

**Gönderi:** 06 Şubat 2024

**Kabul:** 21 Şubat 2024

**Yayınlanma:** 15 Mart 2024

**Received:** February 06, 2024

**Accepted:** February 21, 2024

**Published:** March 15, 2024

**Cite as:** Aydın A, Karaca M. 2024. Determination of cotton (*Gossypium L.*) chromosome substitution lines using CAPS-SSR markers. BSJ Eng Sci, 7(2): 307-315.

### 1. Giriş

Tekstil sektörünün en önemli doğal hammaddesi olan pamuk (*Gossypium L.*), ticari olarak üretimi dünyanın sıcak enlemlerindeki alanlarda yoğunlaşmıştır. Pamuk üretimi, Kuzey yarımkürede 45°, Güney yarımkürede ise 32° enlemlerine kadar uzanmaktadır (Mert, 2007).

Ülkemizde bu enlem dereceleri arasında olduğundan pamuk üretimi yapan ülkeler arasında önemli bir yeri bulunmaktadır. Pamuk yaygın ve zorunlu kullanım alanıyla insanlık açısından, yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler ve üretici aileler açısından büyük ekonomik öneme sahip bir üründür.



Pamuk işlenmesi açısından çırçır sanayisinin, lifi ile tekstil sanayisinin, tohumu ile yağ ve yem sanayisinin, linteri (hav) ile de kâğıt sanayisinin hammaddesi durumundadır. Dünyadaki nüfus artışı ve yaşam standardının yükselmesiyle pamuk lifine olan ihtiyacı da artırmaktadır (Aydin, 2023). Bundan dolayı dünya da ve ülkemizde pamuk bitkisinin önemini daha da ortaya çıkarmaktadır.

Pamuk bitkisinin *Malvaceae* ailesine ait yaklaşık 52 türü bulunmakta ve sitogenetik olarak 9 farklı genoma sahiptir (Viot ve Wendel, 2023). 52 tür içinde tetraploid ve diploid genom yapısına sahip türler bulunmaktadır. Dünya genelinde en çok kültürü yapılan pamuk türü de tetraploid kromozom ( $n=26$ ) yapısına sahip olup bunlar yeni dünya pamukları olarak bilinen *Gossypium hirsutum* ve *Gossypium barbadense*'dir (Witt ve ark., 2020). Eski dünya pamukları olarak *Gossypium arberoum* ve *Gossypium herbaceum* diploid kromozom ( $n=13$ ) yapısına sahiptirler. Diploid kromozom yapısına sahip eski dünya pamuklarının üretimi çok az düzeydedir. Dünyada ve ülkemizde en çok üretimi yapılan pamuk türü *G. hirsutum* türüne ait pamuk çeşitleridir. Bu türün çeşitleri *G. barbadense* türünün çeşitlerine göre daha verimli ve adaptasyon yetenekleri daha yüksektir. Fakat lif kalitesi (ince, uzun, sağlam) olarak ele alındığında *G. barbadense* türünün çeşitleri daha üstün gelmektedir. Bu tür verim düşüklüğü ve dar adaptasyon yeteneğine sahip olmasından dolayı ekim alanları sınırlıdır. Araştırmacılar *G. barbadense* çeşitleri ile *G. hirsutum* çeşitlerinin melezlenmesi ile hem yüksek verim hem de yüksek lif kalitesine sahip çeşitler geliştirmeyi amaçlamışlardır. *G. barbadense* türünde bulunan üstün lif özelliklerin aktarılmasına yönelik yapılan melezleme çalışmalarında istenmeyen geççilik, düşük verimlilik, küçük koza vb. özelliklerde aktarılmıştır. Bu sorunun çözümü içinde bütün bir genomun aktarılması yerine *G. barbadense*'nin bütün bir kromozom ve kromozom parçalarının *G. hirsutum* çeşitlerine aktarmaya yönelmişlerdir (Stelly ve ark., 2005). Buna yönelik yapılan ıslah çalışmaları ile *G. hirsutum* (Texas Marker-1)'e izogenik bir hata *G. barbadense* (Pima 3-79)'un kromozom çifti ya da kromozom çiftinin kolunu taşıyan disomik kromozom ikame (substitüsyon) hatları (CS-B) geliştirilmiştir (Liu ve ark., 2000).

Fenotip destekli markırlar, çevre şartlarından etkilenmediği, uzmanlık gerektirdiği ve yetersiz kaldıkları için araştırmacılar teşhislerin daha güvenilir yapılması için moleküler tabanlı markırlara yönelmişlerdir (Song ve ark., 2023). DNA moleküler markırları genom düzeyinde farklılıkları ortaya koyan ve DNA dizisinde özel bölge olarak tanımlanmaktadır (Lateef, 2015). DNA markırları direk gen üzerinde ise genik, doğrudan gen üzerinde değilse genomik markır olarak isimlendirilmektedirler. DNA moleküler markırlar organizmalarda kullanılan dokunun gelişim süresine bağlı olmadan her dokuda belirlenebildiği, değişim göstermediği, çevre şartlarından etkilenmediği, gen interaksiyonlarından (pleotropi, epistasi vb)

etkilenmediğinden kullanım alanları çok geniştir. Bundan dolayı moleküler markırlar fenotip tabanlı markırlardan daha avantajlı konumdadırlar (Arif ve ark., 2010; Lateef, 2015; Younis ve ark., 2020; Shah ve ark., 2023).

Kullanılan DNA markırları arasında en çok tercih edilen ise SSR olarak bilinen mikrosatellitlerdir. SSR markırlarının çok kullanılmasının nedenleri yüksek polimorfizme sahip olması, ko-dominant özellik göstermesi, tekrar edilebilir olması, uygulanmasının kolay ve ucuz olmasından kaynaklanmaktadır (Peng ve ark., 2021). Bu markır tekniğinin tek dezavantajı kullanılacak türün genom bilgisinin olması gerekmektedir. Günümüzde *in-silico* yöntemler ve veri tabanlarının kullanımının avantajları sayesinde geliştirilen primer çiftleri bir cinsin türleri arasında ve hatta yakın cinsler arasında aynı primerlerin çalıştığı rapor edilmektedir (Karaca ve ark., 2013, Preethi ve ark., 2020). *In-silico* yöntemlerle geliştirilen mikrosatellit markırlarının dezavantajı düşük polimorfizm göstermeleridir. SSR'ların *in-silico* veri tabanlarından geliştirilenlerde ve monomorfik markırların polimorfik markırlara dönüştürülmesinde kullanılan teknikse Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)-mikrosatellit yöntemidir. CAPS-mikrosatellit tekniğinde Expressed sequence tag (EST) tabanlı mikrosatellitlerde post-transkripsiyon olaylarından kaynaklanan çok büyük ve monomorfik mikrosatellit lokuslarının farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak ortaya çıkan polimorfizme dayanan bir tekniktir. Bu teknik genelde ko-dominant markır üretmektedir. Ayrıca bu yöntem agaroz jel elektroforez ayırıştırma tekniğine uygun olması kullanımını da kolaylaştırır (İnce ve ark., 2009, İnce, 2010). Bu çalışmada monomorfik olarak bilinen 11 EST-SSR markırı 16 farklı restriksiyon enzimi ile kesilerek polimorfik özelliklerinin ortaya konması ve Pamuk kromozom substitüsyon hatlarının belirlenmesinde kullanılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada Prof. Dr. Sukumar Saha (USDA/MSU, USA) tarafından tedarik edilen ve Stelly ve ark. (2005) tarafından geliştirilmiş olan 17 adet kromozom substitüsyon (CS-B) hattı kullanılmıştır. Bu genetik stoklar *G. barbadense* Pima 3-79'a (double haploid) ait 17 kromozom ya da kromozom kolu, TM-1'e (*G. hirsutum* L. Texas Marker-1) izogenik hat olan bir hatta aktarılmasıyla elde edilmiştir (Stelly ve ark., 2005). Her bir CS-B hattı *G. barbadense* Pima 3-79'dan bir çift kromozom, kromozom kısa kolu (Sh) veya kromozom uzun kolu (Lo) taşımaktadır. 17 CS-B, 1 TM-1 ve 1 Pima 3-79 olmak üzere toplamda 19 genotip üzerinde çalışılmıştır. Bitki materyaline ait örnekler Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme Alanlarında yetiştirilerek yaprak örnekleri toplanmıştır.

### 2.2. DNA İzolasyonu

Bitkiler beşinci gerçek yapraklarını çıkardıktan sonra her bir bitki için steril şartlarda yaprak örnekleri toplanarak

DNA izolasyon işlemleri Karaca ve ark. (2005)'e göre gerçekleştirilmiştir.

### 2.3. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

DNA kalite ve miktarının belirlenmesinde spektrofotometrik yaklaşım ile agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Spektrofotometre ile ölçümde DNA örnekleri 25 kat seyreltilerek 200-300 nm arası tarama gerçekleştirilerek A<sub>230</sub>, A<sub>260</sub> ve A<sub>280</sub> absorpsiyon değerleri ölçülmüştür.

### 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmada kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji grade olup Vivantis firmasından temin edilmiştir. PZR işlemlerinde GeneAmp System 9700 marka Termal Döngü Cihazından yararlanılmıştır. PZR işlemlerinde hacim 25 µL'ye ayarlanmış ve içerisinde 85 nanogram toplam genomik DNA, 0,5 µM kullanılan primer çifti, 10X buffer, 0,28 mM her bir dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1 ünite Taq DNA polimeraz (Vivantis) içeren solüsyonda gerçekleştirilmiştir. CAPS-SSR çalışmaları için Touch-Down PZR metodu uygulanmış ve ilk 10 döngü için her

döngüde 0,5 °C sıcaklık düşürülmüştür.

Ön denatürasyon için 4 dakika 94 °C, denatürasyon için 94 °C'de 20 saniye, primer bağlanma sıcaklığı 61 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve son olarak 72 °C'de 10 dakika olarak toplamda 40 döngüde gerçekleştirilmiştir.

### 2.5. CAPS-Mikrosatellit Analizleri

CAPS-mikrosatellit DNA markır tekniği polimorfizmin ortaya çıkarması yönünden RFLP ve SNP tekniklerinin her ikisinden de faydalanmaktadır. CAPS-mikrosatellit tekniği genik markırların elde edilmesinde kullanılabilirliği gibi genomik markırlarında elde edilmesinde kullanılabilir. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzim isimleri, tanıma bölgeleri ve çalışma sıcaklıkları Tablo 1'de verilmiştir.

### 2.6. Primer Çiftleri

PZR çalışmalarında kullanılan primerin sekans ve motif bilgileri Tablo 2'de verilmiştir. Karaca ve Ince (2011) tarafından geliştirilen MK primerleri genomun ifade edilebilen kısmından geliştirilmiş markırlardır.

**Tablo 1.** Kullanılan restriksiyon enzimleri

No	Eim adı	Tanıma Bölgesi	Çalışma sıcaklığı	Ticari Kaynağı
1	<i>Hinf</i> I	5'...G <sup>▼</sup> ANTC...3' 3'...CTNA <sup>▲</sup> G...5'	37 °C	Bioron
2	<i>Cla</i> I	5'...AT <sup>▼</sup> CGAT...3' 3'...TAGC <sup>▲</sup> TA...5'	37 °C	Fermentas
3	<i>Rsa</i> I	5'...GT <sup>▼</sup> AC...3' 3'...CA <sup>▲</sup> TG...5'	37 °C	Fermentas
4	<i>EcoR</i> V	5'...GAT <sup>▼</sup> ATC...3' 3'...CTA <sup>▲</sup> TA G...5'	37 °C	Fermentas
5	<i>Hae</i> III	5'...GG <sup>▼</sup> CC...3' 3'...CC <sup>▲</sup> GG...5'	37 °C	Fermentas
6	<i>Hind</i> III	5'...A <sup>▼</sup> AGCTT...3' 3'...TTCGA <sup>▲</sup> A...5'	37 °C	Fermentas
7	<i>EcoR</i> I	5'... <sup>▼</sup> CCWGG...3' 3'...GGWCC <sup>▲</sup> ...5'	37 °C	Fermentas
8	<i>Aat</i> II	5'...GACGT <sup>▼</sup> C...3' 3'...C <sup>▲</sup> TGCAG...5'	37 °C	Fermentas
9	<i>Vsp</i> I	5'...AT <sup>▼</sup> TAAT...3' 3'...TAAT <sup>▲</sup> TA...5'	37 °C	Fermentas
10	<i>Hpa</i> II	5'...C <sup>▼</sup> CGG...3' 3'...GGC <sup>▲</sup> C...5'	37 °C	Fermentas
11	<i>BamH</i> I	5'...G <sup>▼</sup> GATCC...3' 3'...CCTAG <sup>▲</sup> G...5'	37 °C	Fermentas
12	<i>Hin6</i> I	5'...G <sup>▼</sup> CGC...3' 3'...CGC <sup>▲</sup> G...5'	37 °C	Fermentas
13	<i>Taq</i> I	5'...T <sup>▼</sup> CGA...3' 3'...AGC <sup>▲</sup> T...5'	65 °C	Fermentas
14	<i>Dra</i> I	5'...TTT <sup>▼</sup> AAA...3' 3'...AAA <sup>▲</sup> TTT...5'	37 °C	Fermentas
15	<i>Not</i> I	5'...GC <sup>▼</sup> GGCCGC...3' 3'...CGCCGG <sup>▲</sup> CG...5'	37 °C	Fermentas
16	<i>Nco</i> I	5'...C <sup>▼</sup> CATGG...3' 3'...GGTAC <sup>▲</sup> C...5'	37 °C	Fermentas

**Tablo 2.** Kullanılan primer çiftlerine ait bilgiler

Markır	Primer Sekans Dizisi (5'→3')	MOTİF
MK011	F:CCTCCTCGTTTCTTCACTGC R:CTTGTTCCATTTACCCAAAG	[TCT] <sub>12</sub>
MK048	F:TTTGGGCTTTCTTTTCTCTCTC R:AGACTTTGTGTCCCGCTCA	[CT] <sub>17</sub>
MK070	F:GAGACGGTGGTGATGATGG R:CCTTGTCAAGTGTCCGAGTTG	[AAG] <sub>16</sub>
MK095	F:AAACTGCAAACCCACACTC R:GGAGAGGCTATTCAGGGAGA	[CTT] <sub>5</sub>
MK098	F:TCACAAGAGGCTTTCAATGCT R:TTACACCTCCAGGCATCAA	[ATTT] <sub>5</sub>
MK101	F:TCATCATCATCCTCGTCTTGA R:TTATGGCCCAATCCTCTCAC	[CAT] <sub>15</sub>
MK105	F:CAAAGATGCCGAAAGAGAGG R:GTAAGATCGGCGGGTCATC	[CCG] <sub>12</sub>
MK114	F:ATGGTCATTCCGATGCTGTT R:CCAATGGTCCCTACATGACC	[CTG] <sub>5</sub>
MK158	F:CTTCCAGTTCCACCATAGCC R:ACCAAATCCAGGTTCCACAG	[AC] <sub>14</sub>
MK159	F:TTTGGGCTTTCTTTTCTCTCTC R:AGACTTTGTGTCCCGCTCA	[CT] <sub>17</sub> [TCTCTT] <sub>4</sub>
MK173	F:GGGTCCACAGATACAGG R:GTCCAAAACCTGTCCATTAG	[TATG] <sub>9</sub>

### 2.7. CAPS-Mikrosatellit Markırlarının Belirlenmesi

CS-B'lerde kullanılan CAPS markırların belirlenmesinde 3 kriter üzerinde durulmuştur. Bu kriterler: 1) hem *G. hirsutum* hem de *G. barbadense* türünün çeşitlerinin DNA'larında amplikon üretmesi, 2) tekrar edilebilir markır ortaya koyması ve 3) agaroz jelde polimorfizmi net bir şekilde ortaya koymasıdır.

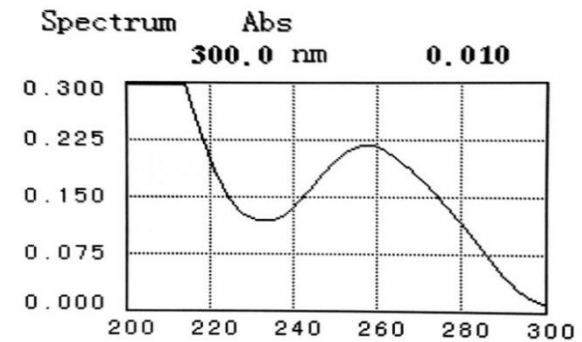
## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Toplam 19 bitkiye ait tohumlar tarla şartlarında ekilerek bitkilerden steril bir şekilde yaprak örnekleri toplanmıştır. Bitki yaprak örnekler toplanırken kaliteli DNA elde etmek amacıyla bitkinin strese girmediği sabah saatlerinde toplanmıştır. Çünkü bitki stres halinde yaprak örnekleri toplandığında polisakkarit ve fenolik bileşik miktarı fazlalaşır ve DNA izolasyonunu zorlaştırır (Karaca 2001, Aydın ve ark., 2018). Bitki yaprak dokuları -196 °C sıvı azot yardımı ile havan ve havaneli yardımıyla toz haline getirilerek DNA izolasyonu Karaca ve ark. (2005)'e göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'nın kalite ve miktarının belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemde 25 kat seyreltilmiş olan toplam DNA'nın analizinde 200 nm ile 300 nm dalga boylarında tarama yapılmış ve A<sub>230</sub>, A<sub>260</sub> ve A<sub>280</sub> değerleri tespit edilmiştir (Şekil 1).

Şekil 1'de spektrofotometre ile okunan değerler arasında restriksiyon enzim kullanımına uygun protein, polisakkarit ve fenolik bileşiklerden arındırılmış bir grafik çizmektedir. Saf DNA A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> değeri yaklaşık 1,80 değerini vermesi gerekmektedir (Aydın ve ark., 2018). Tablo 3'te genomik DNA'ların spektrofotometre

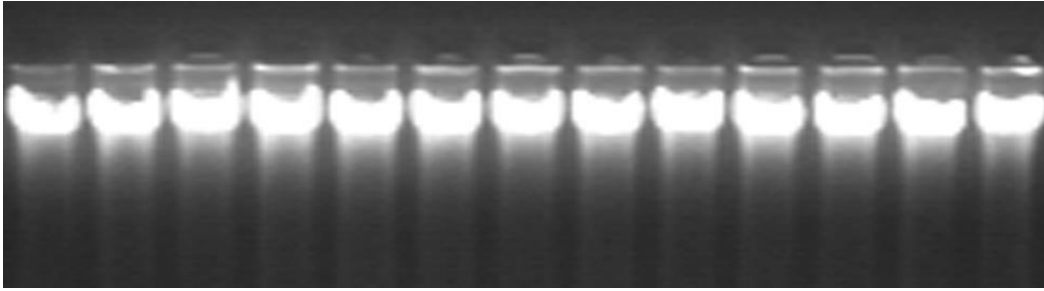
okumaları belirtilmiştir. Spektrofotometrik yöntemler ile DNA kalite ve miktarı belirlenmiş ve yapılan gözlemler sonucunda elde edilen DNA'ların hem protein hem de polisakkarit ve fenolik bileşiklerinden arındırıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen DNA miktarlarının da yeterli düzeyde olduğu saptanmıştır. Fakat spektrofotometrik yaklaşım ile elde edilen DNA'nın kırık olup olmadığı anlaşılamamaktadır (Karaca ve Ince, 2023). Bundan dolayı da agaroz jel elektroforez yöntemi ile bu tespit edilebilmektedir (İnce, 2010). Elde edilen DNA'ların kırık olup olmadığı anlaşılması için her bir örneğe ait 700 ng genomik DNA % 1'lik agaroz jelde 90 dk yürütülmüş ve elde edilen jel görüntüsünde DNA'nın kırık olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2).



**Şekil 1.** Spektrofotometre okuması ile genomik DNA'nın kalitesinin belirlenmesi

**Tablo 3.** İzolasyonu gerçekleştirilen genomik DNA spektrofotometre verileri ve genomik DNA miktarı

Materyal	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	µg/mL
TM-1	0,124	0,241	0,132	1,82	1,93	601,3
Pima 3-79	0,149	0,321	0,173	1,85	2,15	801,3
B01	0,158	0,328	0,176	1,84	1,97	731,7
B02	0,185	0,400	0,215	1,86	2,09	906,7
B04	0,168	0,364	0,195	1,85	1,97	837,5
B05 Sh	0,155	0,324	0,174	1,84	1,98	737,9
B06	0,140	0,285	0,152	1,87	1,96	601,3
B07	0,157	0,325	0,175	1,81	1,91	718,8
B11 Sh	0,145	0,300	0,161	1,86	2,01	638,3
B12 Sh	0,176	0,375	0,201	1,84	1,99	831,3
B14 Sh	0,129	0,265	0,142	1,87	2,02	550,8
B15 Sh	0,110	0,208	0,113	1,83	1,87	454,2
B16	0,123	0,241	0,128	1,87	1,89	500,8
B17	0,127	0,251	0,134	1,87	1,97	522,1
B18	0,147	0,292	0,160	1,83	1,99	625,4
B22 Sh	0,129	0,262	0,142	1,83	1,94	577,9
B22 Lo	0,135	0,270	0,145	1,85	1,93	605,0
B25	0,143	0,270	0,145	1,85	1,86	545,8
B26 Lo	0,130	0,263	0,140	1,88	2,02	657,5

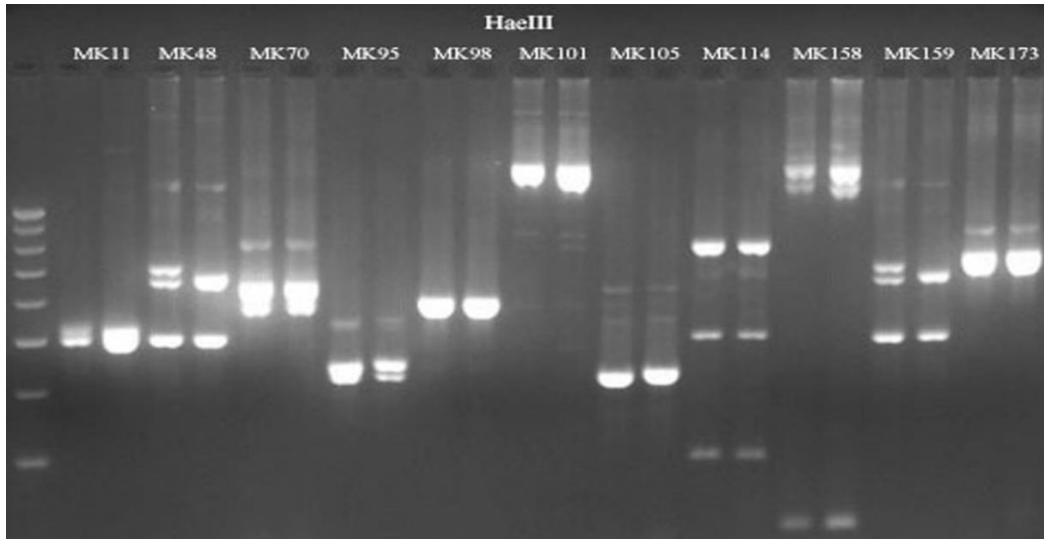


**Şekil 2.** Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmesi.

### 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon Uygulamaları

Çalışmada 11 primer çifti TM-1 ve Pima 3-79 hattının genomik DNA'larından 8,5 µL kullanılarak (10 ng/µL stoktan) final hacmi 25 µL olacak reaksiyonda PZR içinde gerçekleştirilmiştir. 25 µL final hacim içinde 0,5 µM primer çifti konsantrasyonu, 10X *Taq* solüsyonundan 2,5 µL, her bir dNTP için 0,28 mM konsantrasyon, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1 ünite *Taq* DNA Polimeraz (Vivantis) enzimi

kullanılarak belirlenen primer ile PZR çalışmaları yapılmıştır. PZR'nin ürettiği ampliconlar jelde teyit edilerek her bir primer çiftinin ampliconları Tablo 1'de belirtilen restriksiyon enzimleri ile kullanım kılavuzuna göre işlem yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3'te *Hae* III restriksiyon enziminin 11 MK primeri ile reaksiyonu sonucunda jel görüntüleri bulunmaktadır.



**Şekil 3.** *Hae* III restriksiyon enziminin 11 MK primeri ile PZR sonrası reaksiyonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.

CAPS markırları ko-dominant bir markır tekniği olup özellikle 500 baz çifti (bc) üzerinde olan monomorfik markırları polimorfik markırlara dönüştüren bir markır yöntemidir (Matuszczak ve ark., 2020). Bu markır tekniği gen belirleme, genetik ilişkilerin ortaya konması, cinsiyet belirleme, organizmalarda biyotik ve abiyotik streslere karşı hassasiyeti ya da direnci belirlemede kullanılabilirler. Ayrıca uygulaması kolay ve çok maliyet gerektirmemektedir (Walkowiak ve ark., 2022;

Wang ve ark., 2023). CAPS markır tekniği bu çalışmada da kromozom substitüsyon hatlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Yapılan gözlemler ve analizler sonucunda *Hae* III restriksiyon enzimi için polimorfik markırlara dönüşen pirimerler 17 CS-B hattında taranarak kromozom lokasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Tablo 4'te her bir primer için hangi restriksiyon enziminde polimorfik olduğu belirtilmiştir.

**Tablo 4.** MK primerlerinin farklı restriksiyon enzim ile kesim sonuçları

Enzim/ Primer	MK Primer Çiftleri										
	MK 011	MK 048	MK 070	MK 095	MK 098	MK 101	MK 105	MK 114	MK 158	MK 159	MK 173
<i>Hinf</i> I	M	P	M	-	M	P	-	M	P	P	P
<i>Cla</i> I	-	-	-	-	M	-	-	M	-	-	-
<i>Rsa</i> I	P	P	-	-	M	P	-	-	M	P	P
<i>EcoR</i> V	-	-	M	-	M	-	-	M	M	-	-
<i>Hae</i> III	-	P	M	P	-	-	P	M	M	P	P
<i>Hind</i> III	-	-	M	-	M	-	-	-	M	M	-
<i>EcoR</i> I	-	-	-	-	-	M	-	-	M	M	-
<i>Aat</i> II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M
<i>Vsp</i> I	-	-	M	-	M	M	-	-	P	-	-
<i>Hpa</i> II	-	-	M	-	M	M	-	M	M	-	P
<i>BamH</i> I	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-
<i>Hin6</i> I	-	-	M	-	-	-	-	M	M	-	-
<i>Taq</i> I			P	P							
<i>Dra</i> I			P	M	M						
<i>Not</i> I			-	P	-						
<i>Nco</i> I			-	-	-						

-= kesim bölgesinin olmadığı, M=: kesim bölgesinin olduğu ama monomorfik bant verdiği, P= kesim bölgesinin olduğu ve polimorfik bant olduğunu gösterir.

Kesim sonucunda tablo incelendiğinde MK098 primerinin kullanılan restriksiyon enzimleri arasında hiç birisi tarafından polimorfik bant oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni primerin hem *G. hirsutum* hem de *G. barbadense* için kullanılan hatların bu gen bölgesi için yüksek oranda benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. MK158 primeri için ise *Hinf* I ve *Hae* III restriksiyon enzimleri tarafından polimorfik bantlar ortaya koyduğu tespit edilmiştir. *BamH* I, *Aat* II, *Not* I restriksiyon enzimleri sadece bir kesim bölgesi olduğu, *Nco* I restriksiyon enzimi için hiçbir primerde kesim bölgesinin olmadığı saptanmıştır. Primerler üzerinde en çok kesim bölgesine sahip restriksiyon enzimi *Hinf* I olarak tespit edilmiştir. Her bir primer ayrı ayrı incelendiğinde MK011 üzerinde 2, MK048 üzerinde 3, MK070 üzerinde 9, MK095 üzerinde 4, MK098 üzerinde 8, MK105 üzerinde 1, MK114 üzerinde 6, MK158 üzerinde 10, MK159 üzerinde 5 ve MK173 üzerinde 5 farklı restriksiyon enzim kesim bölgelerinin olduğu belirlenmiştir. Polimorfik primerlerin belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enzimleri 11 MK primerinden 9 tane MK primerinde polimorfik olarak aday kullanılacak primerler olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bilgiler değerlendirilerek TM-1, Pima 3-79 ve 17 disomik

kromozom substitüsyon hattında taramalar yapılmıştır.

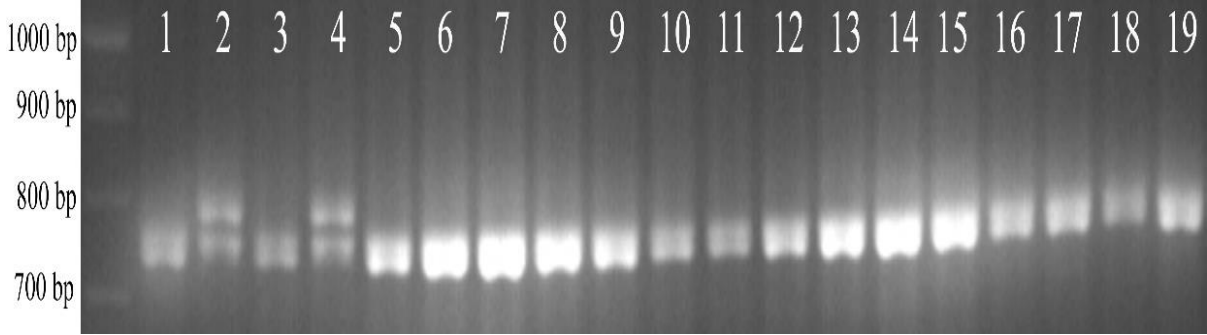
### 3.3. Polimorfik CAPS-Mikrosatellit Lokuslarının Tespiti

Son yıllarda kromozom substitüsyon hatlarının kullanımı genetik araç olarak çok fayda sağlamaktadır. Ayrıca ıslahçılar yeni çeşit geliştirme sürecindeki hem uzun süre hem de istenmeyen özelliklerin aktarılmasından dolayı bu sürece girmeyi pek istememektedir. Buna karşın kromozom substitüsyon hatlarının kullanımı ve sadece istenen lokusların aktarılması bu zahmeti azaltmaktadır (Saha ve ark., 2023). Kromozom substitüsyon hatlarının kullanım amaçlarından birisi de bitki büyümesindeki mikro-besin elementlerinin kromozom veya lokus düzeyinde ilişkileri incelenmiştir. Yapılan araştırmalarda kromozom substitüsyon hatlarında mikro-besin element düzeylerinde farklılıklar olduğu saptanmıştır (Bellaloui ve ark., 2020; Saha ve ark., 2023).

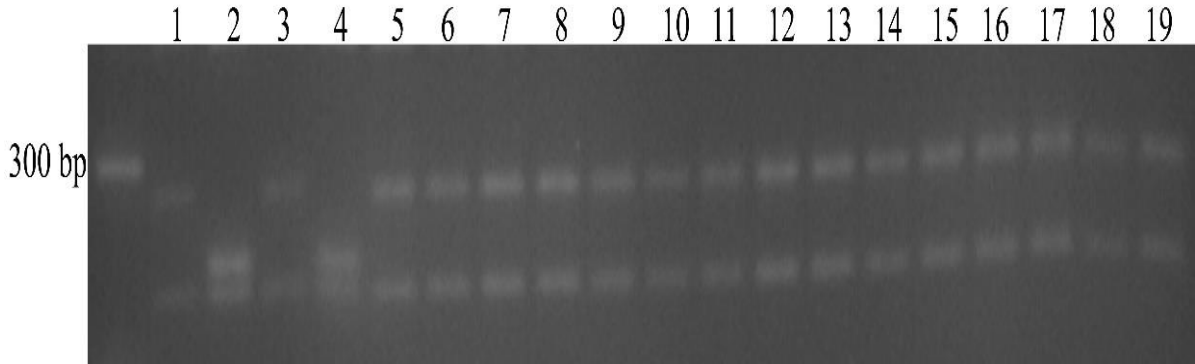
Yapılan taramalar sonucunda sadece CS-B02 nolu hat primerler tarafından tespit edilmiştir. CS-B02'nin belirlenmesinde daha önceki literatür çalışmalarında BNL1434 ve BNL3971 kodlu primerler bu hat üzerinde olduğu Gutierrez ve ark. (2009) tarafından rapor edilmiştir. Laboratuvar çalışmaları sonucunda birimizde mevcut bu primerler ile CS-B02 nolu

kromozom substitüsyon hattı teyit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda MK070 primeri TM-1, Pima -79 ve 17 CS-B hattı PZR sonrası *Taq* I restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve Şekil 4 ve 5'te de görüldüğü üzere CS-B02 nolu kromozom substitüsyon hattının *G. barbadense* türünün 2 nolu kromozomunu taşıdığı saptanmıştır. Aynı durumda MK048 primeri ve *Rsa* I restriksiyon enzimi kullanıldığında da CS-B02 nolu kromozom substitüsyon hattı teyit edilmektedir.

Kromozom substitüsyon hatlarının önemli özelliklerden biri niceliksel özellik lokusları ("Quantitative Trait Loci" QTL) çalışmalarında kullanımındır. Pamuk lif kalitesi ve diğer özelliklerden herhangi birinin QTL belirlenmesi yapılacak ıslah çalışmalarında da büyük önem arz etmektedir. Bundan dolayı pamuk kromozom substitüsyon hatlarının bu çalışmalarda kullanılması ve bu hatların belirlenmesi ıslah programları için çok önemlidir (Zhu et al. 2020).



**Şekil 4.** *Taq* I restriksiyon enzimin MK070 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi (1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo).



**Şekil 5.** *Rsa* I restriksiyon enzimin MK048 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi (1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo).

#### 4. Sonuç

Çalışma kapsamında CAPS-mikrosatellit analizleri için MK primer çiftleri ile taranan TM-1 ve Pima 3-79 hatları arasında monomorfik ve 500 baz çiftinden büyük ampikon oluşturan MK011, MK048, MK070, MK095, MK098, MK101, MK105, MK114, MK158, MK159 ve MK173 lokusları kullanılmıştır. PZR ürünleri 16 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi ile taranmıştır. Bu tarama sonucunda MK098 ve MK114 nolu primerler hariç diğer primerlerin polimorfik markırlara dönüştüğü tespit edilmiştir. Kullanılan restriksiyon enzimlerinden *Nco* I çalışmada kullanılan primerlerin oluşturmuş olduğu gen bölgelerinde herhangi bir kesim bölgesinin olmadığı analizler sonucunda ortaya konulmuştur. Kullanılan restriksiyon enzimlerinden *Rsa* I ve *Taq* I sırasıyla MK048 ve MK070 nolu primerlerin CS-B02 nolu pamuk kromozom substitüsyon hattını teyit ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak ülkemiz pamuk ıslahı için önemli

olan pamuk kromozom substitüsyon hatlarının teyit edilmesi büyük önem arz etmektedir. Ayrıca EST-SSR markırları her ne kadar monomorfik olsalar da CAPS yöntemi ile polimorfik markırlara dönüştürülebileceği bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Ülkemiz pamuk ıslahı için bu tür moleküler yaklaşımların daha yüksek bütçe ve iş hacmi ile araştırılması ve ıslah çalışmalarına katkı sağlamaları gerekmektedir.

**Katkı Oranı Beyanı**

Yazar(lar)ın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Tüm yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	A.A.	M.K
K	50	50
T	100	
Y		100
VTI	50	50
VAY	50	50
KT	50	50
YZ	50	50
KI	50	50
GR	50	50
PY	50	50
FA	50	50

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

**Çatışma Beyanı**

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

**Etik Onay Beyanı**

Bu araştırmada hayvanlar ve insanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

**Teşekkür ve Bilgilendirme**

Bu çalışma Adnan Aydın'ın yüksek lisans çalışmasının bir parçasıdır. Çalışmanın mali bütçesi Akdeniz Üniversitesi BAP koordinasyonu tarafından 2011.02.0121.052 nolu proje tarafından karşılanmıştır.

**Kaynaklar**

Arif IA, Bakir MA, Khan HA, Al Farhan AH, Al Homaidan AA, Bahkali AH, Shobrak M. 2010. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *Inter J Molec Sci*, 11(5): 2079-2096.

Aydin A, Ince A. G, Uygur Gocer E, Karaca M. 2018. Single cotton seed DNA extraction without the use of enzymes and liquid nitrogen. *Fresen Environ Bullet*, 27(10): 6722-6726.

Aydin A. 2023. Determination of genetic diversity of some upland and Sea Island cotton genotypes using high-resolution capillary electrophoresis gel. *Agron*, 13(9): 2407.

Bellaloui N, Saha S, Tonos JL, Scheffler JA, Jenkins JN, McCarty JC, Stelly DM. 2020. Effects of interspecific chromosome substitution in upland cotton on cottonseed micronutrients. *Plants*, 9(9): 1081.

Gutiérrez OA, Stelly DM, Saha S, Jenkins JN, McCarty JC, Raska DA, Scheffler BE. 2009. Integrative placement and orientation of non-redundant SSR loci in cotton linkage groups by deficiency analysis. *Molec Breeding* 23: 693-707.

Ince AG, Karaca M, Onus, AN. 2009. An in silico analysis of ginger expressed sequence tags for microsatellites. *AJT CAM*, 6: 340-341

Ince AG. 2010. Doku/Organ spesifik mikrosatellit dna gen içeriklerinin capsicum cdna kütüphanelerinde in silico ve in vitro yaklaşımlarla belirlenmesi. Doktora Tezi Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye, ss: 135.

Karaca M. 2001. Characterization of cynodon spp. and gossypium spp. genomes using molecular and cytological techniques. PhD thesis, Dissertation University of Mississippi, Mississippi, USA, pp: 201.

Karaca M, Ince AG, Aydın A, Ay ST. 2013. Cross-genera transferable e-microsatellite markers for 12 genera of the *Lamiaceae* family. *J Sci Food Agri*, 93(8): 1869-1879.

Karaca M, Ince AG, Elmasulu SY, Onus AN, Turgut K. 2005. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochem*, 343(2): 353-355.

Karaca M, Ince AG. 2011. New non-redundant microsatellite and CAPS-microsatellite markers for cotton (*Gossypium L.*). *Turkish J Field Crops*, 16(2): 172-178.

Karaca M, Ince AG. 2023. A DNA extraction method for nondestructive testing and evaluation of cotton seeds (*Gossypium L.*). *Biochem Genet*, doi.org/10.1007/s10528-023-10496-5.

Lateef DD. 2015. DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements. *J BioSci Med*, 3(5): 1-7.

Liu L, Saha S, Stelly D, Burr B, Cantrell R. G. 2000. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *J Heredity*, 91(4): 326-332.

Matuszczak M, Spasibionek S, Gacek K, Bartkowiak-Broda I. 2020. Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) marker for identification of two mutant alleles of the rapeseed *BnaA.FAD2* gene. *Molec Biol Reports*, 47(10): 7607-7621.

Mert M. 2007. Pamuk tarımının temelleri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Türkiye, ss: 282.

Peng J, Shi C, Wang D, Li S, Zhao X, Duan A, He C. 2021. Genetic diversity and population structure of the medicinal plant *Docynia delavayi* (Franch.) Schneid revealed by transcriptome-based SSR markers. *J Applied Res Med Arom Plant*, 21: 100294.

Preethi P, Rahman S, Naganeeswaran S, Sabana AA, Gangaraj KP, Jerard BA, Rajesh MK. 2020. Development of EST-SSR markers for genetic diversity analysis in coconut (*Cocos nucifera L.*). *Molec Biol Reports*, 47: 9385-9397.

Saha S, Tewolde H, Jenkins J. N, McCarty J. C, Stelly D. M. 2023. Chromosome substitution lines with improved essential mineral nutrients and fiber quality traits in Upland cotton. *Genet Resour Crop Evolut*, 2023: 1-15.

Shah RA, Bakshi P, Jasrotia A, Itoo H, Padder BA, Gupta R, Dolkar D. 2023. Morphological to molecular markers: Plant genetic diversity studies in Walnut (*Juglans regia L.*)—A Review. *Erwerbs-Obstbau*, 2023: 1-13.

Song L, Wang R, Yang X, Zhang A, Liu D. 2023. Molecular markers and their applications in marker-assisted selection (MAS) in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). *Agri*, 13(3): 642.

Stelly D. M, Saha S, Raska D. A, Jenkins J. N, McCarty J. C, Gutierrez O. 2005. Registration of 17 germplasm lines of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) each with a different pair of *G. barbadense* chromosome or chromosome arms substituted for the respective *G. hirsutum* chromosome or chromosome arms. *Crop Sci* 45 2663-2665.

Viot CR, Wendel JF. 2023. Evolution of the cotton genus *Gossypium* and its domestication in the Americas. *Critical Rev Plant Sci*, 42(1): 1-33.

Walkowiak M, Matuszczak M, Spasibionek S, Liersch A, Mikołajczyk K. 2022. Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) markers for characterization of the LuFAD3A gene from various flax (*Linum usitatissimum L.*)



- cultivars. *Agronomy*, 12(6): 1432.
- Wang Y, Hu X, Fu L, Wu X, Niu Z, Liu M, Ru Z. 2023. Cleaved amplified polymorphic sequence (CAP) marker development and haplotype geographic distribution of TaBOR1. 2 associated with grain number in common wheat in China. *Cereal Res Commun*, 51(2): 463-470.
- Witt TW, Ulloa M, Schwartz RC, Ritchie GL. 2020. Response to deficit irrigation of morphological yield and fiber quality traits of upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*G. barbadense* L.) cotton in the Texas High Plains. *Field Crops Res*, 249: 107759.
- Younis A, Ramzan F, Ramzan Y, Zulfiqar F, Ahsan M, Lim K. B. 2020. Molecular markers improve abiotic stress tolerance in crops: a review. *Plants* 9(10) 1374.
- Zhu D, Li X, Wang Z, You C, Nie X, Sun J, Lin Z. 2020. Genetic dissection of an allotetraploid interspecific CSSLs guides interspecific genetics and breeding in cotton. *BMC Genom*, 21(1): 1-16.