

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAMUK (*GOSSYPIUM* L.) KROMOZOM SUBSTİTÜSYON
HATLARININ MİKROSATELLİT MARKIRLARI KULLANILARAK
BELİRLENMESİ**

Adnan AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

2013

**PAMUK (*GOSYPIUM L.*) KROMOZOM SUBSTİTÜSYON
HATLARININ MİKROSATELLİT MARKIRLARI KULLANILARAK
BELİRLENMESİ**

Adnan AYDIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2011.02.0121.052 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2013

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAMUK (*GOSSYPIUM L.*) KROMOZOM SUBSTİTÜSYON
HATLARININ MİKROSATELLİT MARKI RLARI KULLANILARAK
BELİRLENMESİ

Adnan AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 07/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (95) not takdir edilerek oy birliği/çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Doç. Dr. Mehmet KARACA (Danışman).....
Prof. Dr. Melahat AVCI BİRSİN.....
Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI.....

ÖZET

PAMUK (*GOSSYPIMUM L.*) KROMOZOM SUBSTİTÜSYON HATLARININ MİKROSATELLİT MARKIRLARI KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Adnan AYDIN

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KARACA

Aralık 2013, 118 Sayfa

Pamuk (*Gossypium L.*) dünya genelinde tekstil endüstrisi için en önemli doğal lif kaynağı ve aynı zamanda önemli bir yağ bitkisidir. Pamuk türleri dünyada Çin, ABD, Hindistan ve Özbekistan'ın da ilk sıralarda yer aldığı 70'ten fazla ülkede yetiştirilmektedir. 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 olarakta 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 antogonistik 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.

Günümüze kadar pamukta 17 set disomik yabancı kromozom substitüsyon hattı geliştirilmiştir. Bu hatlarda *G. barbadense* Pima 3-79 hattının bir çift kromozomu veya kromozom kolu hipoaneuploid tabanlı geriye melezleme çalışmaları ile Texas Marker-1 (TM-1) hattına yakın bir izogenik hata transfer edilmiştir. Ancak CS-B hatlarının teşhisinde veya CS-B x CS-B ve CS-B x herhangi bir hat arasındaki melezlemelerde markır yardımıyla seleksiyon (MAS) çalışmalarında kullanılacak moleküler markırlar geliştirilmemiştir.

Bu çalışmada 17 CS-B hattının teşhisinde kullanılabilecek genik mikrosatellit (EST-SSR), genomik mikrosatellit (SSR) ve CAPS-mikrosatellit markırlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada kromozom substitüsyon hatlarının kromozom lokasyonları bilinmeyen DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının tespitinde kullanım olanakları araştırılmıştır.

Çalışmada 17 CS-B, TM-1 ve Pima 3-79 hatlarından 55 DNA örneği elde edilmiş ve bu DNA örnekleri mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit markırlarının analizlerinde kullanılmıştır. Toplam 3 set olarak elde edilen DNA örneklerinde 225'in üzerinde lokus kullanılarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Çalışmada kullanılan 17 CS-B hattının CS-B05Sh, CS-B12Sh, CS-B15Sh ve CS-B25 hatları dışındaki bütün kromozom substitüsyon hatlarının teşhisinde kullanılabilecek genik ve genomik moleküler markırlar tespit edilmiştir.

G. barbadense Pima 3-79 kromozom ve kromozom kollarını taşıyan TM-1 izogenik hattını TM-1'den ayıran DNA markırları tespit edilmiştir. Kromozom substitüsyon hatlarının genetik yönden taşıdıkları Pima 3-79 kromozom veya kromozom kolları dışında birbirlerine benzer oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmada bazı CS-B hatlarının diğer CS-B hatları ile fiziksel olarak karışık olduğu belirlenmiştir. Fiziksel olarak karışım içeren CS-B hatlarının birimde bulunan diğer hat bitkiler ile karşılaştırılarak yeniden analiz edilmesi gerektiği saptanmıştır.

Çalışmada kullanılan bazı CS-B hatlarında bazı lokuslarda bulunan allellerin kaybolduğu veya translokasyon olayı sonucu diğer kromozomlara transfer olduğu öngörülmüş ve bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği belirlenmiştir. Çalışmada öngörülmüş olan CS-B hatlarındaki translokasyonların varlıklarının ve translokasyon modellerinin yeni moleküler markırlar kullanılarak ileriki çalışmalarda teyit edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada kromozom substitüsyon hatlarının DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının belirlenmesinde etkin bir kaynak olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizlerde 16 MK lokusunun kromozom lokasyonları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmada CS-B hatlarından genetik ve fiziksel açıdan saf olan hatların yeni çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılabilme potansiyellerinin bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu hatların genetik çalışmalarda kullanılarak lif uzunluğu, inceliği ve sağlamlığı yönünden genetik interaksiyonları ve gen etkileşimleri konusunda kullanılabilirlikleri belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Kromozom substitüsyon hatları, SSR, EST-SSR, CAPS-Mikrosatellit

JÜRİ:

Doç. Dr. Mehmet KARACA (Danışman)

Prof. Dr. Melahat AVCI BİRSİN

Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF COTTON (*GOSSYPIUM* L.) CHROMOSOME SUBSTITUTION LINES USING MICROSATELLITE MARKERS

Adnan AYDIN

M.Sc. Thesis in Field Crops

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARACA

December 2013, 118 Pages

Cotton (*Gossypium* L.) is the most important natural fiber source for the textile industry and also an important oil crops world-wide. Several species of cotton are mainly grown as an important crop in more than 70 countries including China, USA, India and Uzbekistan. Although cotton plants are best known as the source of textile materials for clothing, the fiber, seed and plants have many other uses, including home insulation to save energy, protein-rich seed-derived feed for animals, cottonseed oil as a foodstuff for humans, and as a source of mulch and biomass.

Cotton breeding studies rely primarily on crosses among closely related elite domesticated genotypes with high yield and superior fiber qualities, and on reselection from existing cultivars. Cotton breeding programs suffer from the narrow genetic base within the cultivated species. This encouraged the researchers to use of interspecific introgression lines. However there are several problems in interspecific introgression studies including complex antagonistic relationships among important traits; cytogenetic differences among the species due to different ploidy levels and chromosomal structural differences including translocations and inversions; linkage drag effects leading to poor agronomic qualities; reduced recombination; loss of alien genetic materials in early generations; sterility in the hybrids; complex genetic interactions such as Muller-Dobzhansky complexes and distorted segregation. However, the use of chromosome substitution lines in cotton breeding programs could solve several problems of interspecific introgression studies mentioned above.

To date in cotton, a set of 17 disomic alien chromosome substitution lines, which consist of chromosome pair or chromosome arm pair of *G. barbadense* Pima 3-79 (CS-B) have been developed through hypoaneuploid-based backcrossing in a near-isogenic genetic background of Texas Marker-1 (TM-1) line. However, there are no reports on molecular markers developed for marker assisted selection (MAS) studies of hybrids between CS-B x CS-B and CS-B x any line or identification of CS-B lines.

This study was conducted to identify genic microsatellite (EST-SSR), genomic microsatellite and CAPS-microsatellite markers to identify and determine each 17 CS-B of cotton substitution lines. Furthermore this study is also utilized 17 CS-B substitution line to identify chromosome locations of novel DNA markers.

A total of 55 DNA samples obtained from 17 CS-B lines, TM-1 and Pima 3-79 were used in microsatellite and CAPS-microsatellite studies. Based on a total of 3 set genomic DNA samples and more than 225 loci the following results were obtained.

In this study genic and genomic molecular markers were determined for the identification of each chromosome substitution lines (CS-B) with the exception of CS-B05Sh, CS-B12Sh, CS-B15Sh and CS-B25.

In this study molecular markers were identified to differentiate TM-1 and its isogenic line whose chromosomes or chromosome arms were substituted with *G. barbadense*. This study clearly showed that all the CS-B lines were genetically identical with the exception of chromosomes or chromosome arms of *G. barbadense* Pima 3 -79.

In this study results clearly showed that some CS-B lines contained physical contamination with other CS-B lines. Those CS-B lines containing physical contamination with other CS-B lines present in the research unit are required further studies using individual plant from the lines.

In this study it was found that several CS-B lines have lost several alleles of loci or translocated within the genome of CS-B lines. Further studies are required to confirm translocation and the mode of chromosome translocation using new DNA markers.

In this study it was found that chromosome substitution lines could be successfully used to locate DNA markers on chromosome or chromosome arm. A total of 16 MK loci were assigned to chromosome or chromosome arms in this study.

In conclusion, results of this study revealed that those CS-B lines confirmed using molecular markers could be successfully used in cultivar development studies. In addition these CS-B lines could be used in genetic and gene interactions studies of fiber length, liber strength and fineness.

KEYWORDS: Chromosome substitution lines, SSR, EST-SSR, CAPS-Microsatellite

COMMITTEE:

Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARACA (Advisor)

Prof. Dr. Melahat AVCI BİRSİN

Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI

ÖNSÖZ

İnsanoğlunun beşikten-mezara kadar giyim-kuşamında vazgeçilmezi olan pamuk ülkemizde beyaz altın olarak adlandırılmış olmasına rağmen son on yıldır Türkiye'deki üretim alanları giderek azalmış ve dışa olan bağımlılık artmıştır. Pamuk bitkisinin üretim girdilerinin fazla olması, zararlı ve hastalıklarının çok olması ve pamuk üretimine alternatif sentetik liflerin artması pamuk üretiminin azalmasına neden olmuştur. UV zararlarına karşı sentetik liflerden daha koruyucu olan pamuğun ve diğer lif bitkilerinin özellikle organik tarımla birlikte önemi giderek artmaktadır. Pamuk ıslah çalışmalarında tam anlamıyla istenilen özellikte bir pamuk çeşidi geliştirilememiştir. Özellikle pamuk üretiminde girdileri azaltmaya ve pamuk lif kalitesini artırmaya yönelik ıslah çalışmaları hala devam etmektedir. Bu tez çalışmasında da kaliteli lif üreten bir pamuk türünden lif verimi yüksek olan türe aktarılan kromozom ve kromozom parçalarının moleküler düzeyde teyidi yapılarak ileriki pamuk ıslah çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve becerilerini esirgemeyen, beni hep öğrenmeye teşvik eden, bilim etiğini ve bilim bakış açısını öğreten ve aşıl原因 Saygıdeğer danışman hocam **Doç. Dr. Mehmet KARACA**'ya sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve becerileri ile yardımcı olan ve tez yazım döneminde manevi desteğini esirgemeyen Sayın **Doç. Dr. Ayşe Gül İNCE** hocama içten teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasının bitki materyalini sağlayan Sayın **Prof. Dr. Sukumar SAHA**'ya (Mississippi Devlet Üniversitesi) teşekkürlerimi sunarım. Yoğun işleri arasında değerli katkıları için Sayın Jüri üyelerim **Prof. Dr. Melahat AVCI BİRSİN** (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), **Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI**'ya (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında manevi desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşım **Arş. Gör. Behcet İNAL**'a (Ankara Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Enstitüsü), **Arş. Gör. Begüm TÜTÜNCÜ**'ye (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) ve yüksek öğrenime başlamaya karar verdiğim andan beri her konuda bana destek veren **AİLEME** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ	x
İÇİNDEKİLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Bitki Materyali.....	13
3.2. DNA Ekstraksiyonu	16
3.3. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi	18
3.3.1. Spektrofotometre yöntemi	18
3.3.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi	18
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)	18
3.4.1. PZR bileşenleri	18
3.4.2. PZR profilleri	19
3.4.3. CAPS-mikrosatellit analizi.....	20
3.4.4. Primer çiftleri	22
3.5. Mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit markırlarının belirlenmesi.....	31
3.6. MK lokuslarının kromozom lokasyonlarının belirlenmesi.....	31
3.7. CS-B hatlarının değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	32
4.1. Substitüsyon Hatlarının Yetiştirilmesi ve Yaprak Örnek Setleri.....	32
4.2. DNA Ekstraksiyonu	33
4.3. DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi	35
4.3.1. Spektrofotometre analizleri	35
4.3.2. Agaroz jel elektroforez analizleri	38
4.4. PZR Profillerinin Tespiti	40
4.5. Polimorfik Mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit Lokusların Tespiti.....	40

4.5.1. Mikrosatellit lokuslarının analizleri	42
4.5.2. CAPS-mikrosatellit lokuslarının analizleri	43
4.6. Kromozom Substitüsyon Hatlarının Tespiti ve Teyit Edilmesi.....	45
4.6.1. SUB01'in belirlenmesi	46
4.6.2. SUB02'nin belirlenmesi	47
4.6.3. SUB04'ün belirlenmesi	48
4.6.4. SUB05Sh'nin belirlenmesi.....	49
4.6.5. SUB06'nın belirlenmesi	49
4.6.6. SUB07'nin belirlenmesi	50
4.6.7. SUB11Sh'nin belirlenmesi.....	50
4.6.8. SUB12Sh'nin belirlenmesi.....	51
4.6.9. SUB14Sh'nin belirlenmesi.....	52
4.6.10. SUB15Sh'nin belirlenmesi	52
4.6.11. SUB16'nın belirlenmesi	53
4.6.12. SUB17'nin belirlenmesi	53
4.6.13. SUB18'in belirlenmesi	54
4.6.14. SUB22Sh'nin belirlenmesi	55
4.6.15. SUB22Lo'nun belirlenmesi.....	56
4.6.16. SUB25'in belirlenmesi	57
4.6.17. SUB26Lo'nun belirlenmesi.....	58
4.17. Kromozom substitüsyon hatlarının değerlendirilmesi.....	59
4.8. MK Lokuslarının Kromozomlarının Tespiti.....	68
5. SONUÇ	74
6. KAYNAKLAR	81
7. EKLER.....	87
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bp	“Base pair”
Co	Kobalt
gr	Gram
Gy	“Gray”
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
LiCl	Lityum klorür
mM	Milimolarite
MgCl	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
NaAc	Sodyum asetat
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
pH	“Potentia hydrogeny”
sn	Saniye
xg	“gravity” Döngü gücü
γ	Gama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μ L	Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
BAC	“Bacterial Artificial Chromosome”
BME	“ β -mercaptoethanol”
BNL	“Brookhaven National Laboratory”
CAPS	“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”
CIR	“CIRAD-Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement (Agriculture Reseach for Development)”
CIS	Kloroform-izoamil alkol
CMD	“Cotton Marker Database”
CS-B	“Chromosome Substitution lines of <i>G. barbadense</i> in <i>G. hirsutum</i> ”
CS-RIL	“Chromosome Substitution-Recombinant Inbred Line”
CTAB	“Cetyltrimethylammonium bromide”
DAMD	“Directed Amplification of Minisatellite DNA”
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EB	“Extraction Buffer” Ekstraksiyon çözeltisi
EDTA	“Ethylene di-amin Tetra Acetic Acid”
EST	“Expressed Sequence Tag”
FISH	Fluoresan <i>in situ</i> hibridizasyon
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar
ISSR	“Inter Simple Sequence Repeat”
LB	“Lysis Buffer” Lezyon Çözeltisi
Lo	“Long” Uzun kol
MAS	“Marker Assisted selection”
MGAES	“Mississippi <i>Gossypium arboreum</i> EST-SSR”
MK	Mehmet Karaca
MSU	“Mississippi State University”
MUSB	“Acala Maxxa BAC-ends primer pairs”
PCR-RFLP	“Polymerase Chain-Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism”

PPVP	“Polyvinylpolypyrrolidone, Insoluble”
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNaz	Ribonükleaz
QTL	“Quantitative Trait Locus”
SCAR	“Sequence Characterized Amplified Region”
Sh	“Short” Kısa kol
SLS	Sodyum Laruil Sarkosil
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism”
SSCP	“Single Strand Conformation Polymorphism”
SSR	“Simple Sequence Repeats”
STMS	“Sequence-Tagged Microsatellite Site”
SUB	Substitüsyon (İkame)
TBE	TRIS-Borik-Asit-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TM-1	“Texas Marker 1”
TMB	“Texas Marker BAC”
TRAP	“Target Region Amplification Polymorphism”
TRIS	“Tris(hydroxymethyl)aminomethane”
USDA	“United States Department of Agriculture”
UV	“Ultraviolet light”

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Pamuğun bazı kullanım alanlarının şematik gösterimi.	1
Şekil 3.1.	Çalışma kapsamında kullanılan genetik materyallerdeki kromozom substitüsyon hatları, alıcı <i>G. hirsutum</i> L. Texas Marker-1 izogenik hat ve verici (<i>G. barbadense</i> L. Pima 3-79) hata ait kromozom farklılıklarının gösterilmesi	14
Şekil 4.1.	2011 döneminde yetiştirilen substitüsyon, TM-1 ve Pima 3-79 hatlarının arazi koşullarında görünüşü.....	32
Şekil 4.2.	2012 döneminde yetiştirilen substitüsyon, TM-1 ve Pima 3-79 hatlarının arazi koşullarında yetiştirilmesi.....	33
Şekil 4.3.	Yaprak dokularının ezilmesi ve ekstraksiyon çözeltilerinin hazırlanması	34
Şekil 4.4.	Ekstraksiyonu yapılan hatların 200-300 nm taraması. Şekildeki Y eksenine göre absorban miktarını X eksenine ise dalga boylarını göstermektedir	35
Şekil 4.5.	Ekstraksiyonu tamamlanmış genomik DNA'nın Agaroz jel elektroforez (AJE) yöntemiyle görüntülenmesi.....	39
Şekil 4.6.	Bazı primer çiftlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında hem bulk (Set 1) hem de teksele (Set 2) genomik DNA örneklerinin BNL1434, BNL2544, CM63, BNL0673, BNL1721 ve BNL2496 primer çiftleri ile taranması. İlk kuyucuk DNA büyüklük markıklarını göstermektedir	41
Şekil 4.7.	MK082 lokusu ile örneklerin taranması.	41
Şekil 4.8.	TM-1 ve Pima 3-79 hatlarının farklı MK lokusları ile taranması	43
Şekil 4.9.	<i>Hae</i> III restriksiyon enziminin CAPS-mikrosatellit analizi için seçilen lokusların taranması.....	44
Şekil 4.10.	BNL3888 lokusu ile CS-B01 hattının tespiti.....	47
Şekil 4.11.	BNL1434 lokusu ile CS-B02 hattının tespiti.....	48
Şekil 4.12.	BNL2572 lokusu ile CS-B04 hattının tespiti.....	48
Şekil 4.13.	MUSB0312 lokusu ile CS-B05Sh hattının tespit edilememesi.....	49
Şekil 4.14.	TMB1277 lokusu ile CS-B06 hattının tespit edilememesi.....	50
Şekil 4.15.	BNL1597 lokusu ile CS-B07 hattı yerine CS-B15Sh hattının tespiti. ...	50
Şekil 4.16.	BNL3442 lokusu ile CS-B11Sh hattının tespiti.	51
Şekil 4.17.	BNL4041 lokusu ile CS-B12Sh hattının tespit edilememesi.	51
Şekil 4.18.	BNL3443 lokusu ile CS-B14Sh hattının tespiti.	52
Şekil 4.19.	BNL4082 lokusu ile CS-B15Sh hattının tespit edilememesi.	53
Şekil 4.20.	CM66 lokusu ile CS-B16 hattının tespiti.	53

Şekil 4.21.	BNL3955 lokusu ile CS-B17 hattının tespiti.....	54
Şekil 4.22.	CM63 lokusu ile CS-B02 ve CS-B18 hattının tespiti.....	55
Şekil 4.23.	BNL2544 lokusu ile CS-B02 ve CS-B18 hattının tespiti.....	55
Şekil 4.24.	BNL0448 lokusunun CS-B22Sh yerine CS-B25 hattında bulunması... 56	
Şekil 4.25.	BNL4030 lokusunun CS-B22Sh yerine CS-B25 hattında bulunması... 56	
Şekil 4.26.	BNL3873 lokusunun CS-B22Sh ve CS-B22Lo üzerinde tespiti.....	57
Şekil 4.27.	BNL3806 lokusu ile CS-B25 hattının tespit edilememesi.	57
Şekil 4.28.	BNL0341 lokusu ile CS-B07 ve CS-B26Lo hatlarının tespit edilmesi. 58	
Şekil 4.29.	MGAES-106 lokusu ile CS-B26Lo hattının tespit edilmesi.	58
Şekil 4.30.	CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL0341, BNL1434, BNL2572 ve BNL0542 lokusları yönünden karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.31.	BNL0341 lokusunun 3 farklı CS-B hattında tespiti.	62
Şekil 4.32.	CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL3955, MUSB0078, BNL0341 ve BNL1517 lokusları ile karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.33.	CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL3442, BNL4041, BNL3434 ve BNL1597 lokusları ile karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.34.	CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL4082, CM66, BNL3955 ve CM63 lokusları ile karşılaştırılması. .64	
Şekil 4.35.	BNL1061 lokusu ile CS-B17 Set 2’de tespitedilememesi.	65
Şekil 4.36.	BNL3955 lokusu ile CS-B17 ve CS-B18 hatlarının tespiti.....	65
Şekil 4.37.	CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL3955, BNL3873, BNL3463 ve BNL3873 lokusları ile karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.38.	BNL2544 lokusu ile CS-B18 hattının Set 2’de tespit edilememesi.	66
Şekil 4.39.	CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL3806, BNL3103, BNL0341 ve BNL3463 lokusları ile karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.40.	MK068 lokusunun 16 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi.....	70
Şekil 4.41.	MK062 lokusunun 14 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi.....	71
Şekil 4.42.	MK040 lokusunun 6 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi.....	71
Şekil 4.43.	MK130 lokusunun 6 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi.....	71
Şekil 4.44.	MK037 lokusunun 1 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi.....	72
Şekil 4.45.	MK138 lokusunun 26 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi.....	72

Şekil 4.46.	CAPS- <i>Hae</i> III-MK068 lokusunun 2 nolu kromozoma yerleştirilmesi...	73
Şekil Ek-1.	SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	87
Şekil Ek-2.	SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	87
Şekil Ek-3.	SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	87
Şekil Ek-4.	SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	88
Şekil Ek-5.	SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	88
Şekil Ek-6.	EST-SSR primerlerinin (MK001-MK012) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	88
Şekil Ek-7.	EST-SSR primerlerinin (MK013-MK024) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	89
Şekil Ek-8.	EST-SSR primerlerinin (MK025-MK036) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	89
Şekil Ek-9.	EST-SSR primerlerinin (MK037-MK048) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	89
Şekil Ek-10.	EST-SSR primerlerinin (MK049-MK060) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	90
Şekil Ek-11.	EST-SSR primerlerinin (MK061-MK072) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	90
Şekil Ek-12.	EST-SSR primerlerinin (MK073-MK084) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	90
Şekil Ek-13.	EST-SSR primerlerinin (MK085-MK096) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	91
Şekil Ek-14.	EST-SSR primerlerinin (MK097-MK105) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	91
Şekil Ek-15.	EST-SSR primerlerinin (MK109-MK120) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	92
Şekil Ek-16.	EST-SSR primerlerinin (MK121-MK132) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	92
Şekil Ek-17.	EST-SSR primerlerinin (MK133-MK144) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	92
Şekil Ek-18.	EST-SSR primerlerinin (MK145-MK156) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	93
Şekil Ek-19.	EST-SSR primerlerinin (MK157-MK168) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	93
Şekil Ek-20.	EST-SSR primerlerinin (MK169-MK173) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	93
Şekil Ek-21.	BNL1434 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	94

Şekil Ek-22.	BNL3971 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	94
Şekil Ek-23.	BNL3971 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	94
Şekil Ek-24.	BNL3792 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	94
Şekil Ek-25.	BNL3792 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	95
Şekil Ek-26.	BNL3255 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	95
Şekil Ek-27.	BNL3255 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	95
Şekil Ek-28.	TMB0154 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	95
Şekil Ek-29.	BNL3995 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	96
Şekil Ek-30.	CIR141 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	96
Şekil Ek-31.	BNL3415 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	96
Şekil Ek-32.	BNL1679 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	96
Şekil Ek-33.	MGAES-10 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	97
Şekil Ek-34.	BNL3065 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	97
Şekil Ek-35.	BNL3065 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	97
Şekil Ek-36.	BNL2496 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	97
Şekil Ek-37.	BNL2496 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	98
Şekil Ek-38.	BNL3408 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	98
Şekil Ek-39.	BNL3408 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	98
Şekil Ek-40.	BNL1597 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 3)	98

Şekil Ek-41.	BNL1606 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	99
Şekil Ek-42.	BNL1721 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	99
Şekil Ek-43.	BNL2571 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	99
Şekil Ek-44.	BNL1079 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	99
Şekil Ek-45.	BNL0673 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	100
Şekil Ek-46.	BNL0673 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	100
Şekil Ek-47.	BNL3463 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	100
Şekil Ek-48.	BNL3103 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 1)	100
Şekil Ek-49.	BNL3103 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	101
Şekil Ek-50.	BNL3873 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 3)	101
Şekil Ek-51.	BNL4030 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 3)	101
Şekil Ek-52.	MK007 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	101
Şekil Ek-53.	MK017 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	102
Şekil Ek-54.	MK019 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	102
Şekil Ek-55.	MK027 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	102
Şekil Ek-56.	MK033 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	102
Şekil Ek-57.	MK035 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	103
Şekil Ek-58.	MK039 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	103
Şekil Ek-59.	MK41 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	103

Şekil Ek-60.	MK044 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	103
Şekil Ek-61.	MK046 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	104
Şekil Ek-62.	MK051 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	104
Şekil Ek-63.	MK052 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	104
Şekil Ek-64.	MK053 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	104
Şekil Ek-65.	MK054 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	105
Şekil Ek-66.	MK060 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	105
Şekil Ek-67.	MK061 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	105
Şekil Ek-68.	MK064 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	105
Şekil Ek-69.	MK065 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	106
Şekil Ek-70.	MK072 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	106
Şekil Ek-71.	MK073 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	106
Şekil Ek-72.	MK079 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	106
Şekil Ek-73.	MK088 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	107
Şekil Ek-74.	MK093 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	107
Şekil Ek-75.	MK107 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	107
Şekil Ek-76.	MK108 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	107
Şekil Ek-77.	MK131 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	108
Şekil Ek-78.	MK139 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	108

Şekil Ek-79.	MK143 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	108
Şekil Ek-80.	MK147 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	108
Şekil Ek-81.	MK156 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	109
Şekil Ek-82.	MK157 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	109
Şekil Ek-83.	MK160 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	109
Şekil Ek-84.	MK168 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	109
Şekil Ek-85.	MK169 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	110
Şekil Ek-86.	MK170 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu amplikonların jel görüntüsü (SET 2)	110
Şekil Ek-87.	<i>Aat</i> II restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	110
Şekil Ek-88.	<i>BamH</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	111
Şekil Ek-89.	<i>Cla</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	111
Şekil Ek-90.	<i>EcoR</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	112
Şekil Ek-91.	<i>EcoR</i> V restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	112
Şekil Ek-92.	<i>Hin6</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	113
Şekil Ek-93.	<i>Hind</i> III restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	113
Şekil Ek-94.	<i>Hinf</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	114
Şekil Ek-95.	<i>Hpa</i> II restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	114
Şekil Ek-96.	<i>Rsa</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	115
Şekil Ek-97.	<i>Vsp</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	115

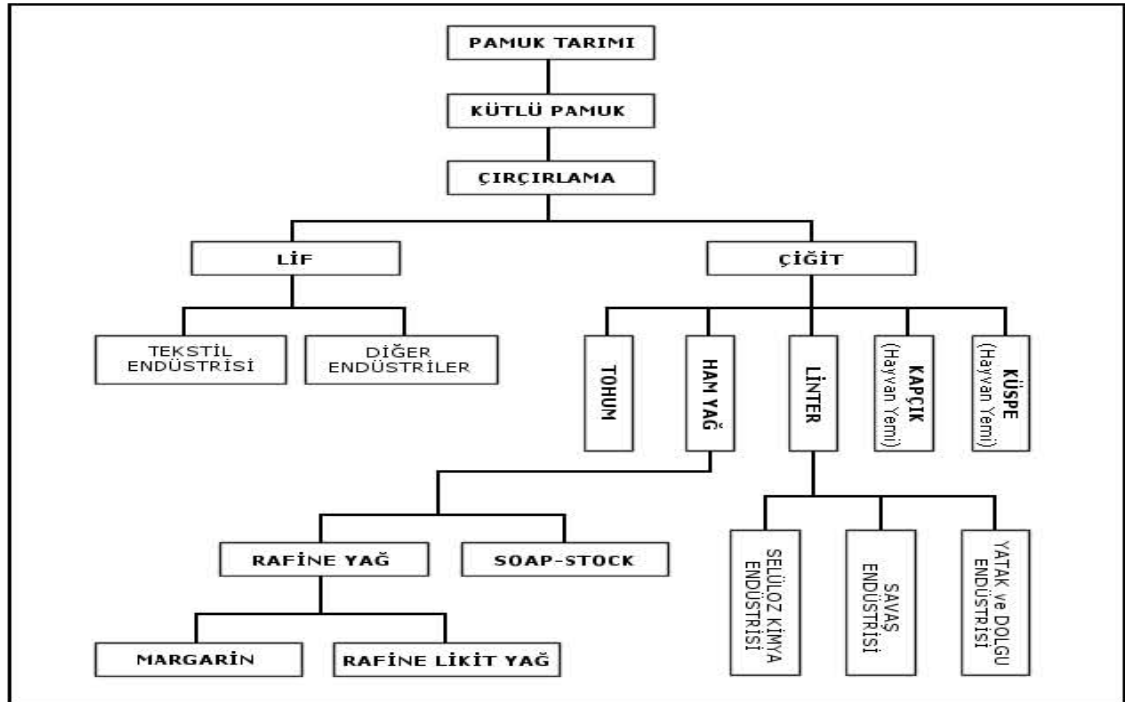
Şekil Ek-98.	<i>Taq</i> I, <i>Dra</i> I ve <i>Not</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması.....	116
Şekil Ek-99.	<i>Nco</i> I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması	116
Şekil Ek-100.	<i>Rsa</i> I restriksiyon enzimin MK011 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	116
Şekil Ek-101.	<i>Rsa</i> I restriksiyon enzimin MK048 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	117
Şekil Ek-102.	<i>Taq</i> I restriksiyon enzimin MK070 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	117
Şekil Ek-103.	<i>Hae</i> III restriksiyon enzimin MK095 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	117
Şekil Ek-104.	<i>Rsa</i> I restriksiyon enzimin MK101 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	117
Şekil Ek-105.	<i>Vsp</i> I restriksiyon enzimin MK158 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	118
Şekil Ek-106.	<i>Hae</i> III restriksiyon enzimin MK159 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	118
Şekil Ek-107.	<i>Hae</i> III restriksiyon enzimin MK173 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. PZR’de kullanılan kimyasallar ve miktarları	19
Çizelge 3.2. Amplifikasyon Profili A.....	19
Çizelge 3.3. Amplifikasyon Profili B.....	20
Çizelge 3.4. CAPS-mikrosatellit analizlerinde kullanılan restriksiyon enzimlerin tanıma bölgeleri ve çalışma sıcaklıkları	21
Çizelge 3.5. Genik MGAES mikrosatellit primer çiftlerinin sekans dizilimleri ve motifleri	22
Çizelge 3.6. Genik MK mikrosatellit primer çiftlerinin sekans dizilimleri ve motifleri	23
Çizelge 3.7. Genomik Mikrosatellit primer çiftlerinin Sekans dizilimleri ve motifleri	29
Çizelge 4.1. Ekstraksiyonu yapılmış olan DNA’nın A_{230} , A_{260} ve A_{280} absorbans okuma değerleri ve ortalamaları.....	37
Çizelge 4.2. MK lokuslarının farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu monomorfik ve polimorfik ampliconların oluşmasının tablo olarak gösterimi.....	43
Çizelge 4.3. Kromozom substitüsyon hatlarının teyidinde kullanılan lokuslar.....	45
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan kromozom spesifik lokuslar	46
Çizelge 4.5. CS-B hatlarının lokus içerikleri yönünden karşılaştırılması	68
Çizelge 4.6. CS-B hatları kullanılarak DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının tespiti	70

1. GİRİŞ

Tekstil sektörünün en önemli doğal hammaddesi olan pamuk, 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 ile de kâğıt sanayisinin hammaddesi durumundadır (Şekil 1.1). Pamuğun çekirdeğinden elde edilen yağ, giderek artan miktarda biyodizel üretiminde de hammadde olarak kullanım alanları araştırılmaktadır. Bu sebeplerin yanında nüfus artışı ve yaşam standardının yükselmesi, pamuk bitkisine olan talebi de artırmaktadır. Bu yönleriyle pamuğa olan ihtiyaç, tüm dünyada ve ülkemizde artış göstermektedir (Karaca 2001, Mert 2007, Anonim 2011).



Şekil 1.1. Pamuğun bazı kullanım alanlarının şematik gösterimi (Anonim 2011).

USDA (“United States Department of Agriculture”) verilerine göre 2010/2011 yılı dünya pamuk üretimi 25.377.000 ton olarak gerçekleşmişken Türkiye’de sadece 471.000 ton üretim yapmıştır. En fazla üretim yapan ülkelerin başında Çin 6.641.000 ton üretimle birinci, Hindistan 5.748.000 ton üretimle ikinci, ABD 3.942.000 ton üretimle üçüncü ve Pakistan 1.916.000 ton üretimle dördüncü sırada yer almaktadır.

Pamuk tüketim miktarı olarak 10.015.000 ton ile Çin birinci, 4.583.000 ton ile Hindistan ikinci, 2.177.000 ton ile Pakistan üçüncü ve 1.219.000 ton ile Türkiye dördüncü sırada yer almaktadır. Bu durumda Türkiye günümüzde yaklaşık 730.000 ton pamuk ihtiyacını ithalatla karşılamaktadır.

Ayrıca FAO (“Food and Agriculture Organization of the United Nations”) 2010 verilerinde Türkiye lif üretimi 471.000 ton, çığıt üretimi 750.000 ton olarak verilmiştir. TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2011 verilerinde pamuk ekim alanı 542.000 hektar, kütlü üretimi 2.580.000 ton ve lif üretimi 954.000 ton olarak rapor edilmiştir. USDA ve FAO verileri arasında paralellik bulunurken TÜİK ile USDA ve FAO verileri arasında farklılıklar göstermektedir.

Gossypium cinsinde bulunan sadece dört tür dünyanın tekstil lifi, yağ ve küspe ihtiyacının çoğunluğunu karşılamaktadır. Bu türler Asya-Afrika diploidleri (eski dünya pamukları) olan *G. arberoum* ve *G. herbaceum* ile yenedünya tetraploidleri olan *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L.’dir (Iqbal vd 2001). Dünyada yaygın olarak yetiştirilen iki tetraploid pamuk türü bulunmaktadır. Bunlar *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. türleridir. Bu iki tür içerisinde ülkemizde üretimi yapılan pamuklar büyük çoğunlukla *G. hirsutum* L. pamuk türüne ait olmakla birlikte çok az sayıda *G. barbadense* L. introgresyon çeşitlerinde bulunmaktadır. *G. hirsutum* L. verim ve adaptasyon yönünden *G. barbadense*’ye göre daha üstün olması nedeni ile dünya genelinde çiftçiler tarafından tercih edilmektedir. *G. barbadense* L. lif kalitesi yönünden (uzun, sağlam ve ince lifler) daha avantajlıdır. Ancak bu türün düşük verimli ve dar adaptasyon yeteneğine sahip olması nedeni ile ekim alanı sınırlıdır (Karaca 2001).

Araştırcılar *G. barbadense* L. Çeşitleri ile *G. hirsutum* L. eşitlerinin melezenmesi ile bir taraftan yüksek verimli diğer taraftan yüksek lif kalitesi özelliklerine sahip pamuk çeşitlerinin geliştirilmesine yönelmiştir. *Gossypium barbadense* L. türünde bulunan üstün lif özelliklerin aktarılmasına yönelik yapılan çalışmalarda aralarında geilik, düşük verimlilik, küçük koza gibi istenilmeyen özelliklerde aktarılmaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla araştırcılar bütün bir genomun *G. barbadense* L.'den aktarılması yerine *G. barbadense* L.'nin kromozom veya kromozom parçalarının *G. hirsutum* L. eşitlerine transferine yönelmiştir (Stelly vd 2005).

Yapılan ışlah çalışmaları ile *G. hirsutum* L. (TM-1)'e izogenik bir hata *G. barbadense* L. (Pima 3-79)'un bir kromozom çiftini veya bir çift kromozom kolunu taşıyan disomik kromozom substitüsyon hatları (CS-B) geliştirilmiştir. CS-B'lerin geliştirilmesinde kullanılan hat TM-1 hattına izogenik bir hattır (Liu vd 2000).

TM-1 ilk olarak Deltapine 14 çeşidinden seçilmiş ve sayısı 40'ın üzerinde kendilenerik homozigotluğu artırılmıştır. CS-B'lerin geliştirilmesinde donör olarak kullanılan Pima 3-79 (*G. barbadense* L.) ise bir double haploit çeşittir (Stelly vd 2005).

Fenotip tabanlı markırların (belirteçlerin) yetersizliği, çevreden ve gelişme döneminden büyük oranda etkilenmesi ve polimorfizmlerinin (farklılıklarının) tespiti için uzmanlık gerektirmesi gibi dezavantajları nedeniyle araştırcıları moleküler markırlardan olan DNA tabanlı markırların gelişmesine yönlendirmiştir (Ince 2010).

Bir moleküler markır, genom seviyesindeki farklılığı ortaya koyan ve fiziksel olarak DNA üzerinde bulunan özel bir bölge olarak tanımlanabilir (Karaca 2001, Thiel vd 2003). DNA markırlarının tam olarak bir geni göstermesi durumunda ise genik markır olarak adlandırılmaktadır. Doğrudan bir gen üzerinde bulunmayan DNA markırları ise genomik markır olarak adlandırılmaktadır. Moleküler markırlar dokunun gelişim zamanından bağımsız olarak bütün dokularda belirlenebildiği ve stabil olduğu ve evre şartları, gen interaksiyonları (pleotropi, epistasi vb) gibi durumlardan da

etkilenmediği için kullanımı giderek artmış ve yaygınlaşmıştır. Moleküler markırlar bu avantajlarının yanı sıra kolay ve kesin olarak belirlenebildikleri için güvenilirlikleri fenotip tabanlı markırlardan daha fazladır (Agarwal vd 2008, Arif vd 2010, Thiel vd 2003).

Avantajlarından dolayı en çok kullanılan markır tekniklerinden bir tanesi de mikrosatellitlerdir. Mikrosatellit veya SSR (“Simple Sequence Repeats”) DNA dizileri genelde 1 ile 6 nükleotid uzunluğundaki bazların ardışık olarak tekrarlanması ve tekrarlar arasındaki farklılığın ortaya konduğu bir markır sistemidir. Herhangi bir DNA’nın basit tekrarlı olarak isimlendirilebilmesi için önce belirli bir motifin olması ve bu motifin belirli bir sayıda (en az 8-10) tekrar bulunması gerekir. Bu teknik günümüzde oldukça fazla oranda kullanılan bir tekniktir (Ince 2010).

Mikrosatellit tekniğinin çok fazla kullanım alanı bulmasının nedenlerinin başında polimorfizm oranının yüksek olması gelirken tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olması da önemli bir avantajdır. Ko-dominant olması da önemli avantajları arasındadır. Ko-dominant veya diğer bir ifadeyle eşbaskın bir markır sistemi olmasıyla homozigot ve heterozigot bireyler birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Ayrıca bir PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metodu olması az miktarda DNA’ya ihtiyaç duyması, kolay uygulanabilmesini ve ekonomik bir yöntem olmasını da sağlamaktadır (Karaca 2001, Thiel vd 2003, Arif vd 2010).

Mikrosatellit markırları avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajlara sahiptir. En belirgin dezavantajı her bir tür için primer çiftlerinin geliştirilmesinin zorluğudur. Ancak günümüzde özellikle *in silico* yöntemler ve veri tabanlarının kullanımıyla elde edilen mikrosatellit primer çiftleri yakın türler arasında, hatta yakın cinsler arasında da çalışabilmektedir (Ince 2010, Karaca vd 2012).

In silico yöntemlerle elde edilen mikrosatellit markırlarının en belirgin dezavantajı ise düşük polimorfizm içeriğidir. Mikrosatellitlerin *in silico* veri tabanlarından elde edilenlerde ve özellikle monomorfik markırların etkin olarak polimorfizme dönüştürülmesinde kullanılan yöntem ise CAPS-mikrosatellit

yöntemidir. CAPS-mikrosatellit yönteminde özellikle EST tabanlı mikrosatellitlerde siplisin, alternatif siplisin olaylarından dolayı çok büyük ve monomorfik mikrosatellit lokuslarının değişik restriksiyon enzimleri kullanılarak oluşturduğu polimorfizme dayanan bir yöntemdir. Bu sistem genellikle ko-dominant markır üretmektedir. Bu yöntem agaroz jel elektroforez ayırıştırma tekniğine uygundur. Ayrıca PZR ampliconların birleştirilerek analizi (“multimix”) veya çok sayıda primer setinin aynı PZR’de amplikasyonun (“multiplex”) yapılabilirliği bu yöntemin avantajlarından (Ince vd 2009, Ince 2010).

Bu çalışmada genik mikrosatellit, genomik mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit DNA markırları kullanılarak pamuk substitüsyon hatlarının moleküler düzeyde belirlenmesi ve teşhisinin yapılabilirliği amaçlanmıştır. Kromozom substitüsyon hatlarında fiziksel veya genetik bir karışıklığın olup olmadığına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca bu tez kapsamında substitüsyon hatlarının kullanımı ile kromozom lokasyonları belirlenmemiş mikrosatellit markırlarının kromozom konumlarının tespitine yönelik çalışmalarda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan mikrosatellit markırlarının seçiminde Pima 3-79 ve TM-1 çeşitlerinde PZR’de amplicon oluşturmaları, polimorfik sonuç vermeleri ve polimorfizm durumunda en az 10 baz çifti boy farklılığı oluşturan primer çiftlerinin kullanımına özen gösterilmiştir. Mikrosatellit markırlarının amplifikasyonları kullanılan PZR profili, kimyasalların konsantrasyonu ve diğer parametreler Karaca (2001) ve İnce (2010)’a göre gerçekleştirilmiştir. Kromozom spesifik mikrosatellit markırlarına ait primer çiftleri pamuk mikrosatellit veritabanından alınmış olup (Blenda vd 2006) bu primerler ticari olarak sentezletilerek çalışmada kullanılmıştır. Ayrıca Buyyarapu vd (2011) geliştirmiş oldukları genik MGAES, Karaca ve Ince (2011) geliştirmiş oldukları genik MK primer çiftleri de çalışmada kullanılmıştır. Fang vd (2012) ile Gutierrez vd (2009) rapor ettikleri BNL, TMB, CIR ve MUSB primerleri de ticari olarak sentezletilerek çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca CAPS-mikrosatellit yöntemi Ince vd (2010)’a göre gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Genetik stoklardan olan monosomik hatlar bitki ıslahı ve genetik çalışmalarda kullanılabilecek önemli bir kaynaktır. Monosomik hatlar ticari çeşitlerin geliştirilmesi, genlerin kromozom lokasyonlarının belirlenmesi, kromozom haritalarının oluşturulması, linkage çalışmaları ve genetik varyasyonun orjinini daha iyi ortaya koymak ve anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Arbuzova vd 1996). Ayrıca monosomik hatlar substitüsyon (ikame) hatlarının oluşturulması ve bu substitüsyon hatlarının kullanımı ile gen aksiyonlarının örneğin dominant, eklemeli ve interaksiyonların belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Anonim 1968-1980).

Doğada az düzeyde de olsa mayoz düzensizliği ile de bu tür aneuploid hatlar oluşabilmektedir. Monosomik bir hat bir kromozomu eksik gametin normal gametle birleşmesi sonucunda oluşurken aynı gamet popülasyonunda trisomik hat da (adisyon) oluşabilmektedir. Literatür taramalarında buğday, arpa, İngiliz çimi, pamuk, patates, domates ve kolza (*Brassica napus* L.) bitkilerinde monosomik ve nullisomik hatlar geliştirilerek substitüsyon ve adisyon hatları oluşturulduğu rapor edilmektedir (Arbuzova vd 1996).

Farklı lokasyonlarda yetiştirilen tam set substitüsyon hatları yetiştirildiği bölgede adaptasyon sağlayan substitüsyon hattının yabancı kromozomun üzerinde bulunan genler hakkında da bilgi verebilmektedir. Tam set substitüsyon hattı bütün kromozomlar açısından substitüsyon hatlarının bulunmasıdır. Howell vd (1996) tarafından kolza bitkisinde substitüsyon hatlar oluşturularak, bir tam set substitüsyon hattının farklı çevrelerin kolza üzerinde kantitatif üretim özelliklerinin genetik kontrolünü açıklamasında kullanacağını belirtmişlerdir.

Ji ve Chetelat (2003) monosomik domates (*Solanum lycopersicon*) hatları geliştirerek altınçilek (*Solanum lycopersicoides*) bitkisinden kromozom ve kromozom parçaları aktarmış ve rekombinasyon düzeyi yüksek domates substitüsyon hatlarını oluşturmuşlardır.

Monosomik, nullisomik, monotelosomik hatlar kullanılarak substitüsyon hatları geliştirilmektedir. Örneğin substitüsyon hatları hastalıklara dayanıksız bir kültür çeşidine, orijinal genomundan çıkarılmış bir çift kromozomun yerine, yabancı türlerden üzerinde dayanıklılık gen ya da genleri bulunan bir çift kromozom ya da kromozom parçası aktarılmasıyla dayanıklılık özelliği kazandırılabilir (Saha vd 2012a).

Dong vd (2005) yetiştiriciliği yapılan kültür patatesin bazı hastalıklara karşı dayanıklılığını sağlamak için yabancı patates türü olan *Solanum brevidens* bitkisinden bazı kromozomları *Solanum tuberosum* bitkisine aktararak substitüsyon hatlar oluşturmuşlardır.

Monosomik hatlar ve substitüsyon hatları genlerin kromozom lokasyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılabilir (Arbuzova vd 1996, Sanamyan 2000, Saha vd 2012a). Hussein vd (2005) disomik substitüsyon hatlarını kullanarak tetraploid buğdayda olgun bitki yaprak pas hastalığına dayanıklılık geninin kromozom lokasyonunun belirlenmesini sağlamışlardır.

Wang ve Chen (2008) çavdar-buğdayda (*Triticale*) doku bozukluğuna dayanıklı hatlar elde etmek için polenlere X ışını uygulayarak ditelosomik hatlar geliştirmişler ve mayoz süresi boyunca yabancı telosentrik kromozomların sitolojik davranışlarını gözlemlemişlerdir.

Harper vd (2011) tarafından yumak (*Festuca pratensis*) bitkisinden İngiliz çimine (*Lolium perenne*) kromozom ve kromozom kolları aktararak akraba türler arasındaki gen introgresyonu ve hedefledikleri özelliklerin genetik kontrollerini belirlemek için monosomik hatlar oluşturmuşlardır.

İntrogresyonda türlere ve kullanılan bireylere bağlı olarak sitolojik kararsızlık ve zayıf agronomik performansından dolayı yabancı adisyon ve substitüsyon hatları tüm yabancı kromozomları her zaman kabul edilmediği değişik araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Sarr vd 2012, Rooney ve Stelly 1991).

Yapılan çalışmalarda türler arası melezlemede veya türler içi melezlemelerde bütün genomun introgresyonundan daha çok tüm bir kromozom veya bir kromozom parçasını taşıyan genler çok daha faydalı olduğu belirlenmiştir (Zhang vd 2005). Zhang vd (2005) yaptığı çalışmalarda buğday iç çizgi mozaik virüsüne (“Wheat spindle streak mosaic virus, WSSMV”) karşı dayanıklı hatlar elde etmek için buğdaygiller familyasına ait olan *Haynaldia villosa* bitkisinden adisyon hatları elde ederek bazı kromozomları monosomik buğday bitkisine aktarmışlar ve bu şekilde buğday substitüsyon hatlarını elde etmişlerdir. Substitüsyon hatlarında kromozom introgresyonunun gerçekleştiği bitkilerde WSSMV virüsüne karşı olan direncin arttığı tespit edilmiştir.

Pamuk bitkisi dünyada tekstil ve yağ üretimi açısından çok önemli bir bitkidir. Dünya genelinde yetiştiriciliği yapılan pamuk türleri 2’si diploid, 2’si tetraploid olmak üzere toplam 4’dur (Karaca 2001).

Lifi için daha çok yetiştiriciliği yapılan pamuk türü allotetraploid pamuk türü olan *Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L.’dir. Bunlardan bir tanesi lif verimi açısından yüksek ama lif kalitesi açısından orta derecede olan ve dünya genelinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan (Upland) *Gossypium hirsutum*’dur. Diğeri ise lif verimi açısından düşük ama lif kalitesi çok yüksek olan (uzun, sağlam ve ince lifli) ve dünya genelinde sıcak iklimlere daha fazla adapte olmuş olan *Gossypium barbadense* türüdür (Karaca 2001).

Araştırıcılar *Gossypium barbadense*’deki üstün lif kalitesi özelliklerini *Gossypium hirsutum* türüne aktarmak için birçok ışlah çalışmaları yapmışlardır. Ancak yapılan ışlah çalışmalarında *Gossypium barbadense*’de bulunan geilik, düşük verim ve düşük adaptasyon yeteneği gibi istenmeyen özelliklerde aktarılmıştır. Bu durum özellikle genom introgresyonunda ortaya çıkmaktadır. Bütün bir genomun aktarılması yerine kromozom ve kromozom kollarının aktarılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin pamuk kromozom substitüsyon hatlarıyla ilgili daha önce yapılmış çalışmalarda, Stelly vd (2005) *Gossypium hirsutum* türüne *Gossypium barbadense*’den kromozom ve kromozom kolları aktararak *Gossypium barbadense*’nin

kromozomlarını taşıyan substitüsyon hatları oluşturmuşlardır. Günümüzde farklı pamuk türlerinin kromozomlarını taşıyan farklı substitüsyon hatları üzerine çalışmalar bulunmaktadır (S. Saha, kişisel görüşmeler).

Pamuk substitüsyon hatlarının (ikame hatlarının) geliştirilmesinin temel prensibi olarak pamukta sitolojik davranışlar, aktarımlar ve kalıtım esas alınmıştır (Endrizzi vd 1985). Monosomik stoklar kromozom spesifik markırlar geliştirmek ve kromozom lokasyonlarını belirlemek ve kromozom translokasyonlarını belirlemek için kullanılmaktadır (Endrizzi vd 1985, Karaca 2001, Sanamyan 2000, Saha vd 2012b). Örneğin monotelodisomik bitkiler bir kromozom kolunun üzerindeki spesifik markırların belirlenmesinde ve sentromer ile markır lokusu arasındaki uzaklığın belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Saha vd 2012a).

Sanamyan vd (2011) tohumlara termal nötron ışınlaması ile 15, 25, 27 ve 35 Gy dozlarını ve polene Co⁶⁰ elementinden ışınlaması ile 10, 15, 20 ve 25 Gy dozlarını kullanarak standart çeşit olan L-458 *Gossypium hirsutum* pamuk hattından 92 adet monosomik populasyon oluşturmuşlardır.

Saha vd (2012a) *Gossypium*'un diğer tetraploid türleri olan *Gossypium tomentosum* ve *Gossypium mustelinum* türlerine ait kromozom ve kromozom parçalarını monosomik TM-1'e izogenik olan hatlara aktararak bunların substitüsyon hatlarını oluşturmuş ve bu substitüsyon hatlarında lif kalitesi üzerinde araştırmalar yapacaklarını rapor etmişlerdir.

Kromozom substitüsyon hatlarının kullanımı ile genetik çalışmalar daha etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin Wu vd (2005) yeni bir genetik model ve yazılım programı geliştirerek bir kromozom substitüsyon hattındaki yabancı substitüsyon kromozomun genetik etkilerini çalışmışlardır.

McCarty vd (2006) 13 pamuk kromozom substitüsyon hattını, TM-1 ve Pima 3-79'u değerlendirerek bunların çiçeklenmenin başladığı ilk dört haftadaki toplam çiçek sayılarını toplayarak verim üzerindeki etkilerini araştırmışlardır.

Saha vd (2008) pamuk kromozom substitüsyon hatlarından *G. barbadense*'nin 1 nolu kromozomunu, 11 nolu kromozomun kısa kolunu, 12 nolu kromozomun kısa kolunu ve 26 nolu kromozomun uzun kolunu bulunduran kromozom substitüsyon hatlarının TM-1 ile melezleyerek *G. barbadense*'deki kromozom ve kromozom parçalarının agronomik ve lif özelliklerinin genetik etkilerini araştırmışlardır.

Wu vd (2008) pamuk kromozom substitüsyon hatlarındaki kromozom ve kromozom kollarının lif verimi üzerine olan etkilerini araştırarak hangi kromozom veya kromozom kolunun lif verimi üzerine olan etkisinin doğrudan, hangisinin dolaylı ve hangisinin negatif etkisi olduğunu araştırmışlardır.

Wu vd (2009) 14 kromozom substitüsyon hattının boğum sayılarını ve bitki boylarını gözlemleyerek eklemeli dominant genetik etkilerinin çiçek, koza tutumu ve verim üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Wu vd (2010) 13 kromozom substitüsyon hattının eklemeli dominant genetik etkilerinin 8 agronomik özellik ve lif özellikleri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir.

Saha vd (2012a) substitüsyon hatları ile TM-1 hattını melezleyerek CS-RIL popülasyonunu oluşturmuşlardır. CS-RIL popülasyonunu oluşturmalarının nedeni yabancı kromozomların diğer kromozomlarla olan interaksiyonlarını ve epistasiyi araştırmak olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca iki farklı substitüsyon hattı arasındaki melezlemeler de bu türün genetik olayları öğrenmeyi amaçlamışlardır.

Moleküler markırlar kaynağını canlının taşıdığı genetik materyalden aldığından dolayı morfolojik, biyokimyasal, enzim tabanlı ayırım markırları gibi çevresel faktörlerden etkilenmezler. DNA markırları basitliği, ekonomik olması ve doğruluğu (güvenilirliği) nedeni ile fenotip tabanlı markır tekniklerine oranla daha fazla avantaja sahiptir (Agarwal vd. 2008, Ince vd 2011).

Günümüzde oldukça farklı DNA markır teknikleri geliştirilmiş olup bu markırlar değişik amaçlarla kullanılmaktadır. DNA markırları bakteri, fungus, nematod, virüs, bitki ve hayvan cins, tür veya çeşitleri arasındaki farklılığın tespit

edilmesinde, çeşitlerle ebeveynleri arasındaki benzerliklerin belirlenmesinde, önemli hastalık ve zararlıların kromozom üzerindeki konumlarının belirlenmesinde, cinsiyet tayininde, gıda maddelerinin içeriklerinin belirlenmesinde, gıda maddelerinde kullanılan tür ve cinslerin ayırt edilmesinde, genomda bulunan gen veya genlerin fiziksel olarak karakterize edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Ince vd. 2010, Karaca vd 2012).

Günümüzde değişik amaçlarla kullanılan ve sayısı 50'nin üzerinde DNA markır tekniği geliştirilmiştir. Bu tekniklerinden universal primer kullanılan tekniklere örnek olarak RAPD, DAMD verilebilir. Restriksiyon enzim kesimine dayalı tekniklere örnek ise AFLP, CAPS, PCR-RFLP, SCAR teknikleridir. Spesifik primer çiftleri kullanılan tekniklerden bazıları ise SSR ("Microsatellite"), ISSR, CAPS-mikrosatellit, TRAP, SSCP, SNP gibi tekniklerdir (İnce vd 2011).

Li vd (2012) *Gossypium barbadense* türüne ait "Emian22" ve Pima 3-79 arasında monomorfik ampikon oluşturan 4194 SSR primerlerini SSCP markır tekniği kullanarak bunlardan 158 lokusun polimorfik olduğunu saptamışlardır. Rana vd (2007) ticari olarak yetiştiriciliği yapılan 8 tane pamuk çeşidi arasında genetik farklılığı belirlemek için RAPD, ISSR ve STMS markır tekniklerini kullanmışlardır. Zang vd (2012) sitoplazmik er kısırlığı belirlemek için RFLP, SCAR ve SSR markır tekniklerini kullanmışlardır.

SSR markırları bitki genetiğinde ve ıslahında en çok kullanılan markır tekniklerinden bir tanesidir. Pamukta bazı çeşitlerde kromozom spesifik DNA markırları geliştirilmiş olup bu markırlar linkaj gruplarının, monosomik ve monotelodisomik hatların belirlenmesinde ve genetik analizlerde kullanılmaktadır (Liu vd 2000, Karaca vd 2002, Guo vd 2008).

Karaca ve Ince (2011) pamuk bitkisi için genik özellikte 173 SSR primeri oluşturmuşlar ve bu primerlerin *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. arasında agaroz jel elektroforez yöntemini kullanarak polimorfik ampikonlar oluşturan lokusları saptamışlardır.

DNA markırlarının pamuk bitkisinde moleküler filogeni, markır destekli seleksiyon, kantitatif özellik lokusların (“QTL”) tespiti, er kısırlığın tespiti, genetiği değiştirilmiş (GDO) pamuk çeşitlerinin tespiti, monosomik hatların tespiti, geriye melezleme sayısının tespiti gibi değişik amaçlarla kullanımı yaygın olmasına rağmen kromozom substitüsyon hatlarının tespitinde yaygın kullanımı bulunmamaktadır (Liu vd 2000, Karaca 2001, Karaca vd 2002, Guo vd 2008, Karaca ve Ince 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada Prof. Dr. Sukumar Saha (USDA/MSU, USA) tarafından sağlanan ve ilk olarak Stelly vd (2005) tarafından geliştirilmiş olan 17 adet disomik başka “alien” kromozom substitüsyon (CS-B) hattı kullanılmıştır. Bu genetik stoklar *G. barbadense* Pima 3-79’a (double haploid) ait 17 kromozom veya kromozom kolu, TM-1’e (*G. hirsutum* L. Texas Marker 1) yaklaşık izogenik hat olan bir hatta aktarılmasıyla elde edilmiştir (Stelly vd 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. CS-B hatları Pima 3-79 kromozom ve kromozom kolu dışındaki diğer genetik unsurlar açısından birbirlerine ve TM-1 standardına yakın izogenik genetik temele sahiptir (Stelly vd 2005). Diğer bir ifadeyle genetik açıdan her bir CS-B hattı kendi aralarında ve TM-1 arasında yaklaşık %96’lık bir oranda benzerdir. Her bir hattın 1000 ila 3000 Pima 3-79’a ait geni taşıdığı tahmin edilmektedir (Stelly vd 2005).

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme Alanlarında 2007 yetiştirme döneminde yetiştirilen hatlardan yaprak örnekleri alınmış ve ayrıca 2011 yetiştirme döneminde elde edilmiş tohumların 2012 yılındaki ekimlerinden toplanan yaprak örnekleri de çalışmada kullanılmıştır.

2007 yılında 5-6 bitkiden toplu (bulk) olarak alınan örnekler Set-1 örnekleri ve 2012 yılında ise teksel olarak toplanan örnekler Set-2 ve Set-3 olarak adlandırılmış ve toplanmıştır. Substitüsyon hatları için 17, *Gossypium barbadense* L.’yi temsilen Pima 3-79 ve *Gossypium hirsutum*’u temsilen de TM-1 hattı olmak üzere bu çalışmada toplam 19 hat kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan substitüsyon hatlarının kromozomsal farklılıkları görsel olarak Şekil 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan genetik materyallerdeki kromozom substitüsyon hatları, alıcı *G. hirsutum* L. Texas Marker-1 izogenik hat ve verici (*G. barbadense* L. Pima 3-79) hatta ait kromozom farklılıklarının gösterilmesi



Şekil 3.1'in Devamı

3.2. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada bulk ve teksele olarak alınmış 17 kromozom substitüsyon, Pima 3-79 ve TM-1 hatlarına ait yapraklardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon için 1 gr doku örneği kullanılmış ve ekstraksiyon işlemleri aşağıda özetlendiği şekilde bazı modifikasyonlar yapılarak Karaca vd (2005)'e göre gerçekleştirilmiştir.

- 1) 1 gr ezilmiş doku üzerine 6 mL ekstraksiyon bufferı [EB; 0.35 M sorbitol, 100 mM TRIS-HCl (pH: 7.5), 5 mM EDTA (pH: 7.5), %2 Tween, %1 Triton-X, %1 BME] eklenip iyice karıştırıldıktan sonra 10000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 2) Santrifüjden sonra üst fazı dökülmüş olan tüplerdeki pellet üzerine 2 mL lezyon bufferı [LB; 200 mM TRIS-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA (pH: 8.0), 2 M NaCl, %2 PPVP, %2 CTAB, %2 Triton-X, %2 BME] eklenerek pelletin çözülmesi sağlanmıştır.
- 3) LB ile çözülmüş olan pellet üzerine 2 mL 8 M'lık LiCl [Lityum klorür] eklenerek karışımın sağlanması için tüpler güçlü bir şekilde vortekslenmiştir.
- 4) Vortekslenmiş tüplerin üzerine 1 mL % 5 SLS (Sodyum lauil sarkosil) eklenerek karışım vorteks yardımıyla sağlandıktan sonra 65 °C su banyosunda 40 dk bekletilmiştir (her 10 dk'da bir 30 sn vortekslenmiştir).
- 5) Su banyosundan alınan örnekler buz üzerinde soğutulmuş ve her bir tüpe 5 mL Kloroform/izoamil alkol [CIS; 24/1 oranında] eklenip tüpler ters-düz edilerek karıştırılmış ve 10000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 6) Santrifüjden sonra 3 faz oluşmuştur. En üst faz (süpernatant) yaklaşık 4.5 mL kadar alınarak steril bir tüpe alınmış ve alınan hacim kadar üzerine CIS eklenerek tüpler ters-düz edilerek iyice karıştırılmış ve 10000 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

- 7) Santrifüj edilen tüplerden tekrar süpernatant dikkatlice steril bir tüpe alınmıştır. Alınan süpernatantın hacmi kadar izoproponal ve final hacmin 1/20 si kadar 5 M NaCl eklenip tüpler ters-düz edilerek karıştırılmıştır.
- 8) Karıştırılan tüpler 18-20 saat -20 °C'de bekletilmiştir. -20 °C'de 18-20 saat bekletilen tüpler 10000 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 9) Santrifüj edilen tüplerdeki üst faz dikkatli bir şekilde dökülmüş ve kalan pellet üzerine daha önce 65 °C su banyosunda bekletilen TE'den (pH: 7.5) 490 µL eklenerek pellet çözüldükten sonra 10 µL (10 µg) RNaz eklenip 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Bu aşama ile nükleik asitlerden RNA parçalanarak DNA ile birlikte izole edilmesi önlenmiştir.
- 10) 37 °C'de 30 dk bekletilen tüplerin her birine 50 µL 3 M'lık NaOAc [Sodyum asetat; pH: 5.2] eklenip bunun üzerine 3 katı kadar % 100 ethanol eklenmiştir ve tüpler 10000 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 11) Santrifüj edilen tüplerdeki üst faz dikkatlice dökülerek kalan pellet üzerine 65 °C su banyosunda bekletilen TE'den (pH: 8.0) 400 µL eklenerek pellet çözülmüş ve tüpler spinlenerek pipet yardımı ile nükleik asit çözeltisi 2 mL'lik tüplere aktarılmıştır.
- 12) 2 mL'lik her bir tüpün üzerine 40 µL 2 M'lık KOAc [Potasyum asetat; pH: 5.5] eklenip bunun üzerine 1320 µL % 100 ethanol eklenmiştir ve 10000 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerdeki ethanol iyice uzaklaştırılarak pellet 200 µL TE'de (pH: 8.0) çözülmüştür. Ekstraksiyonu tamamlanmış ve saflaştırılmış olan DNA'nın miktar ve kalitesi yaygın olarak kullanılan iki yöntem olan spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler ile belirlenmiştir. DNA'nın uzun süreli muhafazası için -20 °C'de saklanmıştır.

3.3. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

3.3.1. Spektrofotometre yöntemi

Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın kalite ve miktarının belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemde 25 kat seyreltilmiş olan DNA'nın analizinde absorbans 200 nm ile 300 nm arasında tarama yapılmış ve A_{230} , A_{260} ve A_{280} değerleri üzerinde DNA konsantrasyonu, protein ve polisakkaritlerin varlığı, kimyasal kalıntı olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır (İnce 2010).

3.3.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi

Agaroz jel elektroforez yöntemiyle RNA kontaminasyonu, polisakkarit varlığı ve yüksek moleküler ağırlıktaki DNA'nın varlığı araştırılmıştır. Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın kalitesini TRIS-Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmesi için %1'lik agaroz jel, 1X TBE çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır.

Jel içerisinde 0,5 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 10 mg/mL stoktan etidium bromit ilave edilmiştir. DNA örnekleri 700 ng hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde 6X DNA yükleme çözeltisi ile karıştırılmıştır. DNA örnekleri jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 1X TBE çözeltisi kullanılarak 5V/cm uygulanmış ve 120 dakika süre ile yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra DNA-etidium bromit ultra viole (UV) aracılığıyla görüntülenmiş ve jel görüntüsü UVpro programı ile bilgisayar ortamında kaydedilmiştir (İnce 2010).

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

3.4.1. PZR bileşenleri

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan enzim ve kimyasallar moleküler biyoloji grade olup Vivantis firmasından temin edilmiştir. PZR işlemlerinde GeneAmp System 9700 marka Termal Döngü Cihazından yararlanılmıştır. Termal döngü cihazı "RAMP" % 100 olarak kullanılmıştır.

PZR işlemleri hacmi 25 µL'ye ayarlanmış ve içerisinde 85 nanogram toplam genomik DNA, 0,5 µM kullanılan primer çifti, 12 mM Tris-HCl (pH: 9.1), 60 mM KCl, %0.012 Triton X-100, 0.28 mM her bir dNTP, 3 mM MgCl₂ ve 1 ünite *Taq* DNA polimeraz (Vivantis) içeren solüsyonda gerçekleştirilmiştir.

PZR işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve miktarlar Çizelge 3.1'de verilmiştir. PZR işlemlerinde hatayı ve pipet sayısını azaltmak amacıyla master karışımlar hazırlanmış ve bu karışımlar çoklu pipet yardımıyla sekizli 0,2 mL PZR tüplerine transfer edilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR'de kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar	Stok	Miktar	Final
Genomik DNA		8.5 µl	85 ng
Steril-H ₂ O		5.25 µl	
İleri Primer ("Forward")	20 µM	0.625 µl	0.5 µM
Geri Primer ("Reverse")	20 µM	0.625 µl	0.5 µM
Steril-H ₂ O		4.6 µl	
10X Reaksiyon Çözeltisi	TRIS-HCl (pH 9.1)	100 mM	3 µl
	KCl	500 mM	
	Triton X-100	%0.1	
MgCl ₂	50 mM	1.5 µl	3 mM
dNTP	10 mM	0.7 µl	0.28 mM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	5 ünite/ µl	0.2 µl	1 ünite
Toplam Hacim		25 µl	

3.4.2. PZR profilleri

Mikrosatellit (SSR) ve CAPS-mikrosatellit lokuslarının çoğaltımında 2 farklı PZR profili kullanılmıştır. Bu PZR profilleri Profil A (Çizelge 3.2) ve Profil B (Çizelge 3.3) olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Amplifikasyon Profili A

PZR Profili	Zaman	Döngü Sayısı	Aşama	
Hot Start	94°C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	30 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	60°C→55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4°C	1 saat		

Çizelge 3.3. Amplifikasyon Profili B

PZR Profili		Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94°C	4 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	66°C→61°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	30 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	4°C	1 saat		

Profil A ve B için sıcaklığı 60 °C ve 66 °C olmak üzere 2 farklı renatürasyon sıcaklığı uygulanarak her primer seti için renatürasyon sıcaklıkları optimize edilmiştir. Mikrosatellit lokuslarının çoğaltımı için bütün PZR profillerinde spesifik olmayan amplifikasyonların oluşumunu önlemek amacı ile indirgemeli PZR (“touch-down PCR”) profili kullanılmıştır. Bu yöntemle başlangıçtaki 10 döngüde asıl reaksiyonun devam ettiği renatürasyon sıcaklığından en az 5 °C yüksek sıcaklıkla primer çiftinin çoğaltılan DNA sarmallarına bağlanması sağlandıktan sonra her döngü başına renatürasyon sıcaklığı 0,5 °C düşürülmüştür. İndirgemeli PZR profilleri uygulamaları ile PZR çalışmalarında spesifik olmayan bölgelerin amplifikasyonları önlenmeye çalışılmıştır (İnce 2010).

3.4.3. CAPS-mikrosatellit analizi

CAPS-mikrosatellit DNA markır tekniği konvansiyonel mikrosatellit tekniğine benzemekle birlikte polimorfizmin ortaya çıkarması yönünden RFLP ve SNP tekniklerinin bileşimine sahiptir. CAPS-mikrosatellit yöntemi EST tabanlı markırların elde edilmesinde kullanılabildiği gibi genomik markırlarında elde edilmesinde de kullanılabilmek özelliğine sahiptir.

CAPS-mikrosatellit çalışmalarında B profilinde (Çizelge 3.3) amplifikasyon sonucu TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında yüksek moleküler ağırlığına sahip ancak monomorfik markır üreten primer çiftleri kullanılmıştır. Monomorfik PZR ürünleri (amplifikasyonlar) Çizelge 3.4’te adları verilen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile spesifik olarak kesilmiştir.

Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin seçilirken başta tanıma bölgeleri, çalışma sıcaklıkları ve reaksiyonlarda kullanılan solüsyonlar yanında daha önceki çalışmalarda pamuk genomik DNA bölgelerini tanıma ve kesmiş olmalarına bakılmıştır.

Çizelge 3.4'te görüldüğü üzere toplam 16 restriksiyon enzimi kullanılmış ve bunlardan dört adedi küt uç kesimi, geri kalan 12 adedi ise yapışkan uç kesimi yapmaktadır. Tanıma bölgeleri dördü, altı ve sekizli nükleotid uzunluktadır.

Çizelge 3.4. CAPS-mikrosatellit analizlerinde kullanılan restriksiyon enzimlerin tanıma bölgeleri ve çalışma sıcaklıkları

	Enzim adı	Tanıma Bölgesi	Çalışma sıcaklığı	Ticari Kaynağı
1	<i>Hinf</i> I	5'...G [▼] ANTC...3' 3'...CTNA [▲] G...5'	37 °C	Bioron
2	<i>Cla</i> I	5'...AT [▼] CGAT...3' 3'...TAGC [▲] TA...5'	37 °C	Fermentas
3	<i>Rsa</i> I	5'...GT [▼] AC...3' 3'...CA [▲] TG...5'	37 °C	Fermentas
4	<i>EcoR</i> V	5'...GAT [▼] ATC...3' 3'...CTA [▲] TA G...5'	37 °C	Fermentas
5	<i>Hae</i> III	5'...GG [▼] CC...3' 3'...CC [▲] GG...5'	37 °C	Fermentas
6	<i>Hind</i> III	5'...A [▼] AGCTT...3' 3'...TTCGA [▲] A...5'	37 °C	Fermentas
7	<i>EcoR</i> I	5'... [▼] CCWGG...3' 3'...GGWCC [▲] ...5'	37 °C	Fermentas
8	<i>Aat</i> II	5'...GACGT [▼] C...3' 3'...C [▲] TGCAG...5'	37 °C	Fermentas
9	<i>Vsp</i> I	5'...AT [▼] TAAT...3' 3'...TAAT [▲] TA...5'	37 °C	Fermentas
10	<i>Hpa</i> II	5'...C [▼] CGG...3' 3'...GGC [▲] C...5'	37 °C	Fermentas
11	<i>BamH</i> I	5'...G [▼] GATCC...3' 3'...CCTAG [▲] G...5'	37 °C	Fermentas
12	<i>Hin6</i> I	5'...G [▼] CGC...3' 3'...CGC [▲] G...5'	37 °C	Fermentas
13	<i>Taq</i> I	5'...T [▼] CGA...3' 3'...AGC [▲] T...5'	65 °C	Fermentas
14	<i>Dra</i> I	5'...TTT [▼] AAA...3' 3'...AAA [▲] TTT...5'	37 °C	Fermentas
15	<i>Not</i> I	5'...GC [▼] GGCCGC...3' 3'...CGCCGG [▲] CG...5'	37 °C	Fermentas
16	<i>Nco</i> I	5'...C [▼] CATGG...3' 3'...GGTAC [▲] C...5'	37 °C	Fermentas

3.4.4. Primer çiftleri

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer çiftlerinin isimleri, sekans bilgileri ve mikrosatellit motifleri Çizelge 3.5, 3.6 ve 3.7’de verilmiştir. Çalışmada kullanılmış olan primer çiftlerinin DNA dizi bilgilerinin bir kısmı pamuk mikrosatellit veri tabanından ve bir kısmı da ilgili literatür kaynaklarından temin edilmiştir.

Buyyrapu vd (2011)’nin geliştirmiş oldukları MGAES primer çiftleri ve Karaca ve Ince (2011) tarafından geliştirilen MK primer çiftleri EST tabanlı mikrosatellit primer çiftleri olup genomun ifade edilen kısımlarına özgü markırlar üretmektedir (Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6).

Fang vd (2012) ve Gutierrez vd (2009) tarafından rapor edilen BNL, TMB, CIR ve MUSB primer çiftleri ise genomun ifade edilen ve ifade edilmeyen kısımlarını temsil etmektedir (Çizelge 3.7). bu primer çiftleri genomik lokuslar olarak adlandırılmıştır.

Çalışmada kullanılan toplam primer çifti sayısı 225 olup bu primer çiftlerinden 11 adedi farklı restriksiyon enzimleri ile de denenmiştir. Bu durum çalışmada kullanılan markır sayısının en az 300 olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan allel sayısı ise 600 civarındadır.

Çizelge 3.5. Genik MGAES mikrosatellit primer çiftlerinin sekans dizilimleri ve motifleri

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MGAES-10	F:CTGGTGATGAGGGGAGTA R:GCAAAGCAAAGCAAACCTTGA	[GTAAT] ₂
MGAES-106	F:CAGTTCCTGGGGAAGAAGGA R:CGAAACCGACATACTCAACAA	[GTT] ₅
MGAES-153	F:CATCCATTTGGTCTATCAAACA R:CAGCGTTTGAAGTCACAT	[CT] ₁₂
MGAES-64	F:CCGATTCCCAAACCTTCTT R:CAAGCCCTGAAACCATTCT	[CAAAT] ₄
MGAES-78	F:GTTTGACCGCAAACCTGACA R:GGCGGATAATTGGTGCTTAAT	[AAAAT] ₂
MGAES-83	F:TGACGATCGAGAACACCTT R:CGTCGTCATCACTGTCGCTCT	[GAA] ₃

Çizelge 3.6. Genik MK mikrosatellit primer çiftlerinin sekans dizilimleri ve motifleri

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK001	F:AGAGGGGGCACAGAGAAAAC R:CCGAGTGAACAGGCAAATCT	[TC] ₁₅
MK002	F:CCTCTCGCTTCCCTTATCTG R:GTTGCGGCTATCTCCATCTC	[GA] ₁₈
MK003	F:ATCTCTTCCACCCCTTCCAC R:ATCCACCCCATTTGTTCTTT	[TC] ₂₄
MK004	F:TCACCGCAGAAAACCACTC R:TGTGTCAAGTCATAGCCGTTG	[ATG] ₁₂
MK005	F:GCTCACACAGATGGAGTTTGT R:AGCCACCAGGGGTATGTTT	[AAT] ₁₁
MK006	F:CAGAGGCAGAAAAGCAAACC R:AGGGAGTAGGCAAAGAAATCG	[TGA] ₁₀
MK007	F:TTCTCCCTTTCAGCGTTTAGG R:AAGCAACACCAACACACCAA	[ATT] ₁₃
MK008	F:AAGTGGTGGAGGAGGAGGAG R:CCTTGGCTGGTGGTTTTG	[GGT] ₆
MK009	F:GTGGAGAAGTGCATGAGG R:CTCGGTTTGGGAGTGGTAAC	[CACC] ₄
MK010	F:CGTCTGTGCTCCATTAGG R:CCCTTCTCCCGTGGTTTA	[ATAC] ₄
MK011	F:CCTCCTCGTTTCTTCACTGC R:CTTGTTCATTTACCCAAAG	[TCT] ₁₂
MK012	F:ACCCTTTCGTTCCCTTCATC R:TGTTATGGGCGTTTGAGGTT	[CA] ₁₅
MK013	F:ACGCTGAAATCCAAAACGAC R:AAGGCAGAACGAAGGTTGC	[TATG] ₁₅
MK014	F:ACAGTCAAGGGGGATGTCAA R:GCTCATAGGTGGGTTTTTGC	[AT] ₁₈
MK015	F:TTTGTTCCTTTGCTTGGA R:GGTGCCTGGTTCTTGTGTCT	[AT] ₁₅
MK016	F:CCGCACACACTTCTCTCTCTC R:CTACGACTTGCTCCGTGGTT	[AC] ₁₅
MK017	F:GCCCTTCAATCCATCATTCA R:CCTTCTCCGCCTCAACAG	[ATC] ₁₅
MK018	F:CCACTACAAAGGGACAAGG R:CAAACCAACACCAATACACCA	[ATT] ₁₉
MK019	F:CACCTCTCCACCCATCTCC R:CCTCCCATTGTTTTCTTT	[AAAG] ₉
MK020	F:ACCAGTTTCCCAGTTGTTGTTT R:TGTCTCCCCTGCTCTGTTTT	[AT] ₂₀
MK021	F:CCATTTTTCTGCCACTACCC R:TGCCAATCCCCTATTTCTTG	[AAG] ₁₂
MK022	F:GCTGGTTGAAGGAAATGCTG R:GACTTGCTCTGGTCTGCTTTG	[GAGCGG] ₅
MK023	F:CCTTCCCATTCTCTTTCTCC R:GCCTTTTGTCCCTGGTTTTA	[AGAGA] ₆
MK024	F:TTCCACAGGCATCAAATCAA R:TTTTCCAGCAATCCGAGAAC	[ATGTAT] ₁₁
MK025	F:TCCGCATTTCTTTCTTTCTC R:GGAGGCAATCTAAGCACACC	[TTCTTG] ₅
MK026	F:TTACAAACACATCCATCACACG R:TGCGTCTCCCTTCCATTT	[TA] ₁₆
MK027	F:TCCATCTCATCCTGCTCTCC R:GTTACGCTCCCACTTTCAG	[CTCATT] ₆
MK028	F:GAACATACGAACGAACGAAACA R:GCAGGTGGAGAACTGGGTTA	[AT] ₁₆

Çizelge 3.6'nın Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK029	F:GATGGAAAGGGCAGTGTTCAT R:GGGTTTTACGGTGGCATTAG	[TA] ₁₉
MK030	F:GCAGGAGAACTGATGGAAAAA R:GATGGTGAAAGGATGGAAAGC	[TCA] ₁₁
MK031	F:AAAACCCCTTGTTCAGTGG R:GGCGATGATGGAAGAAGAAG	[TCT] ₁₁
MK032	F:CAAACCAACACCAATACACCA R:CCACTACCAAAGGGACAAGG	[AAT] ₁₉
MK033	F:CCACCCTGATTACTGAACAATG R:GCAAGAGATGAAAATGCCAAC	[AT] ₁₅
MK034	F:ATCCTCGGCATCTTCTCAAG R:TGCTGTCTTTTCCCTTATCACA	[AT] ₁₆
MK035	F:GGCGACCTACCTTCCACTC R:GCTTGATTTATTGGGGGATG	[CAC] ₁₁
MK036	F:CTCTTTGGGCTAACGGACAT R:TTTCAACCCCTGGAAGGAC	[AT] ₁₈
MK037	F:CTTGGAAAAAGGAAGAGCAGAA R:TTGGCTGGAAGTGATGAAGA	[ATAC] ₁₂
MK038	F:AGAAGAAAGAAAGGAAACCCTACG R:GGCTTGGAGCAAACACAGAC	[CATA] ₁₈
MK039	F:TTGGGGTGTGACTTTGGTT R:GAGGGCAAGCGTTCTCATC	[ATGCCC] ₆
MK040	F:TACGCAAAAACCACTCCAACA R:CCAGAAAAGTAGCGGGATGA	[TAG] ₁₀
MK041	F:TTTCGATTTCTATTCTCCTCCT R:CCCCTCTCTCTCCCTCTC	[CTT] ₁₂
MK042	F:TAAGACGATGCGAGGGTCA R:GCTTGGGAGAGTCAGAAGGAG	[ATGTGA] ₆
MK043	F:AACAGGGTTTGGAGCAGTGA R:GTTGACCGCAAGATGGAGAT	[TGGTGA] ₇
MK044	F:CACTTGGGGATTGGTTCAA R:CTGCTGTTGTTGGGTCTGAG	[GAA] ₁₀
MK045	F:ATCAGCGAAGGTAGCCAATG R:CAGCCACACCGTATTCTGG	[TATAT] ₆
MK046	F:GTGTTCCATTTCTCCAAGG R:AGGGCAGTCATAAGTTGAGGTC	[TCA] ₁₁
MK047	F:GGTGTTCATCGTCTCCATTTG R:AGCAGCGTTTCTTCTTTCT	[GAA] ₇
MK048	F:TTTGGGCTTTCTTTCTCTCTC R:AGACTTTGTGCCCCGCTCA	[CT] ₁₇
MK049	F:GTGTGTGTGCCCTGTGAGAT R:CACTGCCCTAAGAAGTTGC	[AG] ₂₁
MK050	F:CGTCCGCTTCAATCTGTTTT R:GGTTCCTGGCTGGTCTTCTT	[CCAAC] ₆
MK051	F:CCTGATACACCCCGCAATAG R:CGTCAAAAAGGAAGGAGCAA	[TGCTCC] ₅
MK052	F:ACTAAAAGGTTCTCCACGGTA R:TGATGTTGGCTTCAGAGGTG	[ATA] ₁₄
MK053	F:CTCACCGTTACTCGCCTTG R:CGGATTTTCCAACCCTGTT	[CAT] ₁₃
MK054	F:GCTGACACGAAAGCACTCC R:CGCCTTGGAAACTCTACCC	[GAT] ₁₃
MK055	F:CGACCACACCCCTAAAGTAACA R:TCTTCCTCAGCACTCCAAGG	[AG] ₁₉
MK056	F:GGGAAGAAGAGGAAGCAAGG R:TAAGTTCCGGGTTCCGGTTG	[ATG] ₁₀

Çizelge 3.6'nin Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK057	F:TAAGTTCGGGTTTCGGTTGG R:CACTGGGAGAAGAGGAAGCA	[TCA] ₁₀
MK058	F:CCCCCTCAACCAAATGTAAA R:TCCTACTGTTTTCCCATAGC	[ACATAG] ₆
MK059	F:TGATGATGTTGGGTCTTTTGG R:GAAGGAGATGGGGAAGTGGT	[ACCCCA] ₈
MK060	F:GGGTGAGGGGGTAAGACAAT R:AGAAGAAAGAAGCACAGATGACG	[CTG] ₁₀
MK061	F:CTCCATCTCTGCCCTCAA R:CGAACTCAGGCTCAAACCAG	[CCTCTT] ₅
MK062	F:GGCTTCTTTCTTGCTGCTGT R:GTTTCATCCCAGACCCAATC	[TCT] ₁₆
MK063	F:TCGCTAACTCCATTTCTACTTTCC R:CTCTCAAACCACCCCAAGA	[CT] ₁₇
MK064	F:TCAGACCAAACCTTCCTTTC R:GCCAGTTGATTCCCTCTTGA	[CAGCAC] ₅
MK065	F:CCCCACTCACTCCCTCTTC R:GCAGGTCCGTAGCAGTTGA	[CCACCG] ₆
MK066	F:GCAGTAGCCGATGGTGATG R:CGATGCTTTCTCCTTTGTCTC	[CAGCAA] ₆
MK067	F:AGAAAAACAGCGCAACAAC R:CTTCGTCGTCCTCGTCATCT	[GAG] ₁₁
MK068	F:TAGATTTGTTGCGGGTGCT R:TCTTCCTCTTCGCCTCCAT	[GA] ₂₄
MK069	F:GATTGGGGCATTCAAGGAG R:CGCTGGAGGAGGGTGTAAC	[ACCCCA] ₅
MK070	F:GAGACGGTGGTGATGATGG R:CCTTGTCAGTGTCCGAGTTG	[AAG] ₁₆
MK071	F:CTGGAAGGAGCAGACACAGAG R:TGAATCCCAAAGCACGGTAT	[GA] ₂₁
MK072	F:CCTTCAAATCCCTTCGTCCT R:GCCGACATTGCCTTCTTTT	[CCGCCA] ₅
MK073	F:GAGAGCAAAAGCACGAGACC R:CAGGGGTGACATAGGGTTCA	[TCAGGC] ₅
MK074	F:CCTTCCACTACTCCTCCCCTTA R:GATTGAACCTGCGGCTGA	[CAACGC] ₅
MK075	F:CCCCTTTTGCCTTTATTGCT R:CACACACCACCTCCTTCTTT	[TC] ₁₅
MK076	F:CAAGCACCAACAGCACCA R:AGAAGGAGATGGGGAAGTGG	[CCCCAA] ₆
MK077	F:TCAACACCCCATCCACTATG R:TCACACACGAAGTAAATCTCAGC	[TTA] ₁₁
MK078	F:GGAGAGTGGGAAAAGAGCAG R:AGAGAAAGGAGCGGACCAG	[GAT] ₁₁
MK079	F:CCTGAAACCCAAAATGGTTATG R:CAGGGGTGACATAGGGTTCA	[TCAGGC] ₅
MK080	F:CCTATAACAGCATCCCCGAAT R:AGTATCGCTCATGCCTTGCT	[CAT] ₉
MK081	F:CAGGTCTAAGATGTACCACAAGC R:GAAAACTCTCTTCCCATA	[CAG] ₈
MK082	F:GAGACCTTCGTTCCCCAGAC R:TTCGGGGATGCTGTTATAGG	[CAT] ₁₃
MK083	F:GTCCACTAAGCAGCAAACTTG R:TCCATTCTCCAAGTACCTAGTATCG	[TCAGGC] ₇
MK084	F:TTGCAGCCCTTCTAGTCCTC R:GGGTCAAAGGAAGTGAAACC	[CCA] ₅

Çizelge 3.6'nın Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK085	F:CAAACCTCCCATCATCAGCAA R:TCTTCTGCTGGTGCAATGAC	[CAG] ₁₂
MK086	F:CCACCAGTTTGGTAGGTATGAAC R:TCAACAGTGCAAGGACTTCATC	[CAT] ₈
MK087	F:TGAAATCCCAGAGCTTTTTCTC R:TGTTCTCATCGACCAATCCA	[CT] ₁₅
MK088	F:TTTCTTTGGTGGTGAAACTGG R:AGACCTTCGTTCCCCAGAC	[CT] ₁₄
MK089	F:CAATGTCCATCGCCACCT R:GGGCGGAGAAGGTTAAAAAC	[CCA] ₇
MK090	F:CCTCCGAGGATTATGTTGGA R:CGAATTCACAAATCCTTCACC	[GTTT] ₆
MK091	F:AGTCAGGCTCAGGCTCAGG R:GCCTTGCTTCTCGCCATT	[TCAGGC] ₅
MK092	F:GCAATCACATTGATGCCAAC R:CTCACTCGGTAAAGCTTCCAG	[ACAT] ₁₀
MK093	F:CCCCACATAAACCTCCTA R:TTGAGGGATGAAGGAGTTGC	[AC] ₆
MK094	F:GGGATTGGACACACAGCATC R:TTCTGCTCTTCCTTTTCCAA	[ATAC] ₈
MK095	F:AAACTGCAAACCCACACTC R:GGAGAGGCTATTCAGGGAGA	[CTT] ₅
MK096	F:CAGCTGGCCTTCTCCGTA R:AGGAGAAAGGGTCTCCGATG	[CATA] ₅
MK097	F:TCGTGGGGAAGTACAGTGTG R:GGAGGCGTTTCAAATGAGAG	[GAAGGA] ₄
MK098	F:TCACAAGAGGCTTTCAATGCT R:TTACACCTCCAGGCATCAAA	[ATTT] ₅
MK099	F:AGATTTGGGAATTAGCCAATTAGA R:GCTTCCAAAATTGAGAAAGCTC	[AC] ₁₁
MK100	F:GACTCTTGGACTGAATATTGACAT R:GAGTCACAAAAGCCCAAATT	[TAAA] ₉
MK101	F:TCATCATCATCCTCGTCTTGA R:TTATGGCCCAATCCTCTCAC	[CAT] ₁₅
MK102	F:CATCCCCACCCACATCTC R:TCCACTTGATGGGGTAGGAC	[ACCCCA] ₈
MK103	F:TGGGGAAGGACAAGCATAAG R:ACCAGGATAGCCAGATGGTG	[GT] ₁₃
MK104	F:GTTTTGGATTGGGAAGGTCA R:TCACACTCTGTCTGGCTCTT	[AGCG] ₅
MK105	F:CAAAGATGCCGAAAGAGAGG R:GTAAGATCGGCGGGTCATC	[CCG] ₁₂
MK106	F:CACAAACGCTGTCACTACGAA R:CGGGCAAGTTTAGGTCAAAG	[CAC] ₁₄
MK107	F:AAGAAAGGCAAGCGTTCAAA R:CGATGGTCATCGTTTCCAC	[CTTCCG] ₁₂
MK108	F:GGCCGAGTTCAGATACAACAA R:GCTGTTGGGAAGGATATACAGG	[CAG] ₁₉
MK109	F:TCCGATCCCCCTTTCTAAC R:CTGGAACCTCGCCACCATAAT	[CTT] ₁₀
MK110	F:ATGGGGGAGGAAGAGAAAAA R:CGACGAACTTTACGAGCACA	[CAA] ₁₂
MK111	F:ACGTGGACGAAGAACAGCA R:GTGATTCTCGACCGCTTTTT	[AGG] ₁₀
MK112	F:TGGAAGCTTCTCTTCTTTTGA R:GCTTACTCAATCAAACAAATCCAA	[ATTTT] ₄

Çizelge 3.6'nın Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK113	F:ACGGATTTTCCAACCCTGTT R:CCTGACCTTGAATGGTGGTT	[ATC] ₁₂
MK114	F:ATGGTCATTCCGATGCTGTT R:CCAATGGTCCCTACATGACC	[CTG] ₅
MK115	F:CCCAGTTTCTCTATTCTCAGG R:TCCGCGAAGCTTCAACTAAC	[CAT] ₁₁
MK116	F:CTCGGGAAATCAATTCGTTG R:ACAAATTCCTTAAAGCAAACC	[CAA] ₁₁
MK117	F:ACTCCAAAAACCCCTCAAC R:GGCGACTGCAAAGGAAATAC	[CAA] ₇
MK118	F:TGGTAGGTAGAGCTTGTGGTTG R:GGTTCAAGGTTTGGATTCTTG	[CT] ₁₄ [GT] ₁₁
MK119	F:CCCCGACTCGCTATTACTCA R:GGCGGCACCATATACATCTC	[CAT] ₇
MK120	F:GGCCGTTCAAGCTCAGTATC R:TTGCGTTTGCAAAGAAAATG	[TCT] ₅
MK121	F:TATCCACCACCCAAGTCACC R:GGCTCCTTTGTGGTTTAGGA	[CCGCAT] ₆
MK122	F:GCTTTCCTCCTCATTACCA R:TTGGGTGGTGGATAAACTGG	[CCGCAT] ₅
MK123	F:TCTTCCTTCCCAACACAACA R:TTGGATGAACAAAACAGAGAGAA	[GGC] ₁₀
MK124	F:AAAAACCTTAAATCTCGTAAACA R:CGATGTCGAGCTACCTTTCT	[TA] ₈
MK125	F:CCAACCCCTTCCCCTACTAA R:ACTTGGGTGGAGGAGCGTA	[GAA] ₁₀
MK126	F:ACCGTACCCGTGGCTCTTAT R:TGTTGTTGTGGGAGGCTTCT	[CAT] ₈
MK127	F:GTTTAGATTATGGCATTACATAT R:AAGGCTATATCTGACTTTGG	[TA] ₁₈
MK128	F:TCAAGGACTACCAGCAGCAG R:CATTTGCACGCTGTTGATTC	[CAG] ₉
MK129	F:GCTGATGCTGATTCTCCAT R:TGCCCTTCATCTCGTTTCTT	[CAA] ₈
MK130	F:CTCACGGCTATCCACCATCT R:ACCATGAGCACCGTGAGAC	[TG] ₁₄
MK131	F:CCATGCAAATCCATGCTAGA R:TTTCTTTGGTGGTGAAACTGG	[TCAGGC] ₆
MK132	F:AGCAAGGCATGAGCGATACT R:GGTGGTACCTTCCCATGTTG	[TCAGCC] ₆
MK133	F:GGCCGTTCAAGCTCAGTATC R:TATAAACCCCTCCCCCTTGT	[TCT] ₅
MK134	F:AAGCTAAGCCAAGAGCACCA R:TTCCGAGAAGGAATCCTCAA	[GAA] ₆
MK135	F:CAACCAGACTTGCAGAGCAG R:GATTCTTGCTTCCGTCCAAA	[GAT] ₈
MK136	F:AACATGTTTTCTCCGATCT R:CCGGGATACTCCTATATCTT	[TC] ₁₂
MK137	F:AAAATTGCCAAACAAAAGCTATG R:CAATCGAACCACCCAAAAA	[CTT] ₆
MK138	F:GGGTTAGCAGAAAAGGAGGAA R:TGAAACTCCACAAGGAAGC	[TCAGCC] ₃
MK139	F:GACCAAACCTTCTTTCAA R:AGATTGTGGTAGCCCCAGTG	[CAGCAC] ₇
MK140	F:CTGGCCGTCGTCTTATTTA R:TCTGACTGCTGCTCTCGATG	[GAGTTG] ₇

Çizelge 3.6'nın Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK141	F:CCATTTCTACTTTCCATCAGATCC R:TCCTCTCCATTTTCGTTTGG	[TC] ₁₈
MK142	F:ACGACATGAGGGAAAGCAAT R:TCACCTCAGCATCACTCGAC	[GAA] ₇
MK143	F:CACAAAACCAATCACCACCA R:CAAGGGAGAACTCGGAGAAA	[GA] ₁₆
MK144	F:TCTTTGGCAATGGAAAACAA R:CATGAAGCGAGACAAGACCA	[TTC] ₇
MK145	F:TTAGCTCACCGCCTGAG R:TCAGGATCACCTTTTCACC	[GTAGTGAGA] ₂
MK146	F:ATGGAGGCTGCAAAGACTGT R:CCACTCCGACTAAAAGATCAGC	[GTAGTGAGA] ₃
MK147	F:TCGTCTTCTTCTTCGTCTTCG R:TCAGCCGCACATTAGGTAAG	[GA] ₇
MK148	F:CAGGAGGTGGTTACGGAGTC R:TTTTCTCTTCAACAGCAGCA	[TAC] ₆
MK149	F:CAAACCACCGGTTGTGAAG R:GGTGGCTTGGGTGTATATGG	[CAC] ₄
MK150	F:TACTATCCAATACCGCCGG R:TTGGTGGACTGGGGTAGACT	[CAC] ₄
MK151	F:CCATATCACCTAAACCACCA R:GTATATGGCGGAGGCTTCAC	[CAC] ₄
MK152	F:GAAGCCTCCGCATATACAC R:CCGGCGGTATTGGATAGTAA	[TCA] ₅
MK153	F:GAGCACCATGATGAAGACCA R:CGGAACTTCTCCATGAACC	[ACC] ₁₃
MK154	F:TGTGGATATGGAGGACTTTG R:GCTCTTCCATCTCACCATC	[TGA] ₁₀
MK155	F:GAAATTGAAGGAAGCTCGTGA R:TTCAATCCTCTCATTCTTCTC	[AG] ₆
MK156	F:CACTCATTCTTTGTATCCATGTATTG R:ACATGTTTCTGAGGCCAACC	[TTA] ₁₁ [TAG] ₇
MK157	F:AACCCAAGGAATCGGAGAAG R:TTGCCACCTCTCTAGGTACA	[CTT] ₅
MK158	F:CTTCCAGTTCCACCATAGCC R:ACCAAATCCAGTTCCACAG	[AC] ₁₄
MK159	F:TTTGGGCTTTCTTTTCTCTCTC R:AGACTTTGTGTCCCGCTCA	[CT] ₁₇ [TCTCTT] ₄
MK160	F:GGGTCTCGTTCCCTTAT R:GCACCAGCCTTTGACATTTT	[GA] ₂₁
MK161	F:ATCTCTTCCACCCCTCCAC R:ATCCACCCCATTTGTTCTTT	[TC] ₂₄
MK162	F:CAGGTCGGCTTCGTTTCCAG R:GAGTGGTTCTCTGGGTTCTTTTT	[TG] ₁₄
MK163	F:GTTGAAAATGGCGTGCTTG R:GACTCGTGCGGTGAAAATG	[AT] ₁₈
MK164	F:TTTCTCTCGCTTCCCTTATC R:GGCAGACCCAGACAAAGTTC	[GA] ₁₈
MK165	F:TCTCGTCTCTCCGATTTTGC R:AAGGGTTTTTCATCAGGGTTG	[AAG] ₁₀
MK166	F:AAAAACGAAGTTGGGAACAG R:ATGACAAAAGAAGAGAGCGAAG	[ATA] ₂₀
MK167	F:GCTATGGAGATGCGAAGCA R:TTGATGAGGGTCTGGGATTG	[ATG] ₁₂
MK168	F:CTGTGTGGACTCTGGGGATAA R:TGCGAAGATTGGGAACAAG	[CTT] ₁₃

Çizelge 3.6'nın Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
MK169	F:GCCGCCAGTGTTGTATGC R:CGAGGAATGAAAGCGAGAAAG	[TCT] ₁₅
MK170	F:ATCCGCCACAAATAAAGC R:CATCGTGAGAGAAAGTGAAGGA	[TTC] ₁₄
MK171	F:ATTACAGTGGATGTTCTTG R:CTGCTTATGGGATGATGA	[ATGT] ₉
MK172	F:ATAGGGAAAAGGTAGGGATT R:ACAAATGAACCAAGACGAG	[CATA] ₉
MK173	F:GGGGTCCACAGATACAGG R:GTCCAAAACCTGTCCATTAG	[TATG] ₉

Çizelge 3.7. Genomik Mikrosatellit primer çiftlerinin sekans dizilimleri ve motifleri

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
BNL341	F:ACCTGGGGTACTTGTCCACA R:CCATCCCATTGTGATACCC	[GA] ₁₄
BNL448	F:GCAGCTTGCTTTTCTGCTTC R:ACGCAAGCTTGGTCAATACC	[CT] ₁₃
BNL542	F:TCGATCACATTTATAAGAATATTGG R:TTCATTTTGAACATTCGCCA	[TA] ₄ , [AG] ₁₉
BNL673	F:ATAAGGGAGGTTGCAAGGGT R:CTATTTATATGATTTTTATTGTTTCATCC	[AG] ₁₅
BNL1034	F:TTGCTTTCAATGGAAAACCC R:CGTCGCAAAGTTGAGAATCA	[CT] ₁₆
BNL1061	F:GCTTGTCATCTCCATTGCTG R:TAGCCCGGTTTCATGTTCTTC	[CA] ₁₂ , [GT] ₁₁
BNL1079	F:TCATACTTTTCATCTAGCGCG R:AAAGGAATCCAGGTGAGCCT	[CA] ₁₁ , [GT] ₁₁
BNL1227	F:CATCAAGATCTATCTCTCTATACCG R:TTTACCCTCCGATCTCAACG	[AG] ₁₅
BNL1421	F:TGAAGATTTGGAGGCAATTG R:GAAATCAAGCCTCAATTCCG	[AG] ₂₉ , [AG] ₁₄
BNL1434	F:AAATTCAAGAATCAAAAAACAACA R:TTATGCCAAAGTATATGGAGTAACG	[AG] ₁₃
BNL1597	F:GGGCTTTCCGATACTGAACA R:CCTGCAATAAGGCGTTCAAT	[GA] ₁₃
BNL1606	F:CATGTAGGATGAGAGAGAGAGAGA R:GGGGCTTTACGACATACCTG	[AG] ₁₅
BNL1679	F:AATTGAGTGATACTAGCATTTTCAGC R:AAAGGGATTTGCTGGCAGTA	[AG] ₁₇
BNL1721	F:TGTCGGAATCTTAAGACCGG R:GCGCAGATCCTCTTACCAA	[AG] ₁₇
BNL2496	F:TCGAAATGAATTTAGATGACCA R:TCCTTTTTTTGTACTTCTCTTGC	[GA] ₁₅
BNL2544	F:GCCGAACTAAAACGTCCAA R:TCCTTACTCACTAAGCAGCCG	[AG] ₁₁
BNL2571	F:TCGCTATCGCTCTGAAATCA R:ATGCCACGGAATTAGCAAAC	[AG] ₁₃ , [TC] ₁₃
BNL2572	F:GTCCTATTACTAAAATTGTTAATTTAGCC R:CGATGTTAAATCAATCAGGTCA	[GA] ₂₃
BNL3008	F:ATCTCAGATTTAAACATATAATAGAGGG R:TAAAATGAAGGCCATCAGGC	[GA] ₁₃
BNL3065	F:CAAACGGGAGACCAAAAAA R:CGAACTGGCGAGTTAGTGCT	[AG] ₂₁
BNL3103	F:ACTTTGAGATATTGTTATTCTACCCG R:TCGAACAATTACGAATCAAATG	[GA] ₁₃ [TC] ₁₄

Çizelge 3.7'nin Devamı

MARKIR	PRİMER SEKANS DİZİSİ (5'→3')	MOTİF
BNL3255	F:GACAGTCAAACAGAACAGATATGC R:TTACACGACTTGTCCCACG	[GC] ₆ AT[AC] ₁₄
BNL3408	F:ATCCAAACCATTGCACCACT R:GTGTACGTTGAGAAGTCATCTGC	[GT] ₂ AT[GT] ₁₂
BNL3411	F:TTTTACACTCTCTCTCCTGTCTCC R:GTTTCCATTTGCGATGAGCT	[CA] ₉ + [CT] ₁₁ + [CA] ₆
BNL3415	F:GGCTTAATGACAATTATAGAACTTCC R:TAAATTGAAGTGTAGGAGTAAAGTAAATG	[CA] ₁₃
BNL3442	F:CATTAGCGGATTTGTCTGTA R:AACGAACAAAGCAAAGCGAT	[CA] ₁₄ [TA] ₅
BNL3443	F:CTGTGGCTACTATAGCTTGATGC R:TCAGACCCCACTCTCATTCC	[CA] ₂₆
BNL3463	F:GCACTCATTCAAGGCA R:TGCCAATGTGGCATCAAC	[AC] ₁₀
BNL3792	F:TTCGAGATCCCCTGTTCTGA R:CATATCCAGTCAAACCAAACG	[TG] ₂₁
BNL3806	F:GACAGGCCAGACCAGAACAT R:TCAAACAAAGCACATATATAATACACA	[TG] ₁₈ , [AG] ₁₈ [AC] ₉ +N+[CA] ₇ +C+N+[CA] ₂ + [AT] ₅
BNL3873	F:CATGCCACGCTTTTGTATG R:ACAGAATGCGCTAGTCACC	[TA] ₇ + [TG] ₁₀
BNL3888	F:GCCCCACTTGCCTTTACAG R:AGCTTTTCCCCTTTCACCAT	[TG] ₁₅
BNL3955	F:AGAGATGCAATGGGATCGAC R:ATGTGATAATGCGGGGAATG	[CA] ₁₂ [GT] ₁₃
BNL3971	F:CACATATTTTGCCTCACGC R:TGTGGACCCAAAAGGAAGA	[TC] ₁₅
BNL3988	F:AAAAAATTGGAATCTAATCGACA R:GTGTTGATCTTTATATCTCTCTATTCCG	[TC] ₃₃
BNL3995	F:ATATTTTATTCTTTAATAGCTTTATTCCC R:TTGGAAAAACCCATGGTGAT	[AC] ₁₆
BNL4030	F:CCTCCCTCACTTAAGGTGCA R:ATGTTGTAAGGGTGCAAGGC	[GT] ₁₀
BNL4041	F:TTTTACGATGTTTCTCGGG R:ATAGCATAACAACAACATCAACC	[AT] ₅ , [GT] ₁₄
BNL4082	F:GTAAAATGAAATAAAAATAAAAGGAGAGA R:TTCAACACCGCCAAACATAA	[GA] ₂₄
CIR141	F:CGCACAAGGAATAGAAG R:ACCCAACATAAGGACTAAA	[TG] ₃₀
CM63	F:GTCTGCACTGCTCGGTTATGTGAG R:GCAGAAAAGTGTTTAACTTGCGA	[TC] ₂₃
CM66	F:GGATACGTAGGCCTCCACATATTC R:GCTGCCTGCTGTTGAATGCTG	[CT] ₁₄
MUSB0078	F:CCCTCGAGACACCTAAGACC R:GTGATGGTGGTAGTCATTTGG	[AAG] ₄
MUSB0312	F:CCTCCATTATCTTCTCCTTTTCC R:TCTTTCTTTTGTGCGTGTGG	[AT] ₅
TMB0154	F:TGTCAAGTTCAAGGGCACAA R:TCCAAGTCCCACCATGAGTT	[CA] ₁₈
TMB1277	F:GCGAGAGGGAAGTTGTAATGTC R:CCAACACACCAACTCCAC	[CA] ₆

3.5. Mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit markırlarının belirlenmesi

Çalışmada kromozom substitüsyon hatlarında kullanılan olan mikrosatellit ve CAPS markırların belirlenmesinde 4 kriter göz önünde bulundurulmuştur. Bu kriterler: 1) hem TM-1 ve hem de Pima 3-79 DNA'larında ampikon üretmesi, 2) TM-1 ve Pima 3-79 genomik DNA'larını en az 10 baz çifti yönünden ayırt etmesi (polimorfik olması), 3) tekrarlanabilir markır üretmesi ve 4) kolay ve kesin olarak agaroz jelde polimorfizmi ortaya koymasındır.

3.6. MK lokuslarının kromozom lokasyonlarının belirlenmesi

Çalışmada kromozom lokasyonları daha önceki çalışmalarla tespit edilmiş mikrosatellit markırlarından yararlanılarak kromozom lokasyonları bilinmeyen MK primer çiftlerinin oluşturdukları markırların kromozom lokasyonları şu şekilde tespit edilmiştir: TM-1 ve Pima 3-79 arasında polimorfik sonuç veren MK lokusu ile kromozom lokasyonu bilinen DNA markırının aynı amplifikasyon profiline sahip olması bu markırların aynı kromozom üzerinde olması prensibine dayandırılmıştır (Karaca 2001).

3.7. CS-B hatlarının değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan kromozom substitüsyon hatları (CS-B) taşıdıkları Pima 3-79 yönünden araştırılmış ve transfer edilen Pima 3-79 kromozomunu veya kollarını taşıyanlar markır destekli seleksiyon prensibi ile değerlendirilmiştir. Aynı CS-B hatlarının farklı bireyleri incelenmiş ve fiziksel karışımlar yönünden değerlendirilmiştir.

Fiziksel karışım olarak CS-B hatlarında tohum karışıklığı, tohumların yanlış etiketlenmesi, yaprak örnekleri toplanırken karışımın olabilmesi veya laboratuvar ortamında genomik DNA karışımları olarak belirtilmiştir. Genetik karışıklık olarak CS-B hatları oluşturulurken sitogenetik analizlerde yanlış kromozom kolunun belirlenmesi ya da translokasyonların olma ihtimalleri belirtilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Substitüsyon Hatlarının Yetiştirilmesi ve Yaprak Örnek Setleri

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Deneme Alanlarında hatlar en az 10 bitki olacak şekilde sıralar halinde yetiştirilmiştir. Bitkilerin yetiştirilmesinde kültürel yöntemlerden çapalama, sulama ve gübreleme işlemleri yapılmış, hastalık ve zararlılara karşı kimyasal mücadele edilmiş ve sağlıklı bitkiler yetiştirilmesine özen gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 2011 döneminde yetiştirilen substitüsyon, TM-1 ve Pima 3-79 hatlarının arazi koşullarında görünüşü

Çalışmada her bir hat için 3 farklı örnek seti kullanılmıştır. Bu örnek setleri bulk ve teksel bitki örneklerinden oluşmaktadır. İlk örnek seti kromozom substitüsyon hatlarının 2007 yılında tohum çoğaltmak amacı ile yapılan çalışmalarda her bir hat için 5-6 bitkinin yapraklarının toplanması ile elde edilen bulk örnek setidir. Çalışmada Set 1 olarak adlandırılmıştır. İkinci ve üçüncü örnek setleri ise 2011 yetiştirme döneminde elde edilmiş tohumların 2012 yılında ekimlerinden elde edilen ve her bir hattın tek bir bitkisinden toplanmış olan Set 2 ve Set 3 yaprak örneklerinden oluşturulmuştur.

Deneme alanında her bir hattı temsil edecek şekilde en az 10 bitki yetiştirilmiştir. Her bir hat için Set 1, Set 2 ve Set 3 olmak üzere sağlıklı olan bitkiden steril koşullarda genç yapraklar toplanmış, buz üzerinde laboratuvara transfer edilmiş

ve -20 °C de saklanmıştır. 2011 yılında arazi şartlarında yetiştirilen bitkilerden ileriki denemelerde kullanılmak üzere çiçek açmadan önce çiçekler kapatılarak oluşan kozalardan kendilenmiş tohumlar elde edilmiştir. Şekil 4.1’de 2012 döneminde Set 2 ve Set 3 örneklerinin toplandığı bitkiler görülmektedir.



Şekil 4.2. 2012 döneminde yetiştirilen substitüsyon, TM-1 ve Pima 3-79 hatlarının arazi koşullarında yetiştirilmesi

4.2. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan her bir örnek seti sağlıklı ve genç yapraklardan oluşturulmuştur. Pamuk bitkisinde yapılan DNA ekstraksiyonu çalışmalarında, yaprakların alım zamanının ve yaşlarının büyük önem taşıdığı stres koşullarında olan yapraklarda fenolik ve polisakkaritlerin fazlalığının arttığı bilinmekte ve bu nedenle çalışmada yapraklar sabah saatlerinde bitkilerin sıcaklık stresinde olmadığı zamanlarda ve sulamanın yapıldığı 2-3 günlük zaman döneminde toplanmıştır (Karaca 2001).

Chaudhry vd (1999) pamuk gibi bitki türlerinde fotosentetik aktif dokuların polisakkarit ve fenolik bileşikler taşıdığını, bu bileşikler ekstraksiyon sırasında okside

olduğunu ve ekstraksiyonu engellediğini rapor etmiştir. Bu yüzden de bitki yaprakları toplanırken özellikle sabah güneş hemen doğmadan önce ya da akşam güneş battıktan sonra toplanmıştır.

Bitki yaprak dokuları laboratuvarında $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıvı azot ile havan içerisinde toz haline getirilene kadar ezilmiştir (Şekil 4.3). Ezme işleminin ardından dokuların oksidasyona uğramaması ve dokunun taze kalması için örnekler DNA ekstraksiyon işlemlerine kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonu için 1 g doku örneği kullanılarak ekstraksiyon işlemleri bazı modifikasyonlar yapılarak Karaca vd (2005)'e göre gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon işlemlerinde kullanılan solüsyonlar yeni ve steril olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Yaprak dokularının ezilmesi ve ekstraksiyon çözeltilerinin hazırlanması

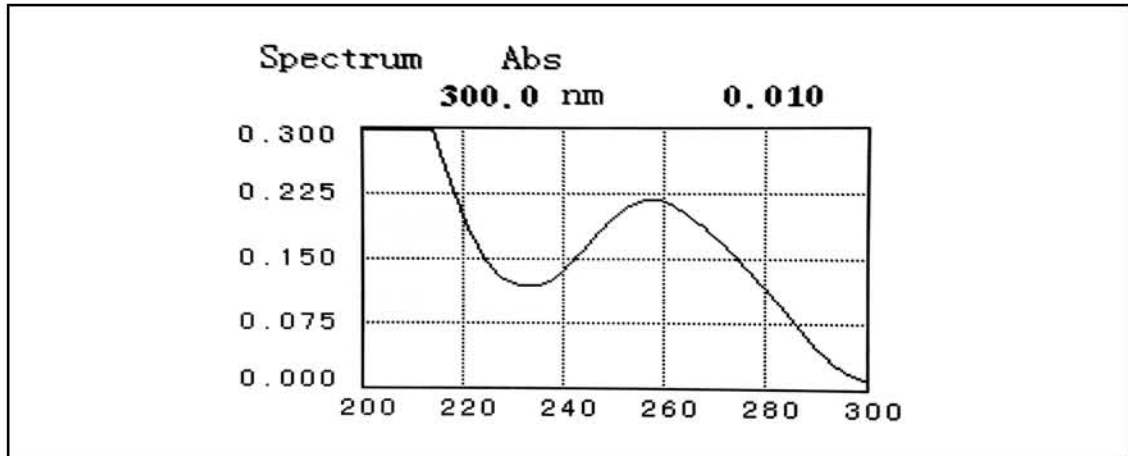
Çalışmada her bir örnek seti için (Set 1, Set 2 ve Set 3) farklı zamanlarda DNA ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada toplam 55 adet örnekten DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir substitüsyon hattından 3 set DNA izolasyonu yapılmış ancak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarından bulk (Set 1) ve teksel (Set 2) olmak üzere 2 farklı DNA örneği izole edilmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan DNA örneklerinin kalite ve miktarları belirlenmiştir.

4.3. DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi

Karaca vd (2005)'e göre ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın miktar ve kalitesini belirlemek için yaygın olarak bilinen iki yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlere ek olarak her bir örnek seti (Set 1, Set 2 ve Set 3) PZR çalışmalarına alınarak spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemleriyle teyit edilmiştir.

4.3.1. Spektrofotometre analizleri

Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın miktar ve kalitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemde 25 kat seyreltilmiş olan toplam DNA'nın (nüklear, mitokondri ve kloroplast DNA'sı) analizinde 200 nm ile 300 nm dalga boylarında tarama yapılmış ve A_{230} , A_{260} ve A_{280} değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca her bir setten seçilen DNA örnekleri 190-1100 nm dalga boylarında da taranmış ve 200-300 nm dışındaki dalga boylarında tespit edilebilecek fitokimyasal veya ekstraksiyon çözeltilerinin kalıntıları olup olmadığı araştırılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Ekstraksiyonu yapılan hatların 200-300 nm taraması. Şekildeki Y eksenı göreceli absorban miktarını X eksenı ise dalga boylarını göstermektedir

DNA miktarı ve konsantrasyonu, protein kalıntısı, polisakkarit varlığı, kimyasal kalıntı olup olmadığı, DNA'ya bağlı protein ve polisakkarit varlığı İnce (2010)'a göre değerlendirilmiştir. Şekil 4.4'te çalışmada kullanılan hatlardan birine ait spektrofotometre taraması gösterilmektedir. Kaliteli bir DNA'da 300 nm dalga

boyunda düşük absorbans görülürken 260 nm dalga boyunda yüksek bir absorbans değeri beklenmektedir.

DNA ile birlikte izole edilmiş ve DNA'ya bağlı olan protein ve polisakkaritler Polimeraz Zincir Reaksiyonlarını (PZR) ve diğer enzimsel reaksiyonlu çalışmalarını olumsuz yönde etkilediği için kaliteli DNA'nın elde edilmesi başarılı bir çalışmanın ön koşullarından biridir (Karaca vd 2005).

DNA miktarının bilinmesi aynı zamanda PZR çalışmasının sağlıklı yapılabilmesi ve doğru sonuçlar alınabilmesi içinde son derece önemlidir. Bu nedenle DNA ekstraksiyonu yapılan tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarını belirlemek için farklı dalga boylarında okumalar yapılmıştır. Kalıntıların varlığı, oran hesaplamasıyla ayırt edilebilir. Proteinler 280 nm'de absorblandığı için A_{260}/A_{280} oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılır.

Saf DNA yaklaşık 1,8 değerini vermelidir. 230 nm'de görülen absorpsiyon, örneğin karbonhidratlar, peptitler, fenoller veya aromatik bileşenler gibi maddelerle kontaminasyonu gösterir. Saf örneklerde A_{260}/A_{230} oranı yaklaşık 2.2 olmalıdır (Karaca vd 2005).

Çizelge-4.1'de spektrofotometrik okumalarda A_{260}/A_{280} okumalarının her üç örnek seti için ve ortalama değerleri de hesaplanarak gösterilmiştir. A_{260}/A_{280} oranının 1.8-1.91 arasında olduğu ve ekstraksiyonu yapılmış olan genomik DNA'ların proteinlerden arındırıldığını göstermiştir. Ayrıca A_{260}/A_{230} okumalarının da yaklaşık olarak 2 değerinde bulunduğu ve bu da genomik DNA'nın polisakkarit, fenolik bileşikler ve diğer kalıntılardan arındırılmış olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1. Ekstraksiyonu yapılmış olan DNA'nın A_{230} , A_{260} ve A_{280} absorbans okuma değerleri ve ortalamaları

MATERYAL	A_{230}	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	$\mu\text{g/mL}$
TM-1 (Set 1)	0,084	0,160	0,090	1,78	1,90	400,0
TM-1 (Set 2)	0,164	0,321	0,173	1,86	1,96	802,5
TM-1 (Ortalama)	0,124	0,241	0,132	1,82	1,93	601,3
Pima 3-79 (Set 1)	0,163	0,371	0,198	1,87	2,28	927,5
Pima 3-79 (Set 2)	0,134	0,270	0,148	1,82	2,01	675,0
Pima 3-79 (Ortalama)	0,149	0,321	0,173	1,85	2,15	801,3
B01 (Set 1)	0,106	0,191	0,108	1,77	1,80	477,5
B01 (Set 2)	0,248	0,580	0,304	1,91	2,34	1450,0
B01 (Set 3)	0,120	0,214	0,116	1,84	1,78	267,5
B01 (Ortalama)	0,158	0,328	0,176	1,84	1,97	731,7
B02 (Set 1)	0,169	0,351	0,193	1,82	2,08	877,5
B02 (Set 2)	0,261	0,625	0,331	1,89	2,39	1562,5
B02 (Set 3)	0,125	0,224	0,120	1,87	1,79	280,0
B02 (Ortalama)	0,185	0,400	0,215	1,86	2,09	906,7
B04 (Set 1)	0,092	0,159	0,089	1,79	1,73	397,5
B04 (Set 2)	0,317	0,760	0,403	1,89	2,40	1900,0
B04 (Set 3)	0,096	0,172	0,092	1,87	1,79	215,0
B04 (Ortalama)	0,168	0,364	0,195	1,85	1,97	837,5
B05 Sh (Set 1)	0,110	0,203	0,116	1,75	1,85	507,5
B05 Sh (Set 2)	0,259	0,596	0,314	1,90	2,30	1490,0
B05 Sh (Set 3)	0,096	0,173	0,093	1,86	1,80	216,3
B05 Sh (Ortalama)	0,155	0,324	0,174	1,84	1,98	737,9
B06 (Set 1)	0,068	0,121	0,065	1,86	1,78	302,5
B06 (Set 2)	0,203	0,466	0,246	1,89	2,30	1165,0
B06 (Set 3)	0,149	0,269	0,144	1,87	1,81	336,3
B06 (Ortalama)	0,140	0,285	0,152	1,87	1,96	601,3
B07 (Set 1)	0,080	0,132	0,076	1,74	1,65	330,0
B07 (Set 2)	0,261	0,619	0,326	1,90	2,37	1547,5
B07 (Set 3)	0,130	0,223	0,124	1,80	1,72	278,8
B07 (Ortalama)	0,157	0,325	0,175	1,81	1,91	718,8
B11 Sh (Set 1)	0,101	0,187	0,103	1,82	1,85	467,5
B11 Sh (Set 2)	0,187	0,445	0,236	1,89	2,38	1112,5
B11 Sh (Set 3)	0,148	0,268	0,143	1,87	1,81	335,0
B11 Sh (Ortalama)	0,145	0,300	0,161	1,86	2,01	638,3
B12 Sh (Set 1)	0,099	0,172	0,098	1,76	1,74	430,0
B12 Sh (Set 2)	0,288	0,697	0,368	1,89	2,42	1742,5
B12 Sh (Set 3)	0,142	0,257	0,138	1,86	1,81	321,3
B12 Sh (Ortalama)	0,176	0,375	0,201	1,84	1,99	831,3
B14Sh (Set 1)	0,063	0,120	0,064	1,88	1,90	300,0
B14 Sh (Set 2)	0,176	0,406	0,219	1,85	2,31	1015,0
B14 Sh (Set 3)	0,147	0,270	0,144	1,88	1,84	337,5
B14 Sh (Ortalama)	0,129	0,265	0,142	1,87	2,02	550,8
B15 Sh (Set 1)	0,104	0,183	0,103	1,78	1,76	457,5
B15 Sh (Set 2)	0,130	0,282	0,151	1,87	2,17	705,0
B15 Sh (Set 3)	0,095	0,160	0,086	1,86	1,68	200,0
B15 Sh (Ortalama)	0,110	0,208	0,113	1,83	1,87	454,2
B16 (Set 1)	0,068	0,112	0,060	1,87	1,65	280,0
B16 (Set 2)	0,168	0,368	0,196	1,88	2,19	920,0
B16 (Set 3)	0,132	0,242	0,129	1,88	1,83	302,5
B16 (Ortalama)	0,123	0,241	0,128	1,87	1,89	500,8
B17 (Set 1)	0,110	0,213	0,115	1,85	1,94	532,5
B17 (Set 2)	0,142	0,288	0,154	1,87	2,03	720,0
B17 (Set 3)	0,130	0,251	0,134	1,87	1,93	313,8
B17 (Ortalama)	0,127	0,251	0,134	1,87	1,97	522,1

Çizelge 4.1. (Devamı)

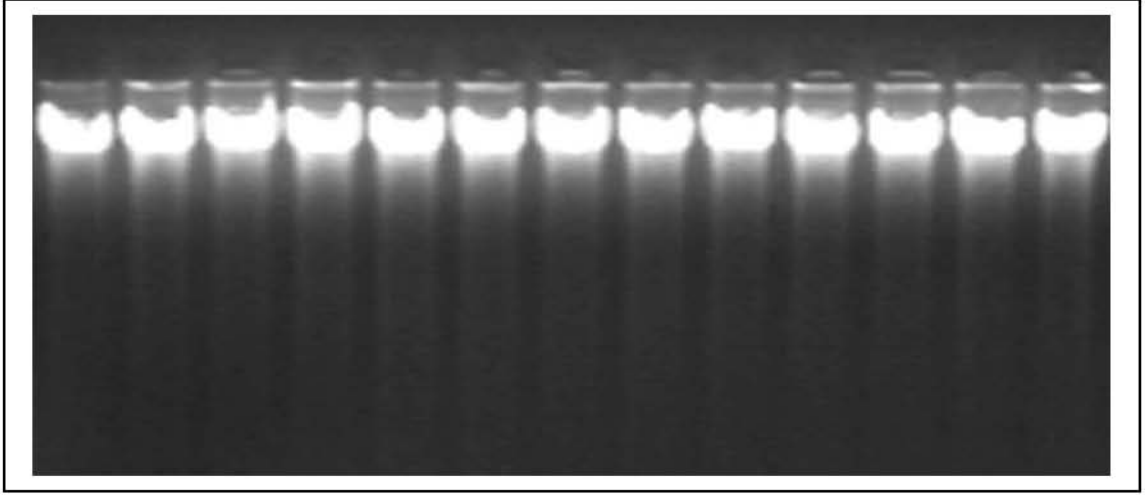
MATERYAL	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	µg/mL
B18 (Set 1)	0,151	0,297	0,170	1,75	1,97	742,5
B18 (Set 2)	0,158	0,327	0,175	1,87	2,07	817,5
B18 (Set 3)	0,131	0,253	0,135	1,87	1,93	316,3
B18 (Ortalama)	0,147	0,292	0,160	1,83	1,99	625,4
B22 Sh (Set 1)	0,082	0,145	0,084	1,73	1,77	362,5
B22 Sh (Set 2)	0,196	0,455	0,242	1,88	2,32	1137,5
B22 Sh (Set 3)	0,108	0,187	0,099	1,89	1,73	233,8
B22 Sh (Ortalama)	0,129	0,262	0,142	1,83	1,94	577,9
B22Lo (Set 1)	0,102	0,185	0,103	1,80	1,81	462,5
B22 Lo (Set 2)	0,208	0,457	0,243	1,88	2,20	1142,5
B22 Lo (Set 3)	0,095	0,168	0,090	1,87	1,77	210,0
B22 Lo (Ortalama)	0,135	0,270	0,145	1,85	1,93	605,0
B25 (Set 1)	0,103	0,172	0,094	1,83	1,67	430,0
B25 (Set 2)	0,167	0,328	0,176	1,86	1,96	820,0
B25 (Set 3)	0,159	0,310	0,166	1,87	1,95	387,5
B25 (Ortalama)	0,143	0,270	0,145	1,85	1,86	545,8
B26 Lo (Set 1)	0,107	0,203	0,108	1,88	1,90	507,5
B26 Lo (Set 2)	0,130	0,263	0,140	1,88	2,02	657,5
B26 Lo (Set 3)	0,131	0,243	0,130	1,87	1,85	303,8

Çalışmada kullanılan DNA örneklerinin spektrofotometrik analizlerde protein ve polisakkaritlerden arı olduğu ve elde edilen DNA miktarının çalışmanın yürütülebilmesi için yeterli olduğu tespit edilmiştir. Ancak spektrofotometrik yöntem elde edilen DNA molekülünün kırılmış veya parçalanmış olmasını ortaya koyamamakta ve aynı zamanda RNA kalıntısının olup olmadığını da tespit edememektedir. Bu durumda elektroforetik yöntemler devreye sokulmaktadır (İnce 2010).

4.3.2. Agaroz jel elektroforez analizleri

Elektroforetik yöntem genomik DNA örneklerinin moleküler ağırlıklarını, bütün veya parçalanmış olmaları ve RNA kalıntısının olup olmadığını ortaya koymada kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bu çalışmada substitüsyon hatlarına ait genomik DNA örnekleri 700 ng hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde 6X DNA yükleme çözeltisi ile karıştırılmıştır. DNA'nın kantite ve kalitesinin TRIS-Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmesi için %1'lik agaroz jel, 1X TBE çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Jel içerisinde 0,5 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde etidium bromit ilave edilerek genomik DNA'nın kalitesi tespit edilmiştir. Bazı substitüsyon hatlarına ait genomik DNA agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 4.5'te

verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi substitüsyon hatlarına ait genomik DNA'nın RNA'dan, proteinlerden, polisakkaritlerden arındırılmıştır ve hatlar yüksek moleküler ağırlığa sahiptir.



Şekil 4.5. Ekstraksiyonu tamamlanmış genomik DNA'nın Agaroz jel elektroforez (AJE) yöntemiyle görüntülenmesi

PZR çalışmaları DNA miktarı yönünden çok az düzeyde DNA gerektirmesine karşın kalite yönünden daha hassastır (Karaca vd 2005). Bu nedenle PZR çalışmalarında kullanılan DNA'nın saflığı ne kadar yüksek ise yapılan çalışmaların doğru sonuçlara ulaşılmasında o kadar etkilidir.

PZR'de RNA'nın varlığı genomik DNA miktarının belirlenmesinde olumsuz sonuçlar doğurabilmekte, enzim aktivitesini etkileyebilmekte, kullanılacak primerlerin veya primer çiftlerine bağlanarak primerlerin bağlanmasını engelleyebilmekte, denatürasyon ve renatürasyonu da olumsuz etkileyebilmektedir. Aynı şekilde protein ve polisakkaritlerin de varlığı primerlerin bağlanmasını ve *Taq* DNA Polimeraz enziminin aktivitesini engelleyebilmektedir (İnce 2010). Çalışmada kullanılan DNA örnekleri gerek spektrofotometrik ölçüm değerleri (A_{230} , A_{260} ve A_{280} okuma değerler) ve gerekse de agaroz jel elektroforez analizleri ile ortaya konulduğu üzere ve PZR ve enzimsel bulgularla da desteklendiği üzere yüksek moleküler ağırlıkta, yeterli saflıkta ve miktarda olduğu enzimatik reaksiyonlarla da tespit ve teyit edilmiştir.

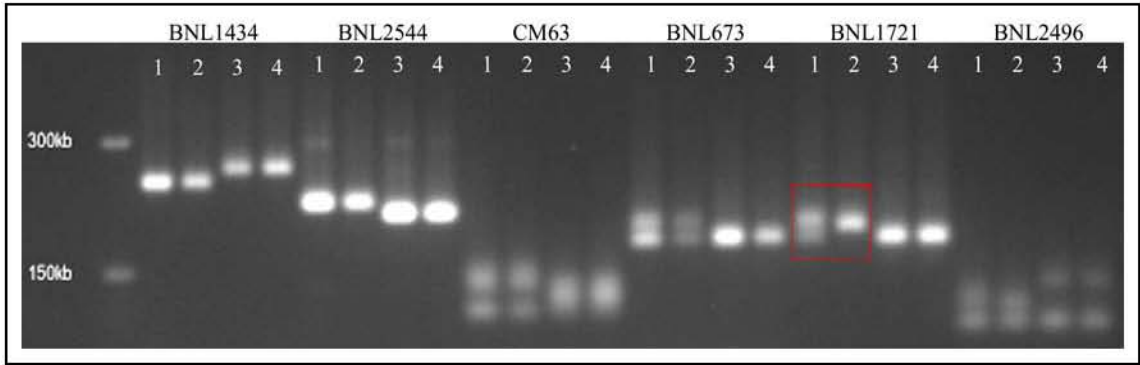
4.4. PZR Profillerinin Tespiti

Çalışmada 225 primer çifti iki farklı PZR profilinde (Profil A ve Profil B)'de TM-1 hattının genomik DNA'sından 8,5 µL kullanılarak (10 ng/µL stoktan) hacmi 25 µL'ye ayarlanmış reaksiyonlarda 0,5 µM bir primer çifti, 12 mM Tris-HCl (pH 9.1), 60 mM KCl, %0.012 Triton X-100, 0.28 mM her bir dNTP, 3 mM MgCl₂ ve 1 ünite *Taq* DNA Polimeraz (Vivantis) enzimi kullanılarak PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

PZR işlemlerinin ardından DNA yükleme tamponu eklenen örnekler %2 veya %3 agaroz jele yüklenmiş ve 1X TBE çözeltisi kullanılarak 5V/cm uygulanarak 5-9 saat süre ile elektroforez edilmiştir. Elektroforez işlemi sonucunda çalışmada kullanılan 11 primer çiftinin (MK primer çiftleri) PZR B profili, geri kalan primer çiftlerinin ise PZR A profilinde kullanılması gerektiği saptanmıştır. Çalışmada PZR profili A'da çoklu amplikon veren 11 primer çifti PZR profili B'de kullanılmıştır.

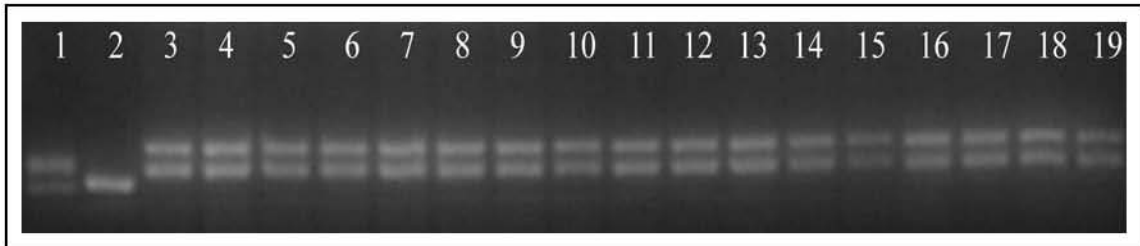
4.5. Polimorfik Mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit Lokusların Tespiti

Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin PZR profilleri ve amplifikasyon yeteneklerinin saptanmasının ardından primer çiftleri tespit edilen uygun PZR profilinde TM-1 ve Pima 3-79 hatlarına ait genomik DNA kalıpları kullanılarak polimorfizm yönünden çalışılmıştır. Tarama çalışmalarında TM-1 ve Pima 3-79'a ait Set 1 (bulk) ve Set 2 (teksel) örnekler birlikte kullanılarak genomik DNA örnekleri lokus içerikleri yönünden karşılaştırıldığında TM-1 hattının bulk ve teksel örnekleri arasında bir kaç lokuslar da bulunan bazı alleller arasında farklılığın olduğu tespit edilmiştir. TM-1 hattı kırkın üzerinde kendileme yapılmasına rağmen Şekil 4.6'da gösterildiği üzere BNL1721 primer çifti ile TM-1 hattının bulk ve teksel olarak toplanmış örneklerinde DNA'da farklılık saptanmıştır. Çalışmada sayısı fazla olmamakla birlikte TM-1 hattından elde edilen DNA örnekleri arasındaki farklılığın ortaya konulması nedeniyle bulk örneklerinden elde edilen TM-1 lokusları kromozom substitüsyon hatlarının teyidinde kullanılmıştır. Kromozom substitüsyon hatlarının tespitinde ve teyidinde TM-1 lokusları önemlilik göstermemektedir. Ayrıca çalışmanın diğer kısımlarında kromozom substitüsyon hatlarının Pima 3-79 kromozomu dışında bazı lokuslar açısından TM-1 hattından farklı oldukları da tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Bazı primer çiftlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında hem bulk (Set 1) hem de teksel (Set 2) genomik DNA örneklerin BNL1434, BNL2544, CM63, BNL0673, BNL1721 ve BNL2496 primer çiftleri ile taranması. İlk kuyucuk DNA büyüklük markıklarını göstermektedir

Çalışmada kullanılan özellikle EST tabanlı MK lokuslarında bir kısım substitüsyon hatları ile TM-1 arasında farklı amplicon üretmişlerdir (Şekil 4.7). Stelly vd (2005) daha önceki çalışmalarında substitüsyon hatlarının TM-1 ile genetik benzerlik gösteren bir hattan oluşturulduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada kullanılan MK lokuslarının bir kısmı TM-1 hattı ile bu hatta izogenik hat olan ve kromozom substitüsyon hatlarında alıcı genom olarak kullanılan hattı ayırt edebilmektedir. Bu tür farklılık MK079, MK088, MK130 ve MK131 (Şekil Ek-72, Şekil Ek-73, Şekil Ek-77) primer çiftleri ile elde edilen lokuslarla ortaya konulabilmiştir.



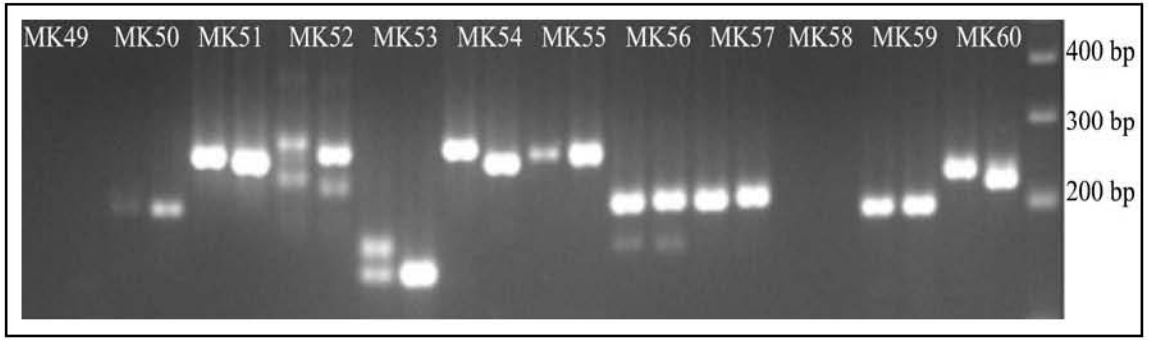
Şekil 4.7. MK082 lokusu ile örneklerin taranması. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo hatlarına ait genomik DNA örneklerinin amplifikasyonu

Yapılan çalışmada Pima 3-79 hattının farklı bireylerinden elde edilen DNA örnekleri arasında hiç bir farklılık tespit edilememiştir. Bu durum kromozom substitüsyon hatlarının teyidinde Pima 3-79 lokuslarının ve bu lokuslarda bulunan

allelilerin kullanılabilirliğini ortaya koyması bakımından önemlidir. Çalışmada ayrıca CS-B hatları arasında Pima 3-79 genomik farklılığı dışında hiç bir farklılık tespit edilememiştir. Bu durum CS-B hatlarının birbirleri arasında genetiksel olarak homojen olduğu ve farklılıklarının ise Pima 3-79 genom etkisinden kaynaklandığını teyit etmiştir (Stelly vd 2005). Ancak bu bilgiler kromozom substitüsyon hatlarının birbirleri ile karışmış veya ilgili Pima 3-79 kromozomunun varlığı veya translokasyon sonucu diğer kromozomlarla rekombinasyona uğrayıp uğramadığı konusunda bilgi vermemektedir.

4.5.1. Mikrosatellit lokuslarının analizleri

Çalışmada 39 BNL, 1 CIR, 2 CM, 6 MGAES, 173 MK, 2 MUSB ve 2 TMB olmak üzere toplamda 225 primer çifti TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında mikrosatellit markırları için taranmıştır. Mikrosatellit tekniği kullanılarak 225 primer çifti ile yapılan taramalar sonucunda 25 lokus nul, 78 lokus monomorfik ve 122 lokus ise polimorfik amplikon oluşturduğu tespit edilmiştir. TM-1 ve Pima 3-79 arasında polimorfik sonuç veren 122 lokustan 84 lokus çalışmada kullanılan 4 kriteri göstermesi nedeni ile seçilmiştir. Bu kriterler lokusların TM-1 ve Pima 3-79 genomik DNA'larını çoğaltabilme, TM-1 ve Pima 3-79 genomik DNA'larını en az 10 baz çifti yönünden ayırt etme, tekrarlanabilirlik ve kolay-kesin olarak polimorfizm ortaya koymalarıdır. Şekil 4.8'de TM-1 ve Pima 3-79'a ait genomik örnekleri toplam 12 lokus yönünden taranması gösterilmektedir. 1 ve 2 nolu kuyucuklarda bulunan MK049 ve 19 ile 20 nolu kuyucuklarda bulunan MK058 lokusları nul, 3 ve 4 nolu kuyucuklardaki MK050 lokusunun etkin sonuç vermediği 20 ve 21 nolu kuyucuklarda MK059 lokusunun monomorfik sonuç verdiği ve ayrıca 13 - 18 kuyucuklarda bulunan MK055, MK056 ve MK057 lokuslarının polimorfik sonuç vermelerine rağmen çalışmada kullanılan polimorfizm kriterlerinden bir veya birkaçına uymamış olması nedeni ile kromozom substitüsyon hatlarının teyit çalışmalarında kullanılmamıştır. Çalışmada Şekil 4.8'de gösterildiği üzere bu şekilde 225 primer çifti değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. TM-1 ve Pima 3-79 hatlarının farklı MK lokusları ile taranması

4.5.2. CAPS-mikrosatellit lokuslarının analizleri

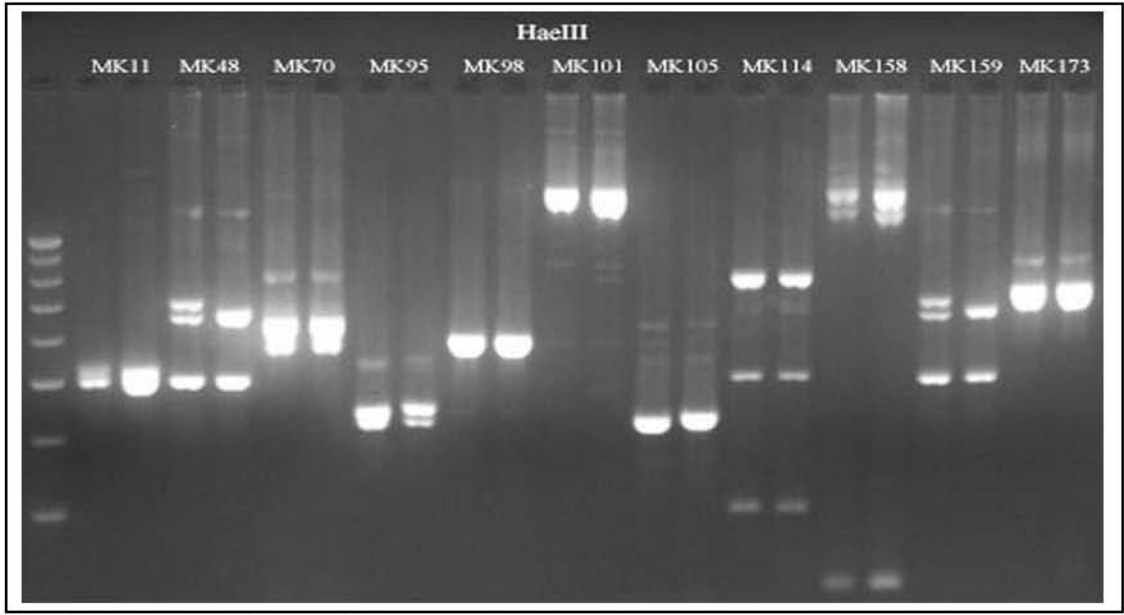
CAPS-mikrosatellit analizleri için MK primer çiftleri ile taranan TM-1 ve Pima 3-79 hatları arasında monomorfik amplicon oluşturan, 500 baz çiftinden büyük amplicon oluşturan MK011, MK048, MK070, MK095, MK098, MK101, MK105, MK114, MK158, MK159 ve MK173 lokusları kullanılmıştır. PZR ürünleri 16 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi ile taranmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. MK lokuslarının farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu monomorfik ve polimorfik ampliconların oluşmasının tablo olarak gösterimi

Enzim/ Primer	MK PRİMER ÇİFTLERİ										
	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>Bam</i> HI	-	-	-	-	-	-	-	-	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)

CAPS-mikrosatellit analizleri için kullanılan restriksiyon enzimleri ve MK lokuslarından polimorfik ve monomorfik ampikon oluşturanlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. CAPS-mikrosatellit analizleri için kullanılan her bir primer çifti Çizelge 4.2’de verilen enzimlerle önce TM-1 ve Pima 3-79 arasında taranmıştır. Tarama çalışmalarında 11 primer çiftinin dokuzunun polimorfik sonuç verdiği belirlenmiş ve polimorfik olarak bulunan ampikonlar substitüsyon hatlarında kullanılmıştır.



Şekil 4.9. *Hae* III restriksiyon enziminin CAPS-mikrosatellit analizi için seçilen lokusların taranması

TM-1 ve Pima 3-79’a ait genomik DNA örnekleri genik ve genomik mikrosatellit markırları ve CAPS-mikrosatellit markırları ile tarandığında Çizelge 4.3’ün incelenmesi ile görüleceği üzere 39 adet genomik, 44 adet genik ve 9 adet polimorfik CAPS-mikrosatellit lokusu seçilmiştir.

Çalışmada kullanılan lokusların büyük çoğunlu genik lokus olmaları CS-B hatlarının fonksiyonel genom bölgeleri yönünden tarandığı ve karşılaştırıldığı anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.3. Kromozom substitüsyon hatlarının teyidinde kullanılan lokuslar

PZR PROFİL A				PZR PROFİL B
Genomik mikrosatellit lokusları		Genik mikrosatellit lokusları		CAPS-mikrosatellit lokusları
BNL0341	BNL3442	MGAES-106	MK065	MK011
BNL0448	BNL3443	MK007	MK068	MK048
BNL0542	BNL3463	MK017	MK072	MK070
BNL0673	BNL3792	MK019	MK073	MK095
BNL1061	BNL3806	MK027	MK079	MK101
BNL1079	BNL3873	MK033	MK082	MK105
BNL1434	BNL3888	MK035	MK088	MK158
BNL1597	BNL3955	MK037	MK093	MK159
BNL1606	BNL3971	MK039	MK107	MK173
BNL1679	BNL3995	MK040	MK108	
BNL1721	BNL4030	MK041	MK130	
BNL2496	BNL4041	MK043	MK131	
BNL2544	BNL4082	MK044	MK138	
BNL2571	CIR141	MK046	MK139	
BNL2572	CM63	MK051	MK143	
BNL3065	CM66	MK052	MK147	
BNL3103	MUSB0312	MK053	MK156	
BNL3255	TMB0154	MK054	MK157	
BNL3408	TMB1277	MK060	MK160	
BNL3415		MK061	MK168	
		MK062	MK169	
		MK064	MK170	

4.6. Kromozom Substitüsyon Hatlarının Tespiti ve Teyit Edilmesi

Mikrosatellit analizleri için taraması yapılan primer çiftinden 39 genomik ve 44 genik lokusun TM-1 ve Pima 3-79 hatları arasında polimorfik olduğu ve 9 CAPS-mikrosatellit lokusunun substitüsyon hatlarının tespiti ve teyidi çalışmalarında kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak 44 genik lokusun ikisi dışında geri kalanlarının kromozom lokasyonu önceki çalışmalarla ortaya konmamıştır. Bu durum çalışmada toplam 41 lokusun substitüsyon hatlarının tespiti ve teyidi için kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmada kromozom substitüsyon hatlarının teşhisinde kullanılan lokuslar ve ait oldukları A/D alt genomları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelgenin (Çizelge 4.4) incelenmesi ile anlaşılacağı üzere toplam 41 lokustan 16 adedi pamuk genomunun A alt genomunda olup 1 - 13 kromozomlar üzerinde yer alırken geri kalan 25 lokus D alt genomunda yer alarak 14 - 26 kromozomlar üzerindedir. Allotetraploid pamuk türlerinde haploid kromozom sayısı 26 olup çalışmada kullanılan CS-B hatlarından CS-B03, CS-B08, CS-B09, CS-B10, CS-B13, CS-B19, CS-B20, CS-B21, CS-B23 ve CS-B24 bulunmamaktadır.

Çizelge 4. 4. Çalışmada kullanılan kromozom spesifik lokuslar

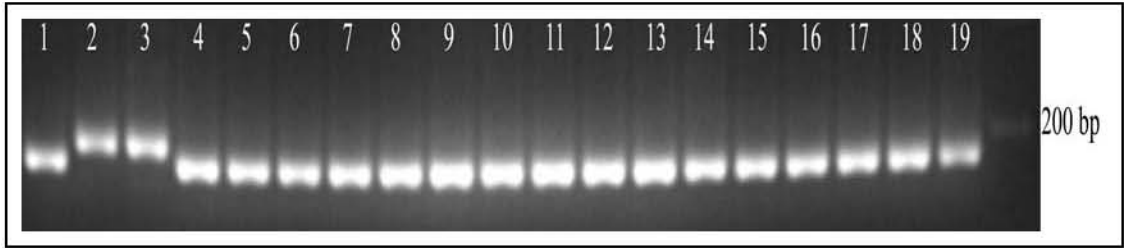
Lokus	CS-B Adı	Alt Genomu	Lokus	CS-B Adı	Alt Genomu
BNL1061	CS-B-17	D	BNL3806	CS-B-25	D
BNL1079	CS-B-18	D	BNL3873	CS-B-22Lo	D
BNL1434	CS-B-02	A	BNL3888	CS-B-01	A
BNL1597	CS-B-07	A	BNL3955	CS-B-17	D
BNL1606	CS-B-17	D	BNL3971	CS-B-02	D
BNL1679	CS-B-12Sh	A	BNL3995	CS-B-05Sh	A
BNL1721	CS-B-18	D	BNL4030	CS-B-22Sh	D
BNL2496	CS-B-17	D	BNL4041	CS-B-12Sh	A
BNL2544	CS-B-18	D	BNL4082	CS-B-15SH	D
BNL2571	CS-B-18	D	BNL448	CS-B-22Sh	D
BNL2572	CS-B-04	A	BNL542	CS-B-05Sh	A
BNL3065	CS-B-16	D	CIR141	CS-B-07	A
BNL3103	CS-B-25	D	CM63	CS-B-18	D
BNL3255	CS-B-04	A	CM66	CS-B-16	D
BNL3408	CS-B-17	D	MGAES-10	CS-B-15Sh	D
BNL341	CS-B-26Lo	D	MGAES-106	CS-B-26Lo	D
BNL3415	CS-B-07	A	BNL673	CS-B-22Sh	D
BNL3442	CS-B11Sh	A			
BNL3443	CS-B-14Sh	D	MUSB312	CS-B-05Sh	A
BNL3463	CS-B-22Sh	D	TMB1277	CS-B-06	A
BNL3792	CS-B-02	A	TMB154	CS-B-06	A

Çalışmada Çizelge 4.4'te gösterilen lokusların her biri 17 CS-B hattı, TM-1 ve Pima 3-79 genomik DNA örnekleri üzerinde taranmıştır. Tarama işlemlerinde Set 1 örnekleri Çizelge 4.4'te verilen örneklerde kullanılmışken, Set 2 ve Set 3 örnekleri seçilen bazı lokuslarda kullanılmıştır. Teyit işlemlerinde ise teyit edilecek hattın Set 1, Set 2 ve Set 3 örnekleri ile TM-1 ve Pima 3-79 genomik DNA örnekler kullanılmıştır. Bu yaklaşımla bir taraftan kullanılacak olan kimyasal ve emek etkin kullanılmış diğer taraftan da setler arasında var olabilecek genomik farklılık daha kolay ortaya konulabilmektedir.

4.6.1. SUB01'in belirlenmesi

SUB01'in (CS-B01) belirlenmesi için daha önceki literatür taramalarında elde edilen bilgiler doğrultusunda Gutierrez vd (2009) göre BNL3888 ve BNL1421 primer çifti ile oluşan lokusların allotetraploid pamuklarda birinci kromozom üzerinde olduğu ve bu lokuslardaki allellerin *G. hirsutum* L. ile *G. barbadense* L. arasında polimorfik olduğu bilinmektedir. Bu çalışma da bu lokuslarda bulunan allellerin *G. hirsutum* L. ile *G. barbadense* L.'nin teşhisinde kullanılabileceği teyit edilmiştir.

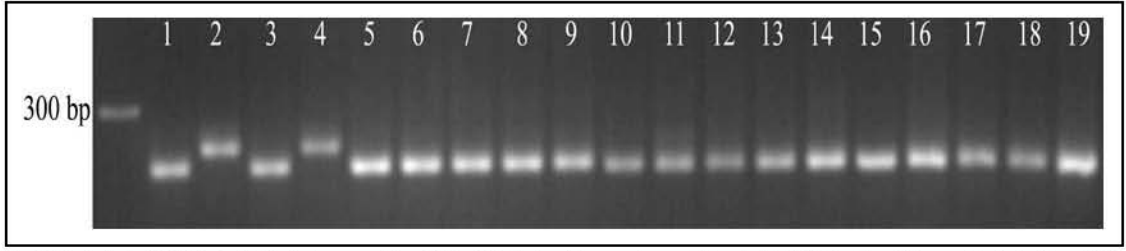
Yapılan analiz sonuçlarında Şekil 4.10’da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi CS-B01 hattı ile Pima 3-79 aynı profile sahip iken diğer bütün hatların farklı profillere sahip olduğu ve BNL3888 lokusunun 1 nolu kromozom üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Şekilde 1 nolu kuyucukta TM-1, 2 nolu kuyucukta Pima 3-79, 3 nolu kuyucukta CS-B01, 4 nolu kuyucukta CS-B02, 5 nolu kuyucukta CS-B04, 6 nolu kuyucukta CS-B05Sh, 7 nolu kuyucukta CS-B06, 8 nolu kuyucukta CS-B07, 9 nolu kuyucukta CS-B11Sh, 10 nolu kuyucukta CS-B12Sh, 11 nolu kuyucukta CS-B14Sh, 12 nolu kuyucukta CS-B15Sh, 13 nolu kuyucukta CS-B16, 14 nolu kuyucukta CS-B17, 15 nolu kuyucukta CS-B18, 16 nolu kuyucukta CS-B22Sh, 17 nolu kuyucukta CS-B22Lo, 18 nolu kuyucukta CS-B25, 19 nolu kuyucukta CS-B26Lo ve son kuyucukta DNA büyüklük markırı gösterilmektedir. Çalışmada BNL3888 lokusunu bir nolu kromozom üzerinde teyit edilmesi üzerine CS-B01 hattının daha fazla lokus kullanılarak teyit edilmesinin gereksiz olduğu kabul edilmiştir.



Şekil 4.10. BNL3888 lokusu ile CS-B01 hattının tespiti. 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 hatlarına ait genomik DNA örneklerinin amplifikasyon ürünleri ile son olarak DNA büyüklük markırı bulunmaktadır

4.6.2. SUB02'nin belirlenmesi

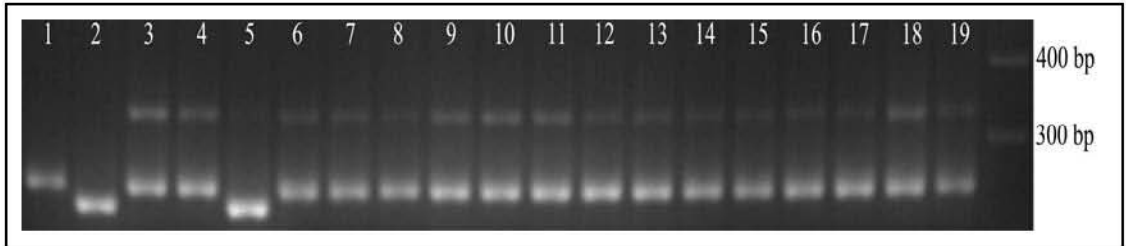
SUB02'in (CS-B02) belirlenmesi için daha önceki literatür taramalarından Gutierrez vd (2009) ve CMD kaynaklarına göre BNL1434 ve BNL3971 lokuslarının 2 nolu kromozom üzerinde bulunduğu ve bu lokuslardaki allellerin *G. hirsutum* L. ile *G. barbadense* L. arasında polimorfik olduğu bilinmektedir. Çalışmada bu durum teyit edilmiş ve BNL1434 lokusunun iki nolu kromozom tarafından taşındığı saptanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. BNL1434 lokusu ile CS-B02 hattının tespiti. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.3. SUB04'ün belirlenmesi

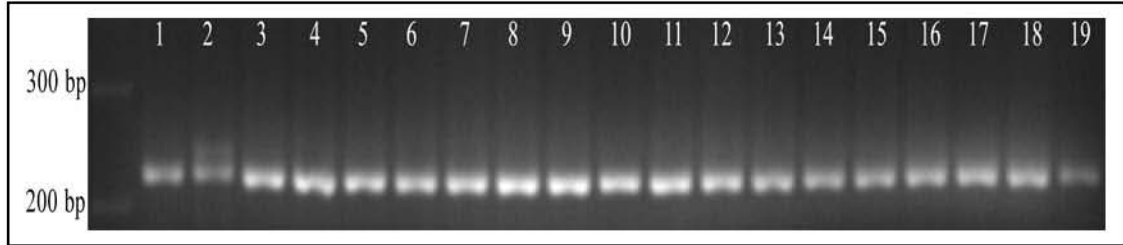
Buyyarapu vd (2011) göre BNL3255, BNL2572, MGAES-83 ve BNL3988 lokuslarındaki allellerin *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. arasında polimorfik olduğu bildirilmektedir. Yapılan analiz sonuçlarında Şekil 4.12'de BNL2572 lokusunun 4 nolu kromozom üzerinde bulunduğu ve CS-B04 hattının teşhisinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. BNL2572 lokusunu dört nolu kromozom üzerinde gözlemlendiği için ve daha önceki haritalama çalışmalarında bu lokusun dört nolu kromozom üzerinde olduğu rapor edildiğinden dolayı diğer lokuslar substitüsyon hatlarında kullanılmamıştır.



Şekil 4.12. BNL2572 lokusu ile CS-B04 hattının tespiti. 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. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.4. SUB05Sh'nin belirlenmesi

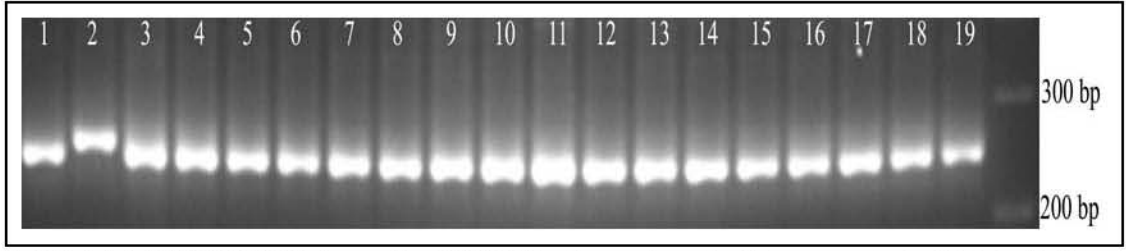
Gutierrez vd (2009) BNL3995, BNL0542 ve MUSB0312 nolu lokusların allotetraploid pamukların 5 nolu kromozomu üzerinde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında SUB05Sh'nin (CS-B05Sh) tespit edilebilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada SUB05Sh'nin tespiti için yapılan analizlerde başarı sağlanamamıştır. Örneğin Şekil 4.13'te MUSB0312 lokusunun 5 nolu kromozomda varlığına rastlanmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda BNL0542 ve BNL3995 lokusları da kullanılarak SUB05Sh hattı teyit edilememiştir. Ancak Saha vd (2012a) yaptıkları analizler sonucu SUB05Sh'nin varlığına rastlanmadığını rapor etmişlerdir, bu bulgu bizim sonuçlarımızla uyumludur. Bu durum CS-B hatlarından CS-B05Sh'nin yeniden oluşturulması gerektiğini göstermektedir. Daha önce birimizde yapılan çalışmalarda CS-B05Sh hattının diğer hatlardan farklı olarak daha önce çiçeklendiği tespit edilmiştir (M. Karaca, kişisel görüşmeler). Bu durum birimde bulunan CS-B05Sh tohumlarının yetiştirilerek elde edilen bireylerin analiz edilerek CS-B05Sh hattının belirlenmesi gerektiğini göstermektedir.



Şekil 4.13. MUSB0312 lokusu ile CS-B05Sh hattının tespit edilememesi. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.5. SUB06'nın belirlenmesi

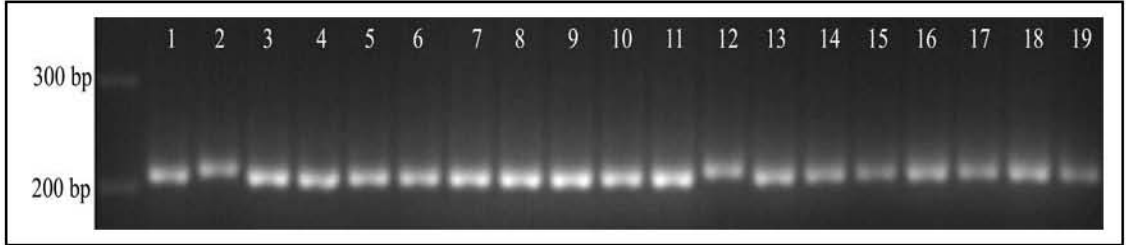
SUB06'nın (CS-B06) belirlenmesinde CMD verilerine göre MUSB0078, TMB1277 ve TMB0154 lokusları rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmada MUSB0078 lokusu allelleri *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L. ayırt edememiştir. Yapılan analizlerde TMB1277 (Şekil 4.14) ve TMB154 lokusları ile de SUB06 teyit edilememiştir.



Şekil 4.14. TMB1277 lokusu ile CS-B06 hattının tespit edilememesi. 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. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.6. SUB07'nin belirlenmesi

SUB07'nin (CS-B07) belirlenmesinde Gutierrez (2009) ve CMD verilerine göre BNL3415, BNL1597 ve CIR141 lokuslarının allotetraploid pamuğun yedinci kromozomu üzerinde bulunduğu rapor edilmiştir. Ancak yapılan analiz sonuçlarında CIR141 ve BNL3415 lokusları çalışmada kullanılan SUB07'nin üzerinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak Şekil 4.15'te gösterildiği üzere BNL1597 lokusu SUB15Sh'de (CS-B15Sh) üzerinde bulunduğu saptanmıştır.

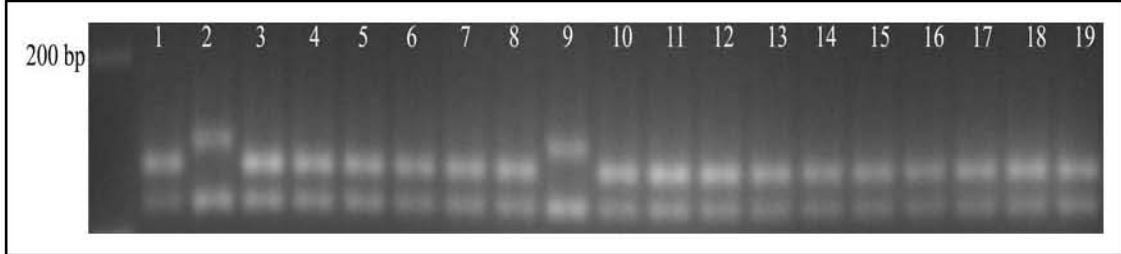


Şekil 4.15. BNL1597 lokusu ile CS-B07 hattı yerine CS-B15Sh hattının tespiti. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.7. SUB11Sh'nin belirlenmesi

SUB11Sh'nin (CSB-11Sh) teyit edilmesi için Gutierrez vd (2009) ve Buyyarapu vd (2011) BNL3411, BNL3442, BNL1034, MGAES-64 ve MGAES-78 lokuslarının pamuğun 11 nolu kromozom üzerinde olduğu bilgisinden yararlanılmıştır. Şekil

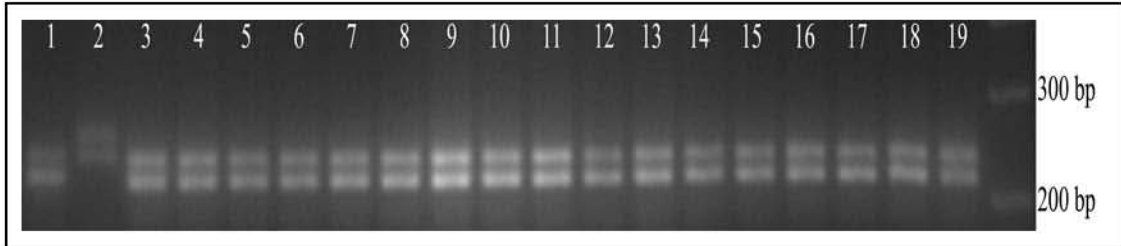
4.16’da BNL3442 lokusu kullanılarak SUB11Sh teyit edilebildiği gösterilmiştir. SUB11Sh’nin teyidi yapıldığı için BNL3411, BNL1034, MGAES-64 ve MGAES-78 lokusları çalışmada kullanılmamıştır.



Şekil 4.16. BNL3442 lokusu ile CS-B11Sh hattının tespiti. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.8. SUB12Sh’nin belirlenmesi

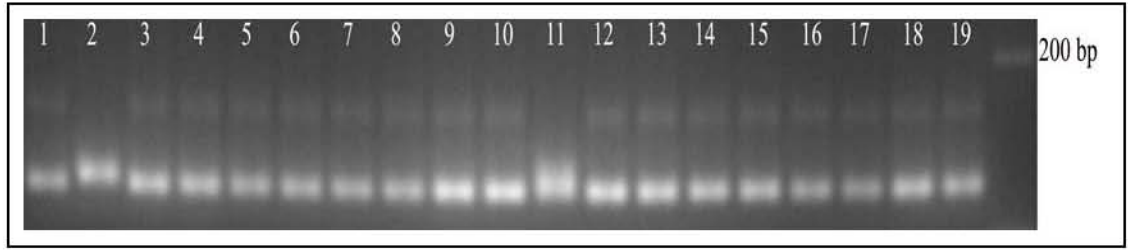
SUB12Sh’nin (CS-B12Sh) teyit edilmesi için yapılan kaynak taramalarında polimorfik ve TM-1 ve Pima 3-79 hatları arasında en az 10 baz çifti fark olan lokus BNL4041 olduğunu Gutierrez vd (2009) raporunda tespit etmiştir. Yapılan analiz sonuçlarında Şekil 4.17’de SUB12Sh’nin teyit edilemediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.17. BNL4041 lokusu ile CS-B12Sh hattının tespit edilememesi. 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. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.9. SUB14Sh'nin belirlenmesi

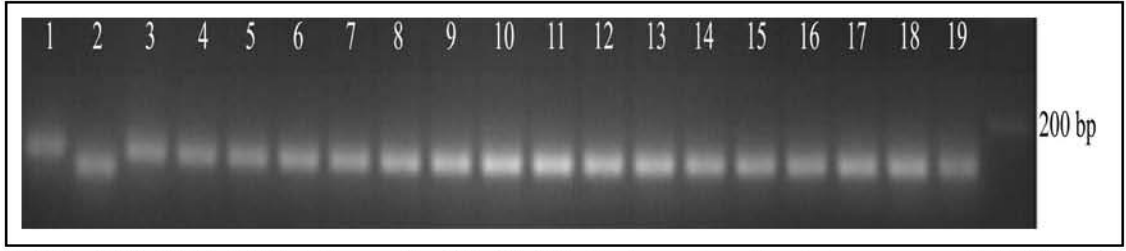
SUB14Sh'nin (CS-B14Sh) teyit edilmesinde literatür taramalarında Gutierrez vd (2009) tarafından rapor edilen BNL3443 lokusundan yararlanılmıştır. Yapılan çalışmalarda Şekil 4.18'de gösterildiği üzere BNL3443 lokusu ile SUB14Sh hattı tespit edilebilmiştir.



Şekil 4.18. BNL3443 lokusu ile CS-B14Sh hattının tespiti. 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. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.10. SUB15Sh'nin belirlenmesi

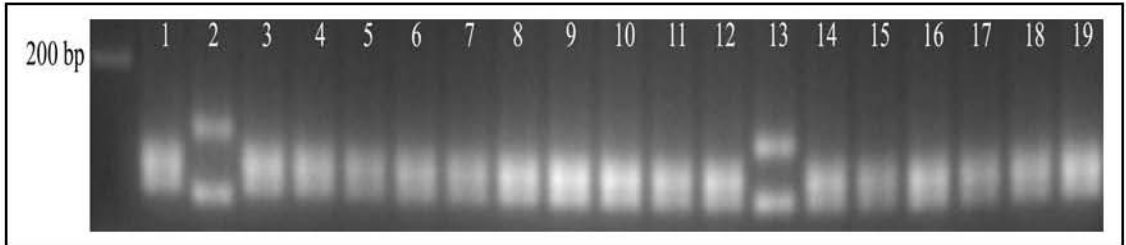
SUB15Sh'nin (CS-B15Sh) tespiti için Gutierrez vd (2009) ve Buyyarapu vd (2011) tarafından pamukta 15 nolu kromozom üzerinde olduğu belirtilen BNL4082 ve MGAES-10 lokusları kullanılmıştır. Çalışmada Şekil 4.19'da gösterildiği üzere BNL4082 lokusunun SUB15Sh hattının tespitinde kullanılabileceği belirlenmiştir. MAGES-10 lokusunun CS-B15Sh üzerinde olup olmadığının saptanması için yapılan çalışmada ilginç olarak bu lokusun çalışmada kullanılan CS-B25 hattında bulunduğu ortaya konulmuştur. Şekil Ek-33'te gösterildiği üzere MGAES-10 lokusunun CS-B hatlarının teşhisinde etkin olarak kullanılamayacağı bu çalışmada tespit edilmiştir. MAGES-10 lokusuna ait *G. hirsutum* L. allelleri Pima 3-79 allellerinden daha zayıf amplicon oluşturmakta ve bu durum da MAGES-10 lokusunun CS-B hatlarının teşhisinde kullanımını sınırlandırmaktadır.



Şekil 4.19. BNL4082 lokusu ile CS-B15Sh hattının tespit edilememesi. 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. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.11. SUB16'nın belirlenmesi

Yapılan literatür ve CMD kaynak taramalarında BNL3008 ve CM66 lokuslarının pamuk kromozomlarından 16 nolu kromozomun üzerinde buldukları tespit edilmiştir. Çalışmada Şekil 4.20'de gösterildiği üzere CM66 lokusun SUB16 (CS-B16) hattının tespitinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. İlgili şekilde görüleceği üzere CM66 lokusunda Pima 3-79 genomunda iki farklı allelin bulunduğu görülmekte olup bu allellerden büyük olanın CS-B16 hattının teşhisinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

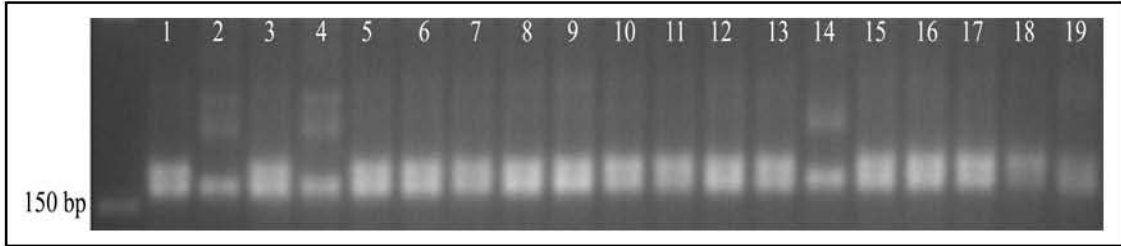


Şekil 4.20. CM66 lokusu ile CS-B16 hattının tespiti. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.12. SUB17'nin belirlenmesi

SUB17'nin (CS-B17) belirlenmesinde yapılan literatür taramalarında CMD ve Gutierrez vd (2009) tarafından BNL1606, BNL1061, BNL3955, BNL3408 ve BNL2496 lokuslarının allotetraploid pamuklarda 17 nolu kromozom üzerinde bulunduğu rapor edilmiştir. Şekil 4.21'de BNL3955 lokusunun CS-B17'nin tespitinde

kullanılabileceği gösterilmektedir. Şekilde Set 1 örnekleri kullanılarak oluşturulmuş alleller gösterilmektedir. Kuyucuk 2 ve 4 de görülen ancak 14 nolu kuyucukta bulunmayan allel çalışmada spesifik olmayan allel olarak tanınmış ve analize dahil edilmemiştir.

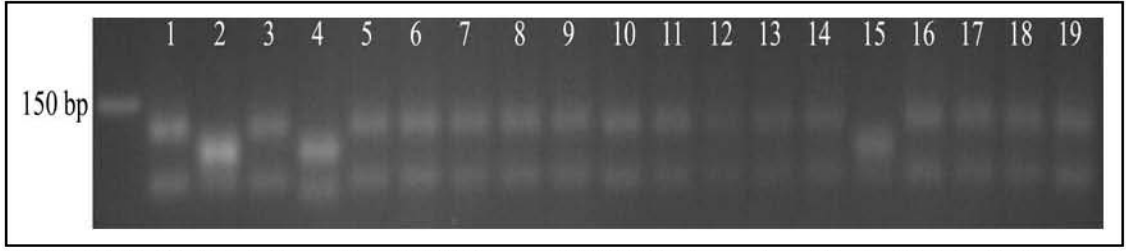


Şekil 4.21. BNL3955 lokusu ile CS-B17 hattının tespiti. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

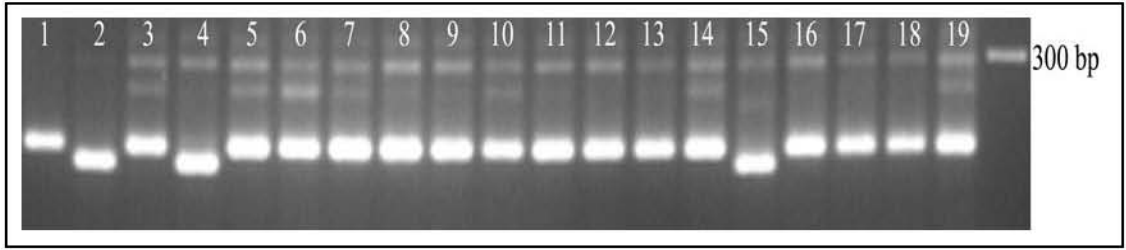
4.6.13. SUB18'in belirlenmesi

SUB18'in (CS-B18) teyit edilmesinde yapılan literatür ve CMD kaynak taramalarında ve Gutierrez vd (2009) verilerinde BNL2571, BNL1079, BNL2544, CM63 ve BNL1721 lokuslarının *Gossypium barbadense*'nin 18 nolu kromozomu üzerinde olduğu rapor edilmiştir. CM63 lokusunun substitüsyon hatlarının bulk ile Şekil 4.22'de gösterildiği üzere hem kromozom 18 üzerinde (CS-B18) hem de kromozom 2 (CS-B02) üzerinde olduğu saptanmıştır. CS-B hatları BNL2544 lokusu yönünden tarandığında bu lokusun da iki farklı kromozom üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Bu kromozomlar CM63 lokusunun bulunduğu kromozomlar olan 18 ve 2 nolu kromozomlardır (Şekil 4.22).

Çalışmada elde edilen verilere göre CM63 ve BNL2544 (Şekil 4.23) lokusları pamuk genomunda iki farklı kromozom üzerinde olduğu saptanmıştır. Ancak bu lokusların Set 1, Set 2 ve Set 3 genomik DNA örnekleri üzerinde tarandığında CS-B02 üzerinde bulunduğu bütün taramalarda teyit edilememiştir. Bu durum CS-B02 bitki hatları arasında CS-B18 genomik DNA karışımı veya bitki karışımı olabileceğini göstermektedir.



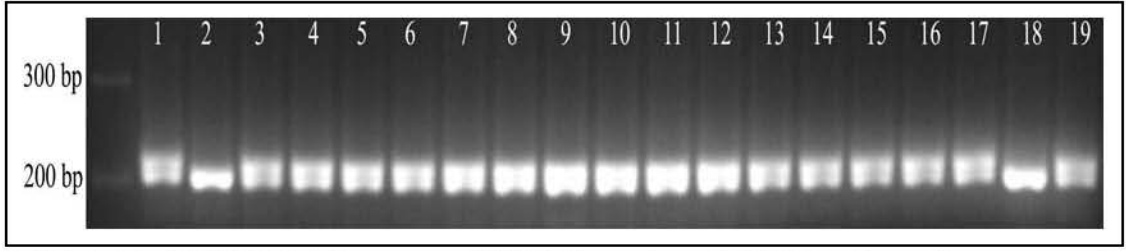
Şekil 4.22. CM63 lokusu ile CS-B02 ve CS-B18 hattının tespiti. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir



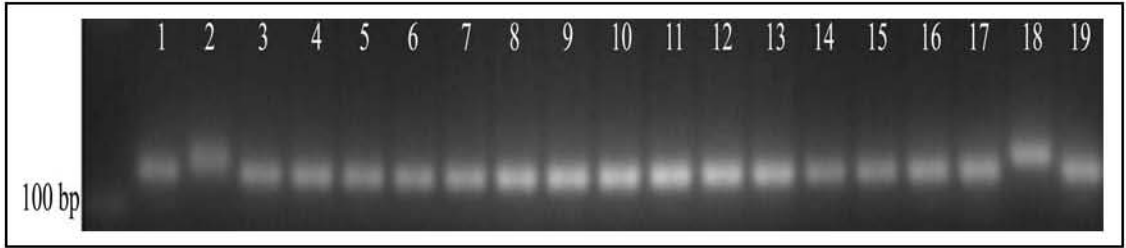
Şekil 4.23. BNL2544 lokusu ile CS-B02 ve CS-B18 hattının tespiti. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.14. SUB22Sh'nin belirlenmesi

SUB22Sh'nin (CS-B22Sh) tespitinde kullanılacak lokusların belirlenmesi için yapılan literatür taramalarında ve CMD kaynak araştırmalarında BNL0448, BNL0673, BNL3463, BNL4030 lokuslarının allotetraploid pamukların 22 nolu kromozomu üzerinde bulunduğu belirlenmiştir (Karaca 2001). Çalışmada BNL0448, BNL0673 ve BNL4030 lokuslarının CS-B22Sh olarak etiketlenmiş olan hattında bulunmadığı ancak CS-B25 olarak adlandırılan hattı üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.24'de BNL0448 ve Şekil 4.25'de BNL4030 lokuslarının ilginç bir şekilde CS-B25 hatlarında bulunduğu gösterilmektedir.



Şekil 4.24. BNL0448 lokusunun CS-B22Sh yerine CS-B25 hattında bulunması. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

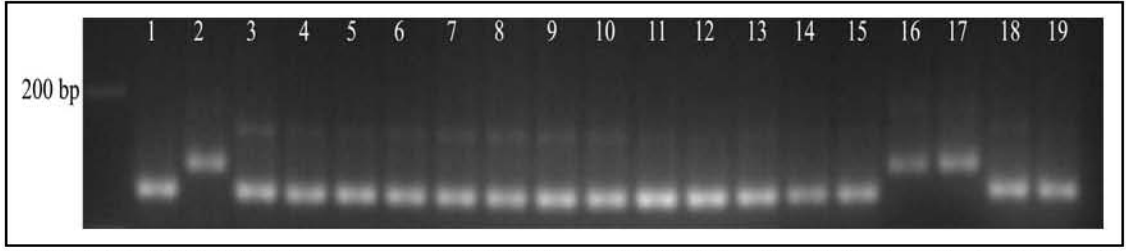


Şekil 4.25. BNL4030 lokusunun CS-B22Sh yerine CS-B25 hattında bulunması. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.15. SUB22Lo'nun belirlenmesi

SUB22Lo'nun (CS-B22Lo) teyit ve tespit edilmesi için yapılan literatür ve CMD kaynak taramalarında BNL3873 lokusunun kullanılabileceği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada BNL3873 lokusunun substitüsyon hatları üzerinde Şekil 4.26'da gösterildiği gibi bu lokusun allotetraploid pamukların 22 nolu kromozomu üzerinde olduğu ancak kromozom kolları açısından hem CS-B22Sh hem de CS-B22Lo üzerinde aynı amplikonları oluşturduğu gözlemlenmiştir.

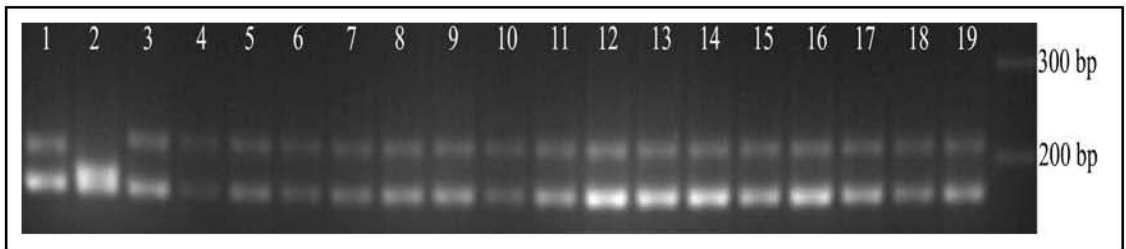
Bu durum çalışmada kullanılan CS-B22Sh ve CS-B22Lo hatlarında veya DNA örneklerinde karışım olabileceği düşüncesine neden olmaktadır. Bu durumu test etmek amacı ile çalışmanın ilerleyen dönemlerinde bazı ek çalışmalar gerçekleştirilmiş olup bu duruma daha ileri bölümlerde değinilmiştir.



Şekil 4.26. BNL3873 lokusunun CS-B22Sh ve CS-B22Lo üzerinde tespiti. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.6.16. SUB25'in belirlenmesi

SUB25'in (CS-B25) teyit edilmesi için yapılan literatür taramalarında ve CMD kaynak araştırmasında BNL3806 ve BNL3103 lokuslarının 25 nolu kromozom üzerinde olduğu belirlenmiştir. Çalışmada BNL3103 ve BNL3806 lokuslarının CS-B25 hattının teşhisinde kullanılmayacağı bu lokusların pamuk kromozomlarından 25 nolu kromozom üzerinde bulunmadığı veya çalışmada kullanılan CS-B22 hattında genetik veya fiziksel bir karışım durumunun söz konusu olabileceği öngörülmüştür. Şekil 4.27'de substitüsyon hatları üzerinde yapılan taramada BNL3806 lokusunun amplikon profili gösterilmiştir. İlgili şekilde görüleceği üzere BNL3806 lokusu Pima 3-79 hattını kesin olarak tespit ederken her hangi bir CS-B hattını teşhis edememektedir.

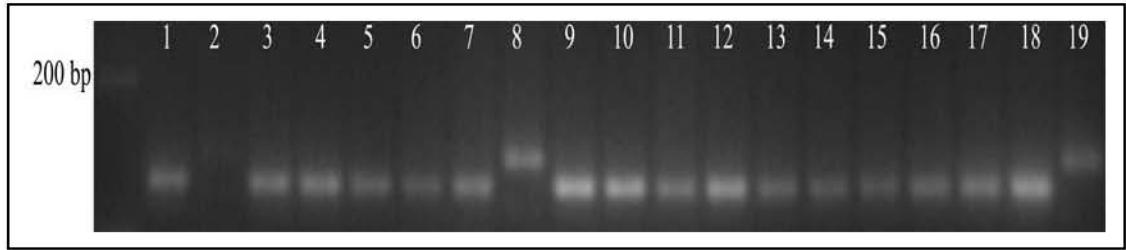


Şekil 4.27. BNL3806 lokusu ile CS-B25 hattının tespit edilememesi. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

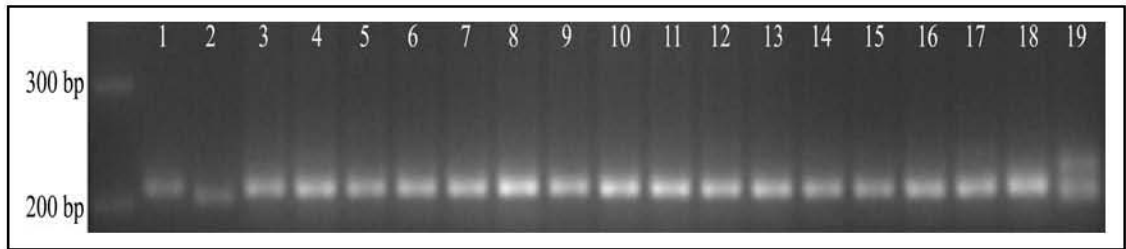
4.6.17. SUB26Lo'nun belirlenmesi

SUB26Lo'nun (CS-B26Lo) teyit edilmesi için yapılan literatür taramalarında ve CMD kaynak araştırmalarında BNL0341, BNL1277 ve MGAES-106 lokuslarının allotetraploid pamuk genomlarının 26 nolu kromozomu üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu alışmada Şekil 4.28'de gösterildiği üzere BNL0341 lokusunun kromozom substitüsyon hatlarından hem CS-B07 hem de CS-B26Lo üzerinde ampikon oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmada ayrıca MAGES-106 lokusunun literatür ve CMD kaynaklarında belirtildiği gibi allotetraploid pamuk genomunda 26 nolu kromozom üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.28. BNL0341 lokusu ile CS-B07 ve CS-B26Lo hatlarının tespit 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını gstermektedir



Şekil 4.29. MGAES-106 lokusu ile CS-B26Lo hattının tespit 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

4.17. Kromozom substitüsyon hatlarının değeriendirilmesi

Bu çalışmada literatür ve CMD kaynak bilgilerinin kullanımı ile bir taraftan her bir CS-B hattının tespit edilmesinin yanı sıra birimde bulunan CS-B hatları içerisinde herhangi bir genetik ve fiziksel karışımın var olup olmadığının tespiti de amaçlanmıştır.

Çalışmanın bir taraftan daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen bilgilerin kullanılması yönü ile önceki çalışmalara bağlı olması diğer taraftan da birimde bulunan CS-B hatlarının genetik içeriği ve çalışma sırasında önlenememiş hataları kapsama ihtimali bulunmaktadır. Bu bağlamda 1) daha önce başka bilim çevreleri tarafından ortaya atılan bulgularda hata bulunması, 2) çalışmada kullanılan CS-B hatlarının genetik değışmelere uğramış olması (mutasyon, translokasyon, somatik translokasyon), 3) CS-B hatlarında fiziksel karışımın bulunabilmesi ve 4) laboratuvar çalışmalarında hatanın bulunması gibi konuların titizlikle göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

İlgili literatür kaynakları tarandığında çalışmada kullanılan lokusların kromozom lokasyonları, allel sayıları ve allel boyları arasında bazı farklılıklar bulunduğu bilinmektedir. Bu durum bazı farklılıkların özellikle çalışmaların analizlerinde kullanılan allel ayırım tekniklerinden kaynaklandığını göstermektedir. Örneğin bazı çalışmalarda kapiler elektroforez (KE) tekniği kullanılırken bazılarında poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) veya agaroz jel elektroforez (AJE) ayırıştırma teknikleri kullanılmış, bu nedenle literatürler arasında allel sayısı ve büyüklüğü bakımından farklılık görülmektedir.

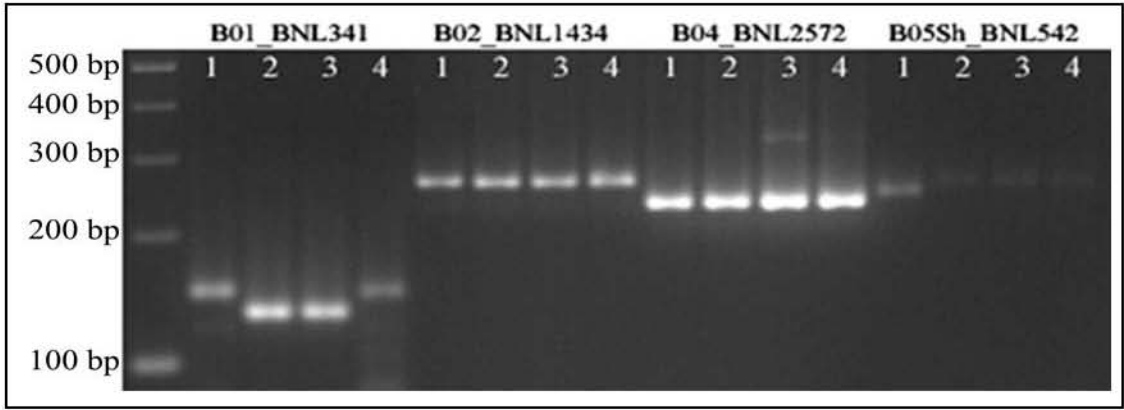
Çalışmada kullanılan CS-B hatlarının 3 farklı yetiştirme döneminde incelenmesi ile TM-1 ve Pima 3-79 arasında belirgin farklılıkların bulunduğu TM-1 hattının daha fazla koza verimine sahip olduğu ancak bazı TM-1 bitkileri arasında çiğitte hav oluşum yönünden bazı farklılıkların olduğu morfolojik olarak saptanmıştır. TM-1 bitkilerinden elde edilen DNA profilleri arasında az da olsa farklılıkların olduğu bu çalışma kapsamında saptanmıştır.

Pima 3-79 hattının bitki morfolojisi ve genetik yönden farklı olmadığı yine morfolojik ve genetik çalışmalar ile belirlenmiştir. Diğer taraftan çiçeklenme dönemleri yönünden TM-1 ile Pima 3-79 arasında 15-20 günlük bir fark görülmüştür. CS-B hatları morfolojik yönden incelendiğinde CS-B05Sh hattının diğer CS-B hatlarına göre daha erken ve daha fazla çiçek açtığı gözlenmiştir. CS-B16 hattının yaprak rengi yönünden diğer hatlara oranla biraz daha açık yeşil renkli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca CS-B16 hattında bazı bitkilerde belirgin olarak çiçeklerin mum aşama döneminde dişicik tepesinin dışarıda olduğu gözlenmiştir. CS-B11Sh hattının özellikle olgun yaprak yüzeyinin genişliği diğer substitüsyon hatlarından ve ebeveynlerinden daha fazla olduğu yine morfolojik gözlemlerde belirlenmiştir.

Çalışmada TM-1, Pima 3-79 ve 17 CS-B hattından farklı yetiştirme döneminde toplu yaprak örnekleri ve son yetiştirme döneminde ise teksel olarak iki farklı yaprak örnekleri toplanmış ve analiz edilerek TM-1, Pima 3-79 ve CS-B hatlarında bulunan bitkiler genetik yönden araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre Pima 3-79 hattına ait bitkilerin genetik açıdan aynı olduğu ve bu hatta özgü markırların CS-B hatlarının teşhisinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

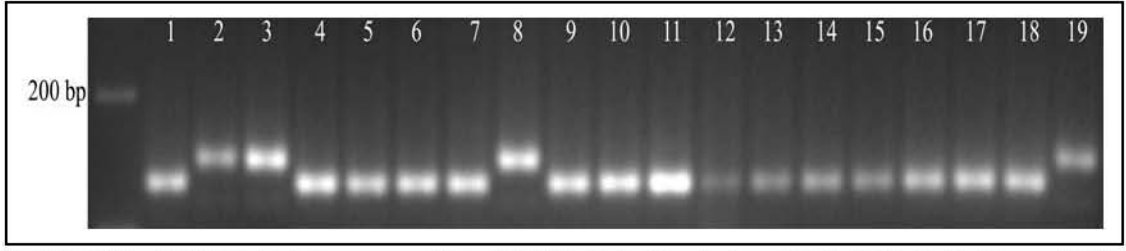
CS-B01 hattı literatür ve CMD kaynak verileri doğrultusunda teyit edilmiş olmasına rağmen bazı CS-B01 hattı bitkilerinin CS-B07 ve CS-B26Lo lokuslarını da içerdiği gözlenmiştir. Bu durum CS-B01 hattı içerisinde diğer hatlardan (CS-B07 ve CS-B26Lo) bitki materyali karışımının bulunabileceği veya diğer CS-B hatlarında beklenen lokusların CS-B01 hattında da olduğu, mayoz veya mitoz bölünme sırasında translokasyonlardan kaynaklanan genetik durumun bulunabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Şekil 4.30'da BNL0341 lokusu yönünden CS-B01 hattı bitkileri arasında tespit edilen translokasyon veya genetik karışım gösterilmektedir. BNL0341 lokusu daha önceki yapılan çalışmalarda allotetraploid pamuk genomunun 26 nolu kromozom üzerinde olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada ise BNL0341 lokusunun 26 nolu kromozomda bulunduğu teyit edilmesine rağmen 7. kromozomda ve hatta 1. kromozomda da bulunabileceği gözlenmiştir (Şekil 4.31 ve Çizelge 4.5). Ancak bu durumun ileriki çalışmalarla teyit ve tespit edilmesi gerekmektedir.

CS-B02 hattının genetik yönden bir karışım içermediği (Şekil 4.30) bu çalışmada tespit edilmiştir. CMD kaynaklarında BNL1434 lokusunun CS-B02 hattının teşhisinde kullanılabileceği rapor edilmiş ve yapılan analiz sonuçlarında BNL1434 lokusunun Set 1, Set 2 ve Set 3 yaprak örneklerinden elde edilen genomik DNA kullanıldığında CS-B02 hattının tespit edildiğini ve BNL1434 ve BNL3971 lokuslarının CS-B02 hattının tespitinde kullanılabileceği saptanmıştır (Çizelge 4.5). Ancak birimizde bulunan CS-B02 hattına fiziksel olarak diğer hatlardan karışım olabileceği ve bu nedenle ileriki çalışmalarda CS-B02 hattının önce bu çalışmada belirlenen lokuslar kullanılarak teyit edildikten sonra kullanılmasının gerektiği belirlenmiştir.



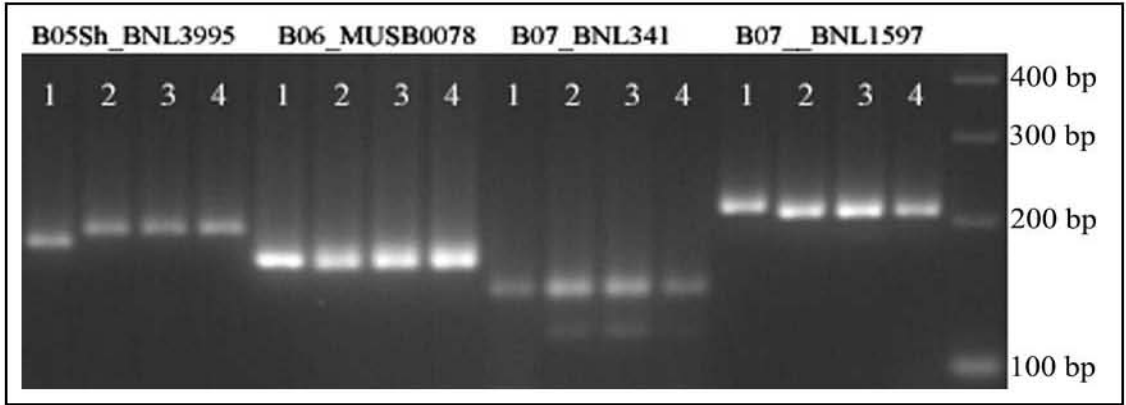
Şekil 4.30. CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL0341, BNL1434, BNL2572 ve BNL0542 lokusları yönünden karşılaştırılması. Kuyucuklar 1: Pima 3-79, 2: Set 1, 3: Set 2, 4: Set 3. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını içermektedir

CS-B04 hattına ait bitkiler arasında genetik ve fiziksel karışımın var olmadığı (Çizelge 4.5) ancak literatürde belirtildiği üzere BNL3255 lokusunun çalışmaya dahil edilen CS-B04 bitkileri üzerinde bulunmadığı tespit edilmiştir. Diğer bazı CS-B04 hatları üzerinde bulunabileceği ancak BNL2572 lokusunun CS-B04 hattının bazı bireylerinde bulunduğu ve bu lokusun CS-B04 hattının teşhisinde kullanılabileceği saptanmıştır (Çizelge 4.5).



Şekil 4.31. BNL0341 lokusunun 3 farklı CS-B hattında tespiti. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

CS-B05Sh hattına ait bitkiler arasında herhangi bir genetik veya fiziksel karışımın bulunmadığı (Şekil 4.32) ancak literatürde verilen MUSB0312 lokusunun CS-B05Sh'nin tespit edilemeyeceği (Çizelge 4.5) belirlenmiştir.



Şekil 4.32. CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksele örneklerin genomlarının BNL3995, MUSB0078, BNL0341 ve BNL1517 lokusları ile karşılaştırılması. Kuyucuklar 1: Pima 3-79, 2: Set 1, 3: Set 2, 4: Set 3. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını içermektedir

CS-B06 hattı bitkileri arasında herhangi bir fiziksel veya genetik karışım saptanamamasına rağmen literatür verilerinde öngörülen TMB1277 ve TMB0154 lokusları açısından teyit edilememiştir (Şekil 4.32). Ancak çalışmanın ileriki alt bölümünde verildiği üzere CS-B06 hattını teşhis edebilecek yeni MK lokusları saptanabilmiştir.

CS-B07 hattı bitkileri arasında yine genetik veya fiziksel bir karışım belirlenmemiş ancak literatür verilerinde belirtilen lokusların varlığı saptanamamıştır. Diğer taraftan 26 nolu kromozom üzerinde bulunan BNL0341 lokusunun CS-B07 hattının her 3 set örneğinde de bulunduğu bu çalışma ile ortaya konulmuş (Çizelge 4.5) ve fiziksel-genetik karışım ya da translokasyon olabileceği tahmin edilmektedir. Ancak bu durumun kesin olarak açıklanabilmesi için daha fazla markırın kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Literatürde CS-B07 hattının teşhisi için rapor edilen BNL1597 lokusu substitüsyon hatlarında taranması ile CS-B15Sh'de Pima 3-79 alleli oluşturduğu gözlemlenmiş ve Şekil 4.33'te her üç set örnekte de bu durum gözlemlendiği için CS-B15Sh olarak etiketlenmiş hattın CS-B07 olabileceği öngörülmüştür.

CS-B11Sh hattına ait bitkiler arasında herhangi bir genetik ve fiziksel karışımın bulunmadığı (Şekil 4.33), literatürde verilen BNL3442 lokusunun Set 1, Set 2 ve Set 3 örnek setlerinde tespit edildiği saptanmıştır.

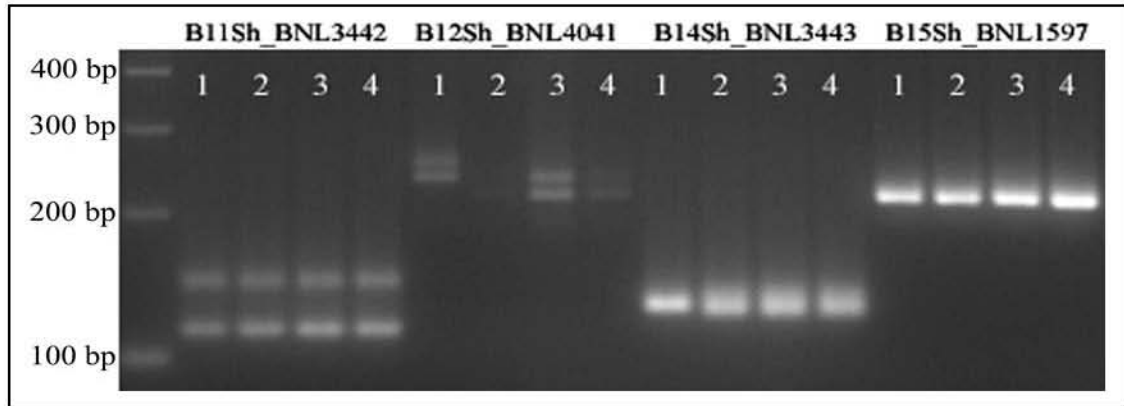
CS-B12Sh hattına ait bitkiler arasında genetiksel ve fiziksel karışım tespit edilmemiş (Şekil 4.33) ancak literatür verileri doğrultusunda BNL4041 ve BNL1679 lokusu ile yapılan çalışmalarda bu hattın teşhisi yapılamamıştır.

CS-B14Sh hattı bitkilerinin genetik veya fiziksel açıdan karışım içermediği (Şekil 4.33) tespit edilmiştir. Literatürde rapor edilen BNL3443 lokusu CS-B14Sh hattının 3 set örneğinde de kullanılarak bu hattın teşhisi yapılmıştır.

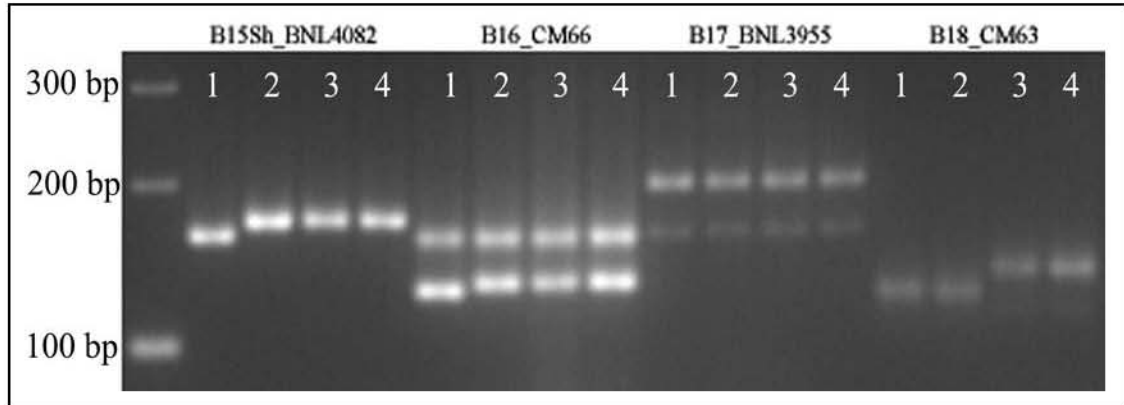
CS-B15Sh hattı içerisinde incelenen bitkiler arasında herhangi bir genetik ve fiziksel karışıklığın bulunmadığı (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34) tespit edilmiş olmasına karşın literatürde verilen BNL4082 lokusunun CS-B15Sh hattını teşhis edemediği gözlemlenmiştir.

CS-B16 hattı içerisinde incelenen bitkiler arasında herhangi bir genetik ve fiziksel karışıklığın bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.34). Çalışmada CS-B16 hattının CM66 ve BNL3065 lokusları kullanılarak tespit edilebileceği belirlenmiştir.

CM66 lokusu CS-B16 hattının 3 set örneğinde de aynı sonucu vermesine karşın BNL3065 lokusu Set 1 örneğinde CS-B02 ve CS-B16 arasında fiziksel yada genetik bir karışıklığın (Şekil Ek-35) olabileceğini gösterirken Set 2 örneğinde (Şekil Ek-34) sadece CS-B16 üzerinde bulunduğu gözlemlenmiştir.



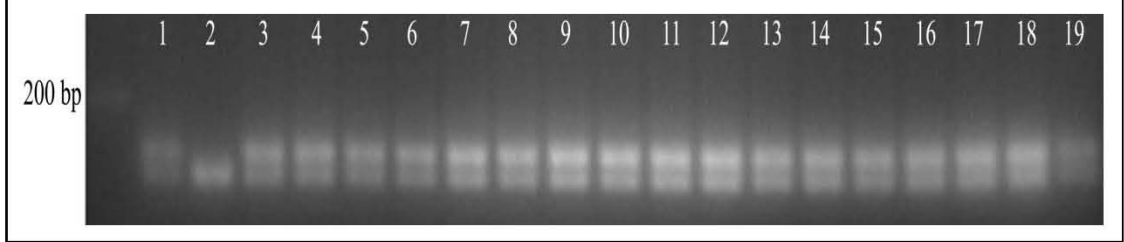
Şekil 4.33. CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL3442, BNL4041, BNL3434 ve BNL1597 lokusları ile karşılaştırılması. Kuyucuklar 1: Pima 3-79, 2: Set 1, 3: Set 2, 4: Set 3. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını içermektedir



Şekil 4.34. CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL4082, CM66, BNL3955 ve CM63 lokusları ile karşılaştırılması. Kuyucuklar 1: Pima 3-79, 2: Set 1, 3: Set 2, 4: Set 3. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını içermektedir

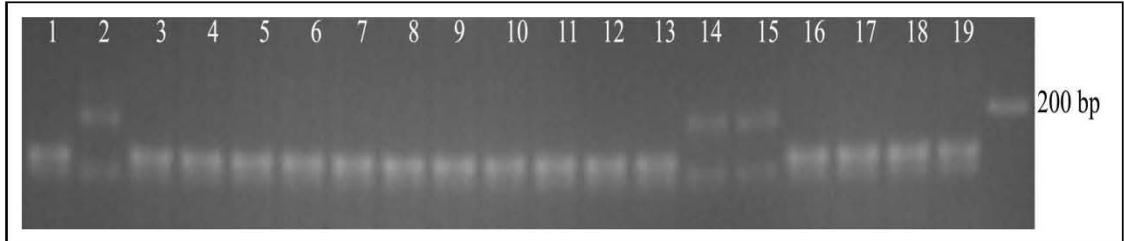
CS-B17 hattına ait bazı bitkilerde genetik veya fiziksel karışımın varlığı tespit edilmiştir. Literatür taramalarında ve CMD kaynaklarında BNL1061, BNL1606, BNL2496, BNL3408 ve BNL3955 lokuslarının CS-B17 hattının tespitinde kullanılabileceği rapor edilmiştir. Ancak substitüsyon hatları üzerinde yapılan taramalar sonucunda bu lokusların bir kısmı CS-B17 hattı bireylerinin tespitini

yaparken diğ er bir kısm ı ile tespit edilememiştir. Örneğ in Ş ekil 4.35'te gösterildiğ i üzere BNL1061 lokusu set ö rneklerinin bir kısm ında CS-B17 hattını tespit edememiştir.



Ş ekil 4.35. BNL1061 lokusu ile CS-B17 Set 2'de tespit edilememesi. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

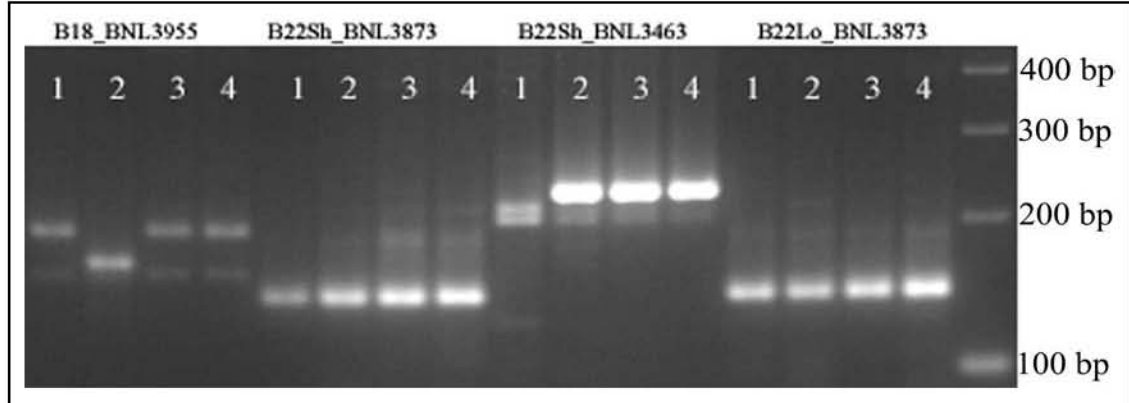
Diğ er taraftan literatürde verilen BNL3955 lokusu set ö rneklerinde hem CS-B17 hem de CS-B18 hatlarında tespit edilmiştir (Ş ekil 4.36). Ancak BNL1079 ve BNL2571 lokusları ile CS-B18 hattı bireylerinin bir kısm ı teş his edilememiştir.



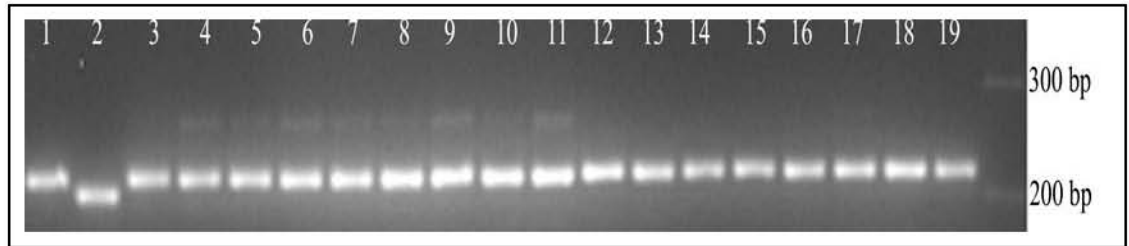
Ş ekil 4.36. BNL3955 lokusu ile CS-B17 ve CS-B18 hatlarının tespiti. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

CS-B18 hattına ait bazı bitkilerin CS-B17 ve CS-B02 hattı bireylerinin fiziksel karış ım iç erdiğ i tespit edilmiştir (Ş ekil 4.37). CMD kaynaklarında CM63 lokusunun CS-B18 hattının tespitinde kullanılabileceğ i rapor edilmiştir. Substitüsyon hatlarının her üç set DNA ö rnekleri kullanıldığında CM63 lokusu sadece Set 1 ö rneğ inde CS-B02 ve CS-B18 hatlarını teş his etmiştir. Diğ er taraftan farklı setler kullanıldığında

BNL2544 ve CM63 lokusu yönünden CS-B18 hattı sadece Set 1 örneğinde teşhis edilmiş olup Set 2 ve Set 3 örneklerinde teşhis edilememiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.37. CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksele örneklerin genomlarının BNL3955, BNL3873, BNL3463 ve BNL3873 lokusları ile karşılaştırılması. Kuyucuklar 1: Pima 3-79, 2: Set 1, 3: Set 2, 4: Set 3. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını içermektedir



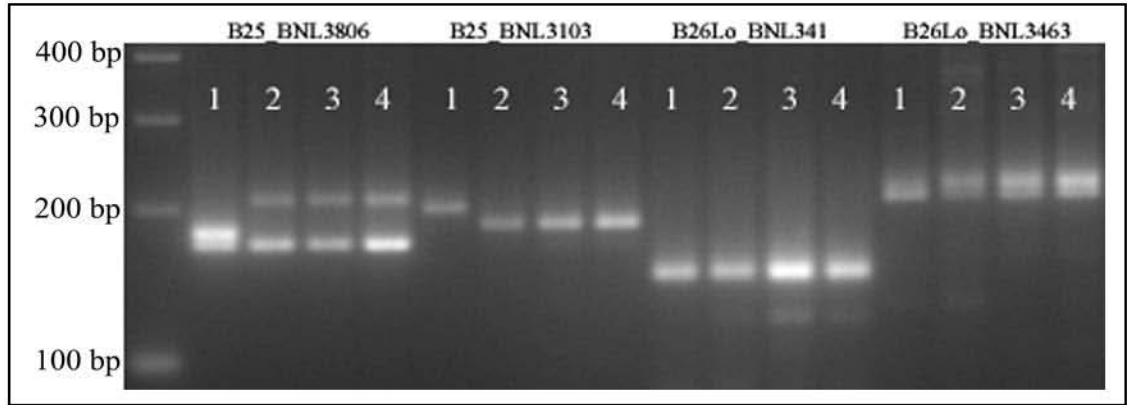
Şekil 4.38. BNL2544 lokusu ile CS-B18 hattının Set 2’de tespit edilememesi. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

Çalışmada elde edilen veriler ışığında CSB-22Sh hattı için literatür bilgilerine göre kullanılan lokuslar CS-B25 olarak etiketlenmiş olan hattı teşhis etmiştir. Bu durum BNL0448, BNL0673 ve BNL4030 lokusları kullanılarak CS-B25 olarak etiketlenmiş olan hattın CS-B22Sh olduğunu göstererek CS-B22Sh hattının teşhisi yapılmıştır. BNL0673 lokusuna ait allellerin aynı zamanda CS-B02 hattına ait bazı bireylerde görülmesi üzerinde CS-B02 hattının bazı bireylerinde CS-B22Sh ile karışmış olduğu öngörülmüştür (Şekil Ek-45).

CS-B22Lo hattı BNL3873 lokusu ile teşhis edilirken bu lokusun aynı zamanda CS-B22Sh olarak etiketlenmiş hattında da bulunduğu belirlenmiş ve CS-B22Sh hattı ile CS-B22Lo arasında fiziksel veya genetik bir karışımın olabileceği düşünülmüştür (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.37).

Çalışmada CS-B25 olarak etiketlenen hattın bütün örnek setlerinde ve CS-B22Sh'nin teşhisinde kullanılan lokusların bu hat üzerinde bulunmasından dolayı CS-B25'in CS-B22Sh olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yine literatür taramalarında ve CMD kaynaklarından edinilen bilgi doğrultusunda CS-B25 hattı için kullanılan BNL3103 ve BNL3806 lokusları kullanılarak CS-B25 hattını tespit edilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.39).

Çalışmada CS-B26Lo hattına ait bireylerde fiziksel veya genetik karışımın olduğu ancak bu hattın teşhis edilebilirliği belirlenmiştir. Buyyarapu vd (2011) genik MGAES-106 mikrosatellit lokusunun CS-B26Lo hattının tespitinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Analizlerde bu lokus kullanılarak CS-B26Lo hattının tespiti sağlanmıştır.



Şekil 4.39. CS-B hatlarının elde edilen bulk ve teksel örneklerin genomlarının BNL3806, BNL3103, BNL0341 ve BNL3463 lokusları ile karşılaştırılması. Kuyucuklar 1: Pima 3-79, 2: Set 1, 3: Set 2, 4: Set 3. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını içermektedir

Çizelge 4.5. CS-B hatlarının lokus içerikleri yönünden karşılaştırılması

LOKUS	SUBSTITÜSYON HATLARI (CS-B)																
	01	02	04	05Sh	06	07	11Sh	12Sh	14Sh	15Sh	16	17	18	22Sh	22Lo	25	26Lo
BNL0448														L		2	
BNL0542				L													
BNL0673		1												L		1,2	
BNL1061												L					
BNL1079													L				
BNL1434		1,2,3,L															
BNL1597						L			1,2,3								
BNL1606												L					
BNL1679								L									
BNL1721		1											1,L				
BNL2496		1										1,2,L	1,2				
BNL2544		1											1,L				
BNL2571													L				
BNL2572			1,2,3,L														
BNL3065		1									1,2,L						
BNL3103		1														L	
BNL3255			L														
BNL3408		1										1,2,L	1,2				
BNL0341	3					1,2,3											1,2,3,L
BNL3415						L											
BNL3442							1,2,3,L										
BNL3443								1,2,3,L									
BNL3463													L				1,2,3
BNL3792		1,L															
BNL3806																	L
BNL3873													1,2,3	1,2,3,L			
BNL3888	2,L																
BNL3955		1										1,2,3,L	2,3				
BNL3971		1,2,L															
BNL3995				L													
BNL4030													L			2	
BNL4041								L									
BNL4082									L								
CIR141						L											
CM63		1											1,L				
CM66											1,2,3,L						
MGAES-106																	2,L
MUSB312				L													
TMB1277					L												
TMB154					L												

1: Set 1, 2: Set 2, 3: Set 3, L: Literatür

4.8. MK Lokuslarının Kromozomlarının Tespiti

Genlerin ve DNA markırlarının kromozom üzerindeki lokuslarının (yerlerinin) tespitinde (fiziksel haritalama), Bakteri Yapay Kromozomu (BAC), “Fluorescence *in situ* hybridization” FISH, monosomik ve nullisomik hatlar (kromozom veya kromozom kolları delesyon hatları) en yaygın kullanılan yöntemlerdir (Guo vd 2008).

Aynı BAC üzerinde bulunan gen veya markırlar ilgili genler arasındaki fiziksel uzaklığı gösterirken, monosomik, monotelosomik hatların kullanımı ile de gen ve lokusların kromozom lokasyonları tespit edilmektedir. FISH tekniği oldukça etkin bir yöntem olmakla birlikte yoğun floresan etiketleme ve sitolojik çalışmalara gereksinimi bakımında kullanımı sınırlıdır.

Kromozom veya kromozom kolları delesyon hatlarının kullanımı ise bu hatların vejetatif çoğaltma zorunluluğunun bulunması ve dolayısıyla alt yapı gerektirmesi bakımından dezavantajlıdır.

Günümüze değin yapılan çalışmalarda kromozom delesyon hatları kullanılarak RFLP, SSR ve AFLP markırlarının kromozom lokasyonları tespit edilmiştir (Liu vd 2000, Ulloa vd 2005, Mayers vd 2009). Diğer taraftan kromozom substitüsyon hatları gen veya DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının tespiti açısından etkin bir materyal olabilir.

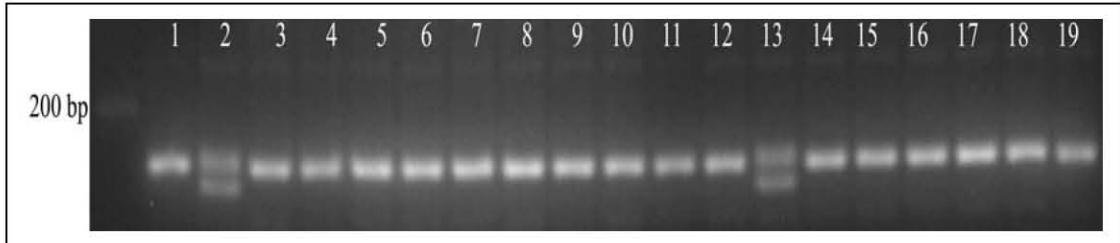
Bu çalışmada CS-B hatları kullanılarak diğer araştırmacılar tarafından tespit edilmiş olan DNA markırları kullanılmış ve kromozom lokasyonları bilinmeyen DNA markırlarının kromozom lokasyonları tespit edilebilmiştir.

MK primer çiftleri ile elde edilen bazı DNA markırları ve CAPS-mikrosatellit markırlarının kromozom lokasyonları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Bu tür yaklaşım kullanılarak sayısı on yedi binin üzerindeki pamuk moleküler markırlarının kromozom lokasyonlarının tespitinin mümkün olduğu bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

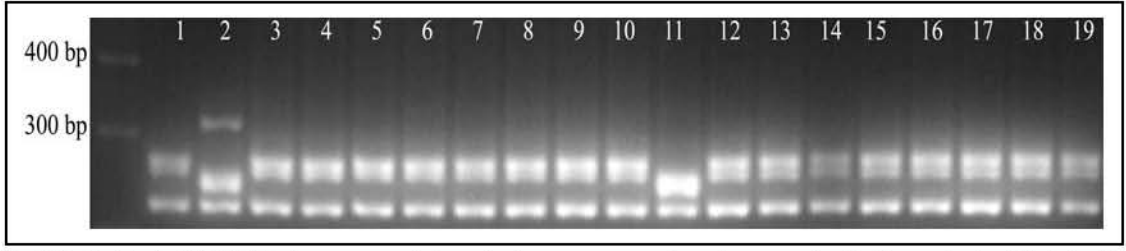
Çizelge 4.6. CS-B hatları kullanılarak DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının tespiti

Markır Adı	CS-B Hattı	Markır Adı	Kromozom/Kromozom Kolu
BNL3888	CS-B01	MK037	H01
BNL1434 BNL3971	CS-B02	MK048-CAPS- <i>Hae</i> III MK101-CAPS- <i>Rsa</i> I	H02
	CS-B06	MK040 MK130 MK156	H06
BNL3442	CS-B11Sh	MK043	11Sh
BNL3443	CS-B14Sh	MK062 MK143	14Sh
BNL3065 CM66	CS-B16	MK064 MK068 MK139	H16
BNL2496 BNL3408 BNL3955	CS-B17	MK019	H17
BNL673 BNL4030 BNL448	CS-B22Sh	MK041 MK051	22Sh
MGAES-106 BNL341	CS-B26Lo	MK138	26Lo

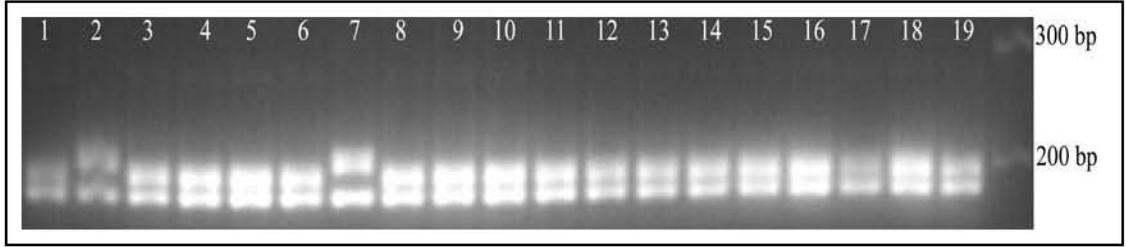
Çalışmada MK lokuslarının kromozomal konumlarının tespitinde TM-1, Pima 3-79 ve 17 CS-B hattı kullanılmış ve bazı MK lokuslarının kromozom konumları tespit edilmiştir (Şekil 4.40 -Şekil 4.45).



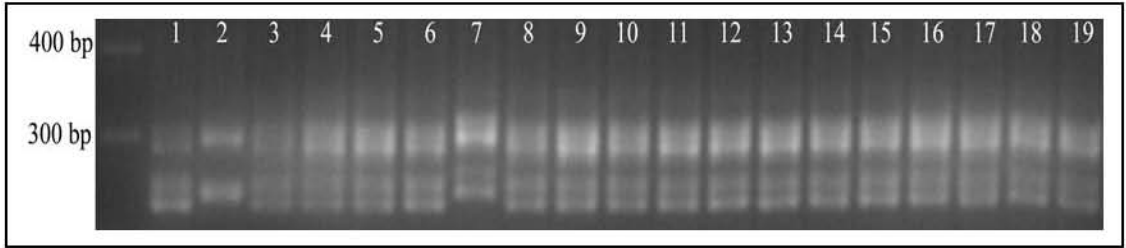
Şekil 4.40. MK068 lokusunun 16 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir



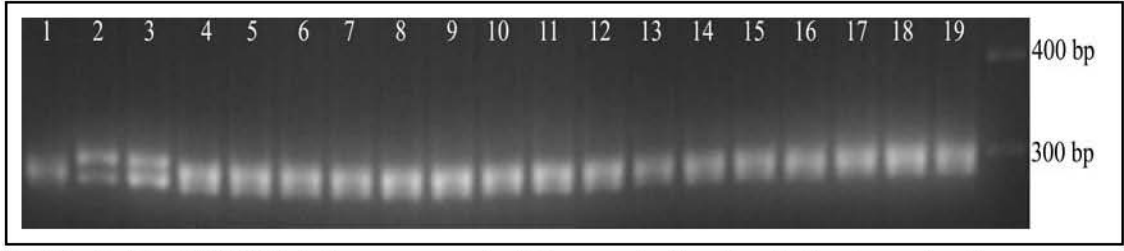
Şekil 4.41. MK062 lokusunun 14 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir



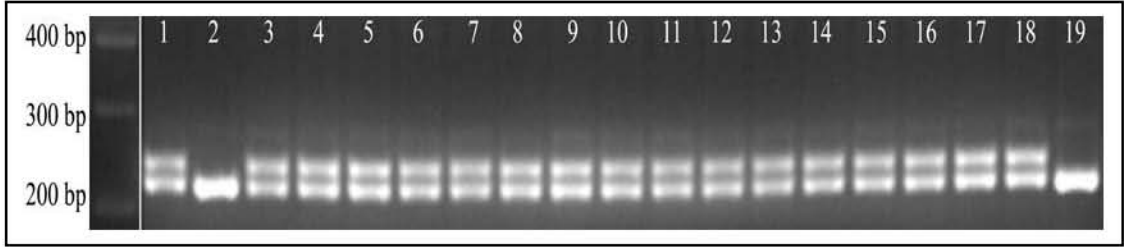
Şekil 4.42. MK040 lokusunun 6 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir



Şekil 4.43. MK130 lokusunun 6 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

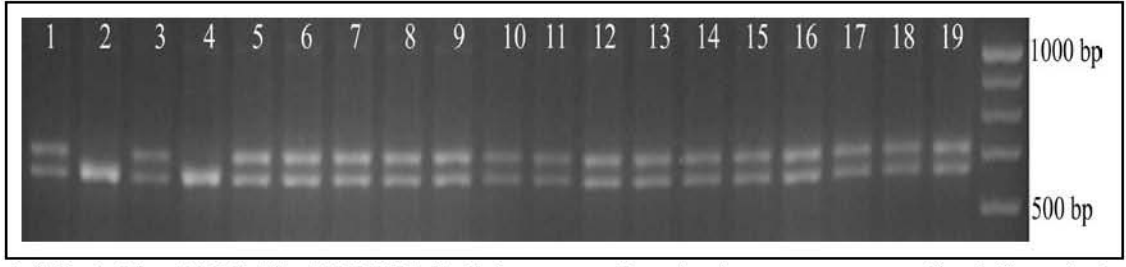


Şekil 4.44. MK037 lokusunun substitüsyon hattı üzerinde 1 nolu kromozoma yerleştirilmesi MK037 lokusunun 1 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi. 1: TM-1, 2: Pima 3-79, 3: CS-B01, 4: CS-B02, 5: CS-B04, 6: CS-B05Sh, 7: CS-B06, 8: CS-B07, 9: CS-B11Sh, 10: CS-B12Sh, 11: CS-B14Sh, 12: CS-B15Sh, 13: CS-B16, 14: CS-B17, 15: CS-B18, 16: CS-B22Sh, 17: CS-B22Lo, 18: CS-B25, 19: CS-B26Lo. Son kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir



Şekil 4.45. MK138 lokusunun 26 nolu kromozom üzerine yerleştirilmesi. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

Çalışmada ayrıca CAPS-mikrosatellit markırlarının da kromozom konumlarının belirlenmesinde benzer bir yaklaşım uygulanıp uygulanamayacağı araştırılmıştır. Şekil 4.46'da *Hae* III restriksiyon enziminin CAPS-mikrosatellit analizi için seçilen primer çifti ile oluşturulan lokusun kromozom lokasyonununun 2 nolu kromozom olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.46. CAPS-*Hae*III-MK068 lokusunun 2 nolu kromozoma yerleştirilmesi. 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. İlk kuyucuk DNA büyüklük markırını göstermektedir

Çalışmada 14 MK primer çifti ile elde edilen markırların ve 2 CAPS-mikrosatellit markırının kromozom lokasyonu tespit edilebilmiştir. Bu markırlardan 7 adedi A alt genomuna ve diğer 7 adedi ise D alt genomuna yerleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan toplam 43 adet MK primer çifti ile oluşturulmuş markırın 14 adedinin kromozom lokasyonu belirlenmiş iken geri kalan 29 adedinin allotetraploid pamukta bulunan ve H01, H02, H06, 11Sh, 14Sh, H16, H17, 22Sh ve 26Lo dışındaki diğer kromozomlarda bulunduğu öngörülmüştür.

CS-B hatlarında DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının tespiti pamuk verim ve kalitesinin artırılmasında önemlilik göstermektedir. Örneğin Jenkins vd (2012) bu çalışmada kullanılan CS-B hatlarının da aralarında bulundu hatlarla yapmış oldukları denemelerinde yüzde lif oranının kromozom 10, 16 x 15, uzun liflerin 1, 11Sh, 26Lo, lif tek düzeliliğinin 1, 11, 10, 17 x 11, lif sağlamlılığının 1, 10, 11Sh 12Sh, 17 x 11 ve 26Lo kromozomlarında bulunan genler tarafından idare edildiğini belirlemişlerdir.

5. SONUÇ

Pamuk bitkisinde ıslah çalışmaları genellikle verim ve lif kaliteleri yönünden seçkin genotipler arasında gerçekleştirilen melezlemelere dayanmaktadır. Ancak pamuk ıslah programları kültür çeşitlerinde dar olan genetik çeşitlilikten dolayı melezleme çalışmalarındaki başarıyı sınırlandırmaktadır (Karaca 2001). Bu durum araştırmacıları türler arası melezleme ile introgresyona teşvik etmiştir. Türler arası melezlemelerde kompleks antogonistik ilişkiler, farklı ploidi seviyelerinden dolayı sitogenetik farklılıklar ile translokasyonlar ve inversiyonlar, kromozomların yapısal farklılıkları, linkaj etkisi ile arzu edilmeyen tarımsal özelliklerin varlığı, rekombinasyonun azlığı, erken generasyonlarda introgresyonun kaybolması, kısırlık, 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 kaldırılabilir (Karaca 2001, Kohel vd 2002, Buyyarapu vd 2011).

Bu çalışmada 17 set pamuk disomik yabancı kromozom substitüsyon hattı kullanılmıştır. Bu hatlarda *G. barbadense* (CS-B) hattının bir çift kromozomu veya kromozom kolu hipoaneuploid tabanlı geriye melezleme çalışmaları ile Texas Marker-1 (TM-1) hattına yakın bir izohat olan hatta transfer edilmiştir. Ancak CS-B hatlarının teşhisinde veya CS-B x CS-B ve CS-B x herhangi bir hat arasındaki melezlemelerde markır yardımıyla seleksiyon (MAS) çalışmalarında kullanılacak moleküler markırlar geliştirilmemiştir.

Çalışmada genik ve genomik mikrosatellit markırları ile genik CAPS-mikrosatellit markırlarından yararlanılmıştır. Genik markırlardan olan bazı MK lokuslarının kromozom lokasyonları ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Çalışmada DNA markırlarından yararlanılarak kromozom substitüsyon hatlarının tespitinin araştırılması yanı sıra birimde bulunan kromozom substitüsyon hatlarında genetik veya fiziksel bir karışımın bulunup bulunmadığı da araştırılmıştır.

Kromozom substitüsyon hatlarının teşhisi kavramında literatürde ve CMD kaynaklarında sunulmuş olan bir lokusun kullanımı ile ilgili kromozom hatlarından elde edilen 3 farklı örnekten en az birinde bu lokusun tespiti kromozom substitüsyon hattının tespiti olarak nitelendirilmiştir. Diğer taraftan kromozom substitüsyon hatlarından elde edilen üç set örneğin birinde ilgili lokusun varlığı diğer setlerde bulunmaması durumunda kromozom substitüsyon hatlarında karışımın olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Karışımın fiziksel olarak karşımıza çıkabileceği gibi translokasyon veya mutasyonlardan da kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca literatür ve CMD kaynaklarında rapor edilmesine rağmen bu çalışmada tespit edilemeyen lokusların daha fazla substitüsyon hattı ve DNA markırı kullanılarak tespit edilmesi gerektiği sonucu çıkarılmıştır.

Bu çalışmada toplam 55 DNA örneği kullanılmıştır. Bu DNA örneklerinden kromozom substitüsyon hatlarının oluşturulmasında kullanılan Pima 3-79 örneği ile yine kromozom substitüsyon hatlarında alıcı genom olarak kullanılan hattın izogenik bir hattı olan TM-1 hattından ve çalışmada kullanılan 17 farklı kromozom substitüsyon hattından 5-6 bitkinin yaprak örneklerinin karışımı ile elde edilmiş örnekler Set 1 örnekleri olarak adlandırılmıştır. Set 2 ve Set 3 örnekleri ise her bir hattın tek bitkisinden elde edilen yaprak örneklerinden elde edilmiş DNA örneklerini içermektedir.

CS-B01 hattı BNL3888 lokusu ile teşhis edilmiştir (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). Ancak CS-B01 hattı bitkileri arasında bir tanesinin CS-B26Lo genomu üzerinde bulunması beklenen BNL0341 lokusunu da taşıdığı belirlenmiştir. Fakat BNL0341 lokusu CS-B07 hattının bütün örnek setlerinin hepsinde de görülmüştür. Çalışmada CS-B26Lo üzerinde bulunan diğer lokusların CS-B01 hattında bulunmaması ancak sadece bir lokusun bulunması nedeni ile CS-B01

hattına ait en az bir bitkinin fiziksel olarak CS-B26Lo bitkisi ile karışmış olduğu ortaya konulmuştur.

CS-B02 hattı BNL1434, BNL3792 ve BNL3971 lokusları ile teşhis edilmiştir. CS-B02 hattının çalışmada kullanılan örneklerinin bir kısmının CS-B18 genomunda bulunması beklenen CM63 lokusu, CS-B17 genomu üzerinde bulunması beklenen BNL3955, BNL3408, BNL2544, BNL2496 ve BNL1721 lokuslarını da taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca CS-B02 hattı içerisinde tek bir bitkinin de CS-B22Sh genomunda bulunan BNL0673 lokusunu da taşıdığı tespit edilmiştir (Lui vd 2000, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). Bu durum CS-B02 hattının CS-B22Sh, CS-B17, CS-B18 bireyleri ile karışım içerisinde olduğunu göstermiştir.

CS-B04 hattı BNL2572 lokusunun bütün örneklerde (Set 1, Set 2 ve Set 3) bulunması ve literatür taramalarına uyması nedeni ile teşhisi yapılmıştır. CS-B04 hattı örneklerinin herhangi bir setinde literatürde belirtilen BNL3255 lokusu tespit edilememiştir. Bu lokus çalışmada kullanılan hiçbir CS-B hattında da bulunamamıştır (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). BNL3255 lokusunun allotetraploid pamuk genomunun dört numaralı kromozomunda bulunmadığı bu çalışmada tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada CS-B04 hattında CS-B01 ve CS-B02 hatlarında olduğu gibi fiziksel bir karışımın bulunmadığı belirlenmiştir.

CS-B05Sh hatlarından elde edilen üç farklı DNA örneği BNL0542, BNL3995 ve MUSB0312 lokusları yönünden araştırıldığında teşhis edilememiştir (Lui vd 2000, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). Ayrıca çalışmada hiç bir MK lokusunun da bu hattın teşhisinde kullanılamayacağı belirlenmiştir. CS-B05Sh hattının 2007 yılında yapılan tohum çoğaltım çalışmalarında diğer CS-B hatlarına oranla daha fazla çiçek açtığı ve aynı zamanda daha erken çiçeklendiği görülmüştür. Ancak bu çalışmada kullanılan üç DNA örneğinin hiç birisi CS-B05Sh hattının bulundurması gereken Pima 3-79 kromozom kolunu içermemiştir. Birimde bulunan bütün CS-B05Sh bireylerinin incelenmesi gerektiği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

CS-B06 hattı MUSB0078, TM1277 ve TMB0154 lokusları yönünden tarandığında CS-B06 hattı teşhis edilememiş ancak bu hattın diğer hatlardan farklı olduğu MK lokuslarının taranması ile belirlenmiştir. CS-B06 hattı fazla sayıda lokus ve bitki ile kullanılarak teşhis edilmesi gerekmektedir (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD).

CS-B07 hattının teşhisi için BNL1597, BNL3415 ve CIR141 lokusları ile yapılan çalışmalarda teşhisi yapılamamıştır. Ancak CS-B26Lo genomunda bulunması gereken BNL0341 lokusu CS-B07 hattından toplanan her üç set örneğinde de tespit edilmiştir (Lui vd 2000, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). Bu durum CS-B07 hattının 7 ile 26 nolu kromozomları arasında translokasyon sonucu lokus kazanımının oluşabildiğini belirtmekle birlikte ileriki çalışmalarla bu öngörünün kanıtlanması gerekmektedir.

CS-B11Sh hattı BNL3442 lokusunun bütün örneklerde (Set 1, Set 2 ve Set 3) bulunması ve literatür taramalarına uyması nedeni ile teşhisi yapılmıştır (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Gutierrez vd 2010, Fang ve Yu 2012, CMD). CS-B11Sh hattında çalışmada kullanılan ve diğer CS-B hatlarında görülmesi beklenen hiç bir lokusun bulunmaması ve örnek setleri arasındaki benzer sonuçların alınması nedeni ile karışım içermediği ortaya konulmuştur.

CS-B12Sh hattı BNL1679 ve BNL4041 lokusları ile yapılan çalışmalar sonucu teşhis edilememiştir (Lui vd 2000, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). CS-B12Sh hattına ait bireylerin hiçbirinde diğer CS-B hatlarında beklenen lokusların bulunmamış olması nedeniyle birimde bulunan bütün CS-B12Sh kaynaklarının 12 nolu kromozoma spesifik DNA markırları ile taranması gerekmektedir.

CS-B14Sh hattı için BNL3434 lokusu bütün örneklerde (Set 1, Set 2 ve Set 3) bulunmuş ve ilgili literatür taramalarına uymuştur (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Gutierrez vd 2010, Fang ve Yu 2012, CMD). CS-B14Sh hattında çalışmada kullanılan ve diğer CS-B hatlarında görülmesi beklenen hiç bir lokusun

bulunmaması ve örnek setleri arasındaki benzer sonuçların alınması nedeni ile teşhisi yapılmış olup bu hattın diğer hatlarla herhangi bir karışım içermediği tespit edilmiştir.

CS-B15Sh hattına ait 3 DNA örnek seti BNL4082 lokusu ile tarandığında bu lokus tespit edilememiştir. Ancak CS-B15Sh hatlarına ait DNA örneklerinin üç setinde de CS-B07 hattında bulunması gereken BNL1597 lokusu tespit edilmiştir (Lui vd 2000, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). Bu durum çalışmada kullanılan CS-B15Sh hattının CS-B07 hattı ile karışmış olabileceği dolayısıyla birimde bulunan bu hatları daha detaylı çalışılması gerektiği tespit edilmiştir.

CS-B16 hattı BNL3065 ve CM66 lokusları yönünden incelendiğinde hatta ait 3 setteki bitkilerin bu lokusları içerdiği tespit edilmiştir (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). Bu hat genetik ve fiziksel açıdan karışıklık içermemektedir.

CS-B17 hattına ait bitkiler BNL2496, BNL3408 ve BNL3955 lokusları yönünden incelendiğinde hatta ait bütün örnek setlerinin hepsinde literatürde belirtildiği üzere bu lokusların bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak literatürde belirtilen BNL1061 ve BNL1606 lokuslarını bulundurmadığı saptanmıştır (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). BNL1061 ve BNL1606 lokuslarının çalışmada kullanılan diğer CS-B hatlarında da bulunmaması nedeni ile bu lokusların çalışmada kullanılmayan diğer kromozom veya kromozom kollarında olduğu öngörülmüştür.

CS-B18 hattı BNL1721, BNL2544 ve CM63 lokusları kullanılarak tespit edilmiştir. Ancak literatürde belirtilen BNL2571 ve BNL1079 lokusları yönünden tespit edilememiştir (Lui vd 2000, Guo vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD). CS-B18 hattında bulunan bazı bireylerin BNL2496, BNL3408 ve BNL3995 lokuslarını içermeleri nedeni ile CS-B17 hattında yer alan bazı bitkiler ile karışım içerisinde olduğu veya bu lokusların her iki kromozom da (17 ve 18) olabileceği tespit edilmiştir. Bu öngörünün ileriki çalışmalarda detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.

Çalışmada CS-B22Sh, CS-B22Lo ve CS-B25 olarak etiketli olan hatlarda etiketleme hatasının varlığı belirlenmiştir. Çalışmada CS-B25 hattının BNL0448, BNL0673 ve BNL4030 lokuslarını içermesi nedeni ile bu hattın CS-B22Sh olduğu tespit edilmiştir. CS-B22Sh olarak etiketlenmiş hattın ise CS-B22Lo olduğu BNL3873 lokusunun bütün hat bireylerinde bulunması nedeni ile tespit edilmiştir (Lui vd 2000, Karaca 2001, Wu vd 2008, Gutierrez vd 2009, Fang ve Yu 2012, CMD).

CS-B26Lo hattı BNL0341 ve MAGES-106 lokusları ile tespit edilmiştir. Ancak bu hatta ait 3 setteki DNA örneklerinin BNL3463 lokusunu taşıması nedeni ile genetik veya translokasyondan dolayı 22 numaralı kromozomdan lokus kazanımının olduğu öngörülmüştür (Lui vd 2000, Buyyarapu vd 2011, Fang ve Yu 2012, CMD).

Allotetraploid pamuk [(AD2)] genomunda genetik, moleküler markırlar ışığında homeolog kromozomlar 1-15, 4-22, 10-20, 9-23, 5-18 olarak tespit edilmişlerdir (Zhang vd 2002). Bu tespit aynı markırların farklı kromozomlar üzerinde bulunmaları ile açıklanmıştır. Wang vd (2010) 12 nolu kromozom (A12) ile 25 nolu kromozomun (D12) homeolog olduklarını FISH yöntemi ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bazı CS-B hatlarında beklenmeksizin ortaya çıkan lokusların mayoz bölünme sırasında homeolog kromozomlar arasındaki translokasyonlar sonucu mu yoksa somatik translokasyonlar sonucu mu oluştuğunun ileriki çalışmalarla ortaya konması gerekmektedir (Buyyarapu vd 2011).

Kromozom substitüsyon hatlarından bu çalışma ile teyit edilen hatların ileriki ıslah çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabilmesi açısından bu çalışma önemlidir. Örneğin Gutierrez vd (2010) ve Jenkins vd (2012) pamukta önemli bir sorun olan kök ur nematoduna [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White)] dayanıklılık genlerinin bir kısmının kromozom 11 ve kromozom 14 üzerinde bulduklarını tespit etmişlerdir. Nematoda dayanıklılık genlerini taşıyan 11 ve 14 nolu kromozomları içeren substitüsyon hatları kullanılarak nematoda dayanıklılık kazandırılabilir. Bu bağlamda bu çalışmada elde edilen bulguların doğrudan pamuk ıslahına katkı sağlayacağı açıktır.

Çalışmada mikrosatellit ve CAPS-mikrosatellit markırlarına ait lokustan 16 adedinin dokuz farklı kromozom üzerindeki konumu tespit edilmiştir. Bu durum ile bu çalışma kromozom substitüsyon hatlarının DNA markırlarının kromozom lokasyonlarının belirlenebilmesinde kullanılabilirliğini ortaya koyması bakımından yapılan ilk çalışmadır.

6. KAYNAKLAR

- AGARWAL, M., SHRIVASTAVA, N. and PADH, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27: 617-631.
- Anonim 1968-1980. Preservation and Utilization of Germplasm in Cotton 1968-1980.
- Anonim 2011. T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı. 2010 Yılı Pamuk Raporu. www.tgm.sanayi.gov.tr
- ARBUZOVA, V. S., EFREMOVA, T.T., LAIKOVA, L. I., MAYSTRENLO, O. I., POPOVA, O. M. and PSHENICHNIKOVA, T. A. 1996. The development of precise stocks in two wheat cultivars and their use in genetic analysis. *Euphytica*. 89: 11-15.
- ARIF, I.A., BAKIR, M.A., KHAN, H.A., FARHAN, A.H., HOMAIDAN, A.A., BAHKALI, A.H., SADOON, M. and SHOBRACK, M. 2010. A Brief Review of Molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 2079-2096.
- BLENDIA, A., SCHEFFLER, J., SCHEFFLER, B., PALMER, M., LACAPE, J.M., YU, J.Z., JESUDURAL, C., JUNG, S., MUTHUKUMAR, S., YELLAMBALASE, P., FICKLIN, S., STATON, M., ESHELMAN, R., ULLOA, M., SAHA, S., BURR, B., LIU, S., ZHANG, T., FANG, D., PEPPER, A., KUMPATLA, S., JACOBS, J., TOMKINS, J., CANTRELL, R. and MAIN, D. 2006. CMD: A cotton microsatellite database resource for *Gossypium* genomics. *BMC Genomics*, 7: 132.
- BUYRARAPU, R., KANTETY, R. V., YU, J. Z., SAHA, S. and SHARMA, G. C. 2011. Development of new candidate gene and EST-based molecular markers for *Gossypium* species. *International Journal of Plant Genomics*. doi:10.1155/2011/894598.
- CHAUDHRY, B., YASMEEN, A., HUSNAIN, T. and RIAZUDDIN, D. 1999. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 1-7.
- DONG, F., TEK, A. L., FRASCA, A. B. L., MCGRATH, J. M., WIELGUS, S. M., HELGESON, J. P. and JIANG, J. 2005. Development and characterization of potato-*Solanum brevidens* chromosomal addition/substitution lines. *Cytogenetics and Plant Breeding*, 109: 368-372.
- ENDRIZZI, J. E., TURCETTE, E. L. and KOHEL, R. J. 1985. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. *Advence in Genetics*, 23: 271-375.

- FANG, D. D. and YU, J. Z. 2012. Addition of 455 microsatellite marker loci to the high-density *Gossypium hirsutum* TM-1 x *G. barbadense* 3-79 genetic map. *The Journal of Cotton Science*, 16: 229-248.
- FRYXELL, P. A. 1979 Genus *Gossypium* linnaeus. In: Fryxell P.A. [ed.] The natural history of the cotton tribe. Texas A&M University Press, College Station, Texas, pp. 37-71.
- FRYXELL, P. A. 1992. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. [*Malvaceae*]. *Rheedea*, 2: 108-165.
- GUO, Y., SAHA, S., YU, J. Z., JENKINS, J. N., KOHEL, R. J., SCHEFFLER, B. E. and STELLY, D. M. 2008. BAC-derived SSR markers chromosome locations in cotton. *Euphytica*, 161: 361-370.
- GUTIERREZ, O. A., STELLY, D. M., SAHA, S., JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C., RASKA, D. A. and SCHEFFLER, B. E. 2009. Integrative placement and orientation of non-redundant SSR loci in cotton linkage groups by deficiency analysis. *Molecular Breeding*, 23: 693-707.
- GUTIERREZ, O. A., JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C., WUBBEN, M. J., HAYES, R. W. and CALLAHAN, F. E. 2010. SSR markers closely associated with genes for resistance to root-knot nematode on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1323-1337.
- HOWELL, P. M., MARSHALL, D. F. and LYDIATE, D. J. 1996. Towards developing intervarietal substitution lines in *Brassica napus* using marker-assisted selection. *Genome*, 39: 348-358.
- HARPER, J., ARMSTEAD, I., THOMAS, A., JAMES, C., DAGMARA, G., BISAGA, M., ROBERTS, L., KING, I. and KING J. 2011. Alien introgression in the grasses *Lolium perenne* (perennial ryegrass) and *Festuca pratensis* (meadow fescue): the development of seven monosomic substitution lines and their molecular and cytological characterization. *Annals of Botany*, 107: 1313-1321.
- HENDRIX B. and STEWART J.M. 2005. Estimation of the Nuclear DNA Content of *Gossypium* Species. *Annals of Botany*, 95: 789-797.
- HUSSEIN, S., SPIES, J. J., PRETORIUS, Z. A. and LABUSCHAGNE, M. T. 2005. Chromosome locations of leaf rust resistance genes in selected tetraploid wheats through substitution lines. *Euphytica*, 141: 209-216.
- İNCE, A. G. 2010. Doku/Organ Spesifik Mikrosatellit DNA Gen İçeriklerinin *Capsicum* cDNA Kütüphanelerinde *In Silico* ve *In Vitro* Yaklaşımlarla Belirlenmesi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi.

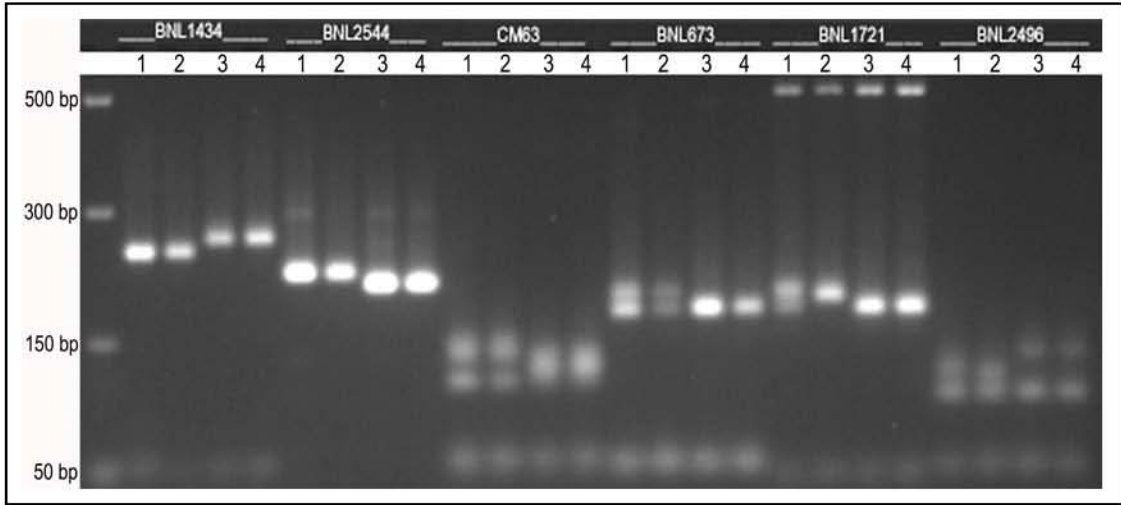
- İNCE, A. G., AYDIN, A. KARACA, M. ONUS, A. N. 2011. Moleküler Markır Tekniklerinin Gelişimi ve Bitki Islahı ve Tohumculukta Kullanım Alanları. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011/Samsun. s: 264-270.
- İNCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2009. CAPS-microsatellites: use of CAPS method to convert non-polymorphic microsatellites into useful markers. *Molecular Breeding*, 25: 491-499.
- IQBAL, M. J., REDDY, K. M., EL-ZIK, O .U. K. and PERPER, A. E. 2001. A genetic bottleneck in the “evolution under domestication” of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. Examined using fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 547-554.
- JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C., WU, J., HAYES, R. and STELLY, D. 2012. Genetic effects of nine *Gossypium barbadense* L. Chromosome substitution lines in top crosses with five elite Upland cotton *G. hirsutum* L. Cultivars. *Euphytica*, 187: 161-173.
- Jl, Y. and CHETELAT R. T. 2003. Homoeologous pairing and recombination in *Solanum lycopersicoides* monosomic addition and substitution lines of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 979-989.
- KARACA, M. 2001. Characterization of *Cynodon* spp. and *Gossypium* spp. Genomes Using Molecular and Cytological Techniques, Ph.D. Dissertation, University of Mississippi.
- KARACA, M., SAHA, S., JENKINS, J.N., ZIPF, A., KOHEL, R. and STELLY, D. M. 2002. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to the Ligon Lintless (*Li*₁) mutant in cotton. *Journal of Heredity*, 93: 221-224.
- KARACA, M., İNCE, A. G., ELMASULU, S. Y., ONUS, A. N. and TURGUT, K. 2005. Coisolation of Genomic and Organelle DNAs from 15 Genera and 31 Species of Plants. *Analytical Biochemistry*, 343: 353-355.
- KARACA, M. and İNCE, A. G. 2011. New non-redundant microsatellite and CAPS-microsatellite markers for cotton (*Gossypium* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, 16: 172-178.
- KARACA, M., İNCE, A. G., AYDIN, A., AY S. T. 2012. Cross-genera transferable e-microsatellite markers for 12 genera of *Lamiaceae* family. *Journal of the Science of Foof and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.5982.
- LI, X., YUAN, D., WANG, H., CHEN, X., WANG, B., LIN, Z. and ZHANG, X. 2012. Increasing cotton genome coverage with polymorphic SSRs as revealed by SSCP. *Genome*, 55: 459-470.

- LIU, S., SAHA, S., STELLY, D., BURR, B. and CANTRELL, R. G. 2000. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *Journal of Heredity*, 91: 326-332.
- MYERS, G. O., JIANG, B., AKASH, W., BADIGANNAVAR, A. and SAHA, S. 2009. Chromosomal assignment of AFLP markers in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica*, 165: 391-399.
- MCCARTY J. C., WU J., SAHA S., JENKINS J.N. and HAYES R. 2006. Effects of chromosome 5sh from *Gossypium barbadense* L. on flower production in *Gossypium hirsutum* L. *Euphytica*, 152: 99-107.
- MERT, M. 2007. Pamuk Tarımının Temelleri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Yayınlar Dizisi No:7, Hatay, 2ss.
- RANA, M. K., SING, S. and BHAT, K. V. 2007. RAPD, STMS and ISSR markers for genetic diversity and hybrid seed purity testing in cotton. International Seed Testing Association, Volume 35: pp.709-721.
- ROONEY, W. L. and STELLY, D. M. 1991. Preferential transmission and somatic elimination of a *Gossypium sturtianum* chromosome in *G. hirsutum*. *Journal of Heredity*, 82: 151-155.
- SAHA, S., JENKINS, J. N., WU, J., MCCARTY, J. C. and STELLY, D. M. 2008. Genetic analysis of agronomic and fibre traits using four interspecific chromosome substitution lines in cotton. *Plant Breeding*, 127: 612-618.
- SAHA, S., STELLY, D. M., RASKA, D. A., WU, J., JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C., MAKAMOV, A., GOTMARE, V. and ABDURAKHMONOV, Y. and CAMPBELL, B.T. 2012a. Chromosome substitution lines: Concept, development and utilization in the genetic improvement of upland cotton. *Plant Breeding*, Dr. Ibrokhim Abdurakhmonov (Ed.), ISBN: 978-953-307-932-5, InTech.
- SAHA, S., STELLY, D.M., RASKA, D., HULSE, A., GUTIERREZ, O. A., MAKAMOV, A., GOTMARE, V., WANG, F., MANCHALI, S., JENKINS, J. N. and ABDURAKHMONOV, I. Y. 2012b. Molecular confirmation of *Gossypium hirsutum* chromosome substitution lines and interspecific F1 hypoaneuploids. National Cotton council, Beltwide Cotton Conferences, Orlando, Florida.
- SANAMYAN, M. F., PETLYAKOVA, J. E. and MUSAEV, D. A. 2000. The development and a cytogenetic study of monosomics of *Gossypium hirsutum* L. *Biologia Plantarum*, 43: 193-197.

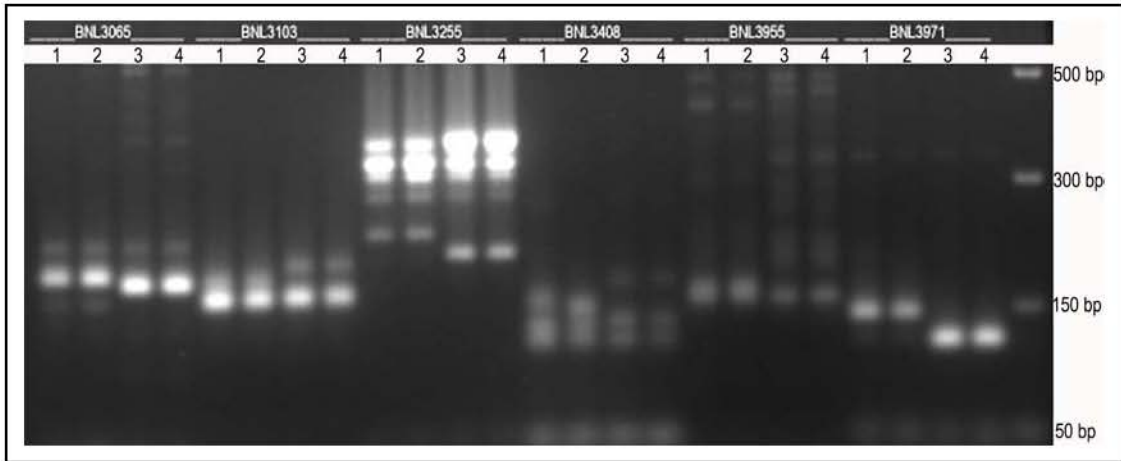
- SANAMYAN, M. F., PETLYAKOVA, J. E., SHARIPOVA, E. A. and ABDURAKHMONOV, I.A. 2010. Morphological characteristics and identification of new monosomic stocks for cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1: 372-383.
- SANAMYAN, M. F., PETLYAKOVA, J. E., SHARIPOVA, E. A. and ABDURAKHMONOV, I.A. 2011. Cytogenetic characteristics of new monosomic stocks of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetic Research International*, doi:10.4061/2011/273642.
- SARR, D., LACAPE, J. M., JACQUEMIN, J. M., BENBOUZA, H., TOUSSAINT, A., BAUDOIN, J. P. and MERGEAL, G. 2012. Alien chromosome transmission and somatic elimination in monosomic addition lines of *Gossypium australe* F. Muell in *G. hirsutum* L. *Euphytica*, 183: 55-64.
- STELLY, D. M., SAHA, S., RASKA, D. A., JENKINS, J.N., MCCARTY, J. C. J. and GUTIERREZ, O. A. 2005. Registration of 17 germplasm lines of upland cotton [*Gossypium hirsutum*] cotton, each with a different pair of *Gossypium barbadense* chromosomes or chromosome arms substituted for the respective *Gossypium hirsutum* chromosome or chromosome arms. *Crop Science*, 45: 2663-2665.
- THIEL, T., MICHALEK, V. and GRANER, A. 2003. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley [*Hordeum vulgare* L.]. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 411-422.
- ULLOA, M., SAHA, S., JENKINS, J.N., MEREDITH, W. R., MCCARTY, J. C. and STELLY, D.M. 2005. Chromosomal assignment of RFLP linkage groups harboring important QTLs on an intraspecific cotton (*Gossypium hirsutum* L. joinmap. *Journal of Heredity*, 96: 132-144.
- WANG, L. and CHEN, P. 2008. Development of *Triticum aestivum*-*Leymus racemosus* ditelosomic substitution line with resistance to wheat scab and its meiotic behavior analysis. *Chinese Science Bulletin*, 22: 3522-3529.
- WANG, K., WANGZHEN, G. YANG, Z., HU, Y., ZHANG, W., ZHOU, B., STELLY, D. M., CHEN, Z. J. and ZHANG, T. 2010. Structure and size variations between 12A and 12D homoeologous chromosomes based on high-resolution cytogenetic map in allotetraploid cotton. *Chromosoma*, 119: 255-266.
- WENDEL, J. F. and CRONN, R. C. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Advances in Agronomy*, 78: 139-186.

- WU, J., JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C., SAHA, S. and STELLY, D. M. 2005. An additive-dominance model to determine chromosomal effects in chromosome substitution lines and other gemplasms. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 391-399.
- WU, J., JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C., SAHA, S. and PERCY, R. 2008. Genetic association of lint yield with its components in cotton chromosome substitution lines. *Euphytica*, 164: 199-207.
- WU, J., MCCARTY, J. C., SAHA, S., JENKINS J. N. and HAYES, R., 2009. Genetic changes in plant growth and their associations with chromosomes from *Gossypium barbadense* L. in *Gossypium hirsutum* L. *Genetica*, 137: 57-66.
- WU, J., JENKINS, J. N., MCCARTY, J. C. and SAHA, S. 2010. Genetic effects of individual chromosomes in cotton cultivars detected by using chromosome substitution lines as genetic probes. *Genetica*, 138: 1171-1179.
- ZHANG, J. GUO, W. and ZHANG, T. 2002. Molecular lineage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. X *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 1166-1174.
- ZHANG Q., LI, Q., WANG, X., WANG, X., LANG, S., WANG, S., WANG, S., CHEN, P and LIU, D. 2005. Development and characterization of a *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line T4VS-4DL conferring resistance to wheat spindle streak mosaic virus. *Euphytica*, 145: 317-320.
- ZHANG, X., MENG, Z., ZHOU, T., SUN, G., SHI, J., YU, Y., ZHANG, R. and GUO, S. 2012. Mitochondrial SCAR and SSR Markers for distinguishing cytoplasmic male sterile lines from their isogenic maintainer lines in cotton. *Plant Breeding*, 131: 563-570.

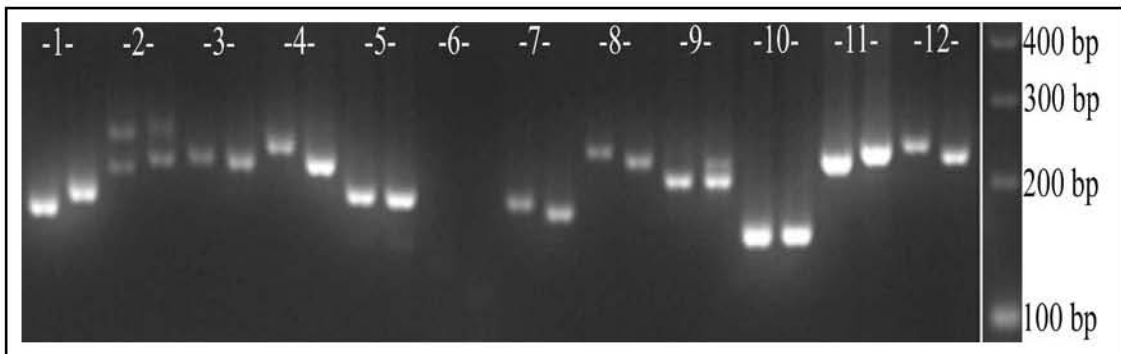
7. EKLER



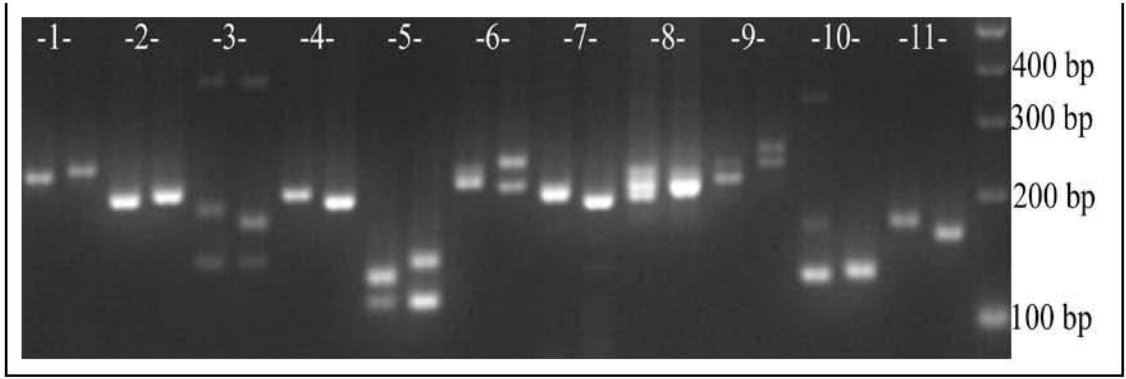
Şekil Ek-1. SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



Şekil Ek-2. SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



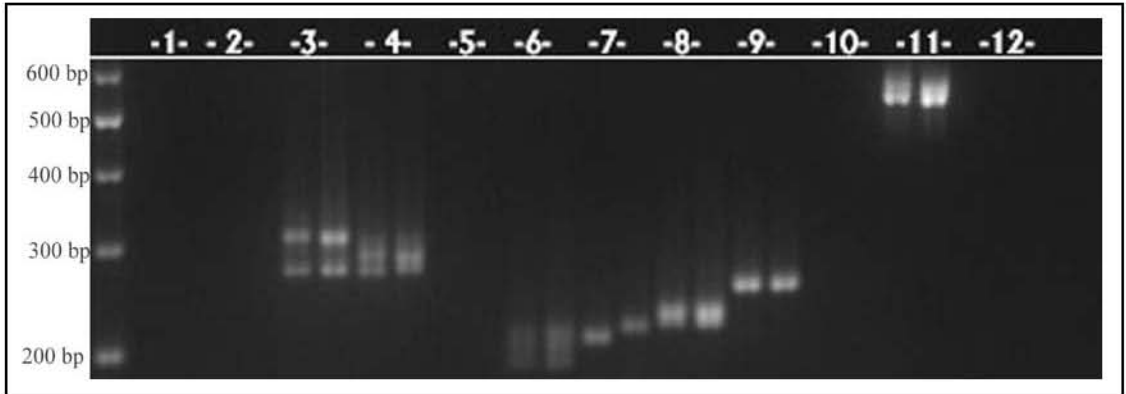
Şekil Ek-3. SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması. 1: BNL3888, 2: MGAES-153, 3: BNL1421, 4: BNL2572, 5: MGAES-83, 6: BNL3988, 7: BNL3995, 8: BNL0542, 9: MUSB0312, 10: MUSB0078, 11: TMB1277, 12: TMB154



Şekil Ek-4. SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması. 1: BNL3415, 2: BNL1597, 3: CIR141, 4: BNL3411, 5: BNL3442, 6: BNL1034, 7: MGAES-64, 8: MGAES-78, 9: BNL4041, 10: BNL3443, 11: BNL4082



Şekil Ek-5. SSR primerlerinin TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması. 1: MGAES-10, 2: BNL3008, 3: CM66, 4: BNL1606, 5: BNL1061, 6: BNL2571, 7: BNL1079, 8: BNL3463, 9: BNL3873, 10: BNL4030, 11: BNL0448, 12: BNL3806, 13: MGAES-106, 14: BNL0341, 15: BNL1227



Şekil Ek-6. EST-SSR primerlerinin (MK001-MK012) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



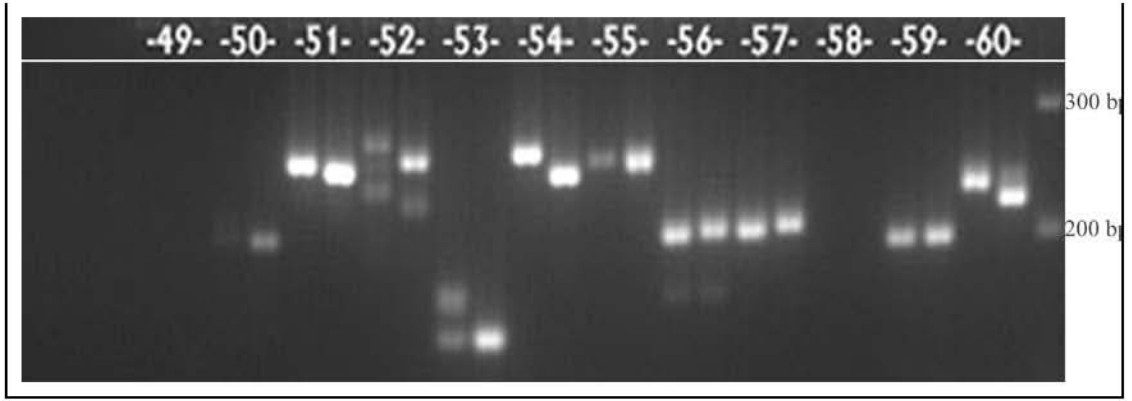
Şekil Ek-7. EST-SSR primerlerinin (MK013-MK024) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



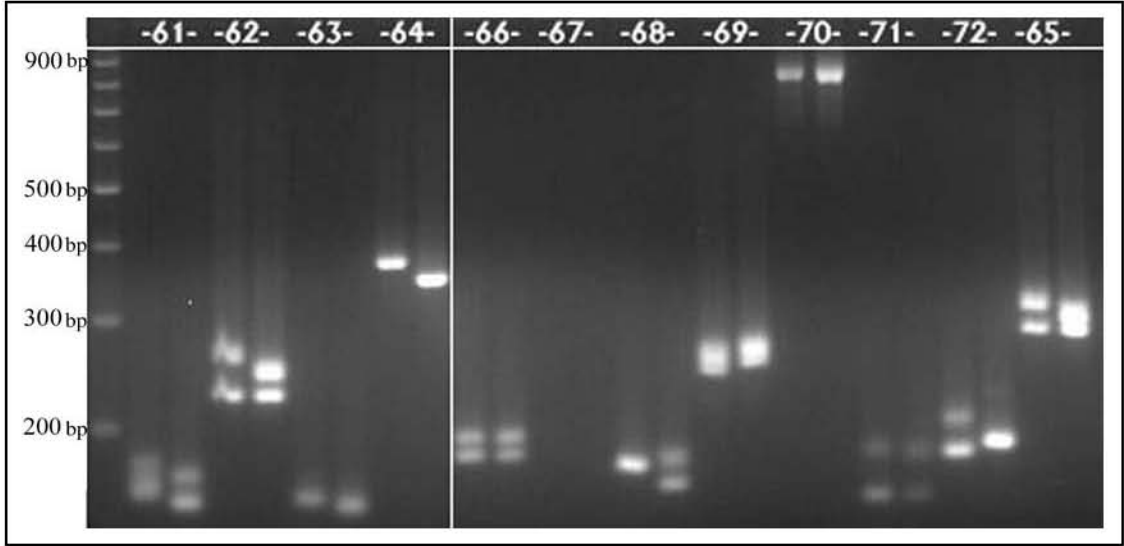
Şekil Ek-8. EST-SSR primerlerinin (MK025-MK036) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



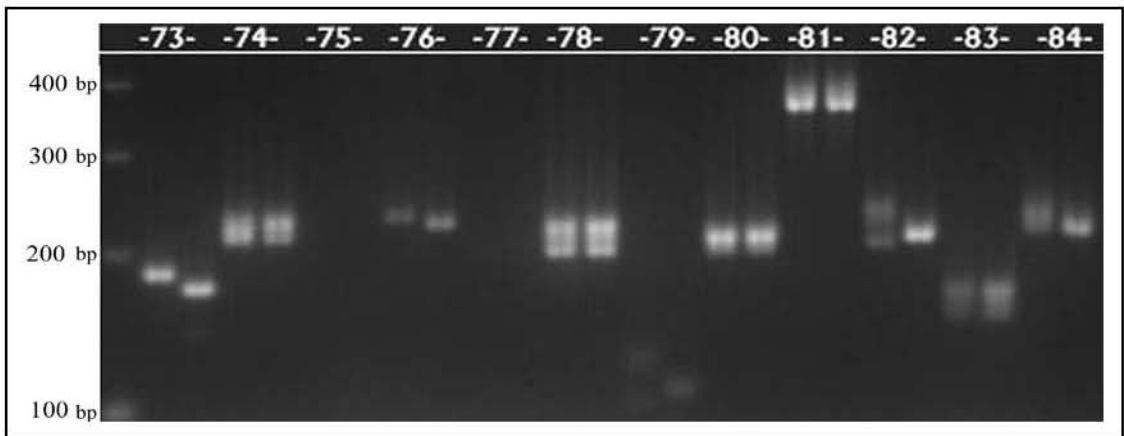
Şekil Ek-9. EST-SSR primerlerinin (MK037-MK048) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



Şekil Ek-10. EST-SSR primerlerinin (MK049-MK060) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



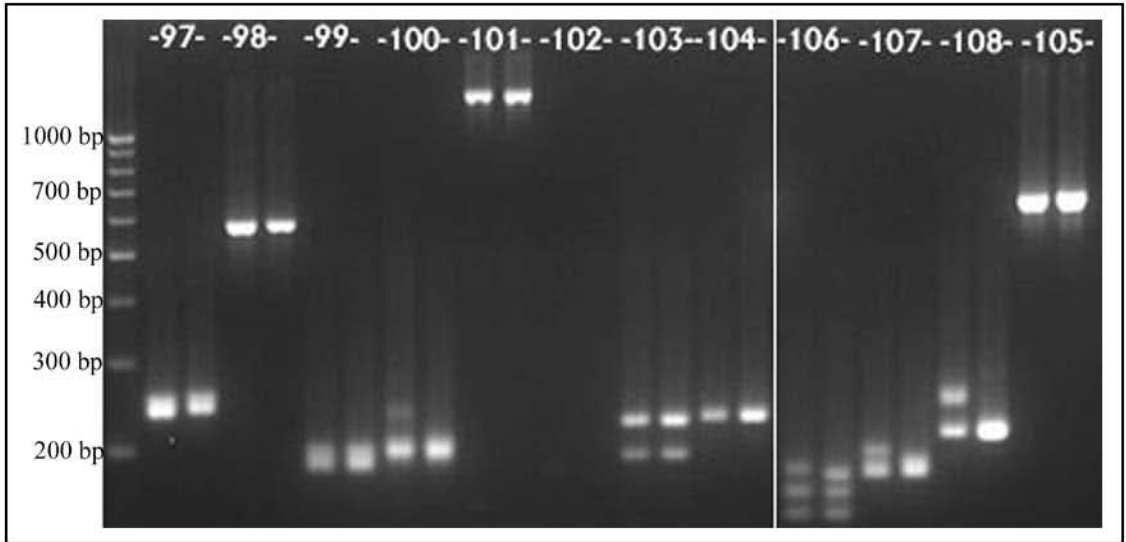
Şekil Ek-11. EST-SSR primerlerinin (MK061-MK072) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



Şekil Ek-12. EST-SSR primerlerinin (MK073-MK084) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



Şekil Ek-13. EST-SSR primerlerinin (MK085-MK096) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



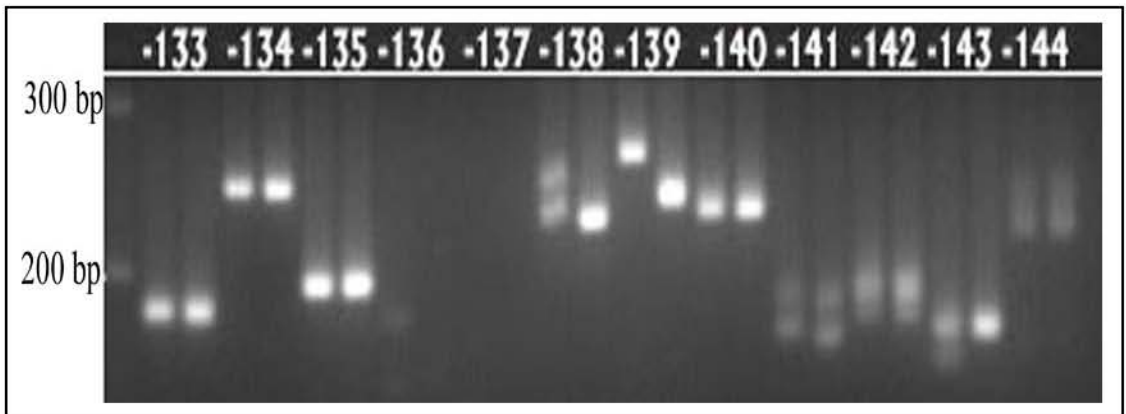
Şekil Ek-14. EST-SSR primerlerinin (MK097-MK105) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



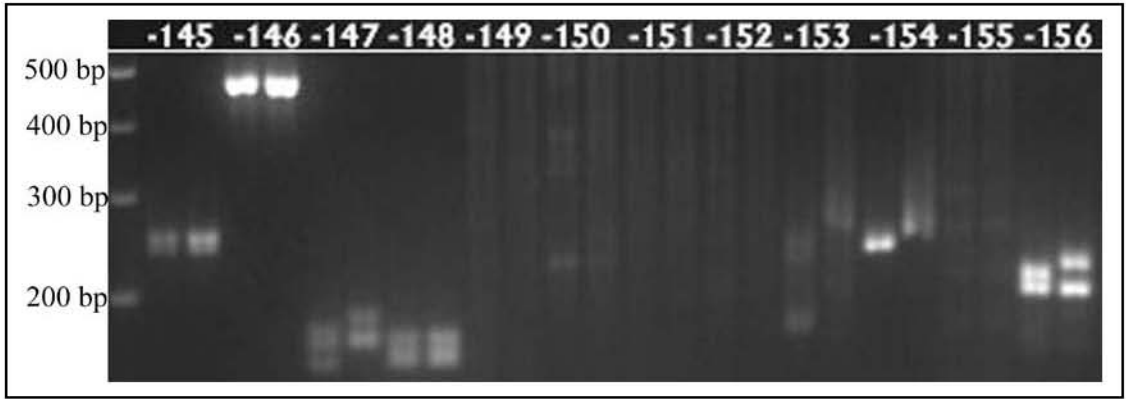
Şekil Ek-15. EST-SSR primerlerinin (MK109-MK120) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



Şekil Ek-16. EST-SSR primerlerinin (MK121-MK132) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



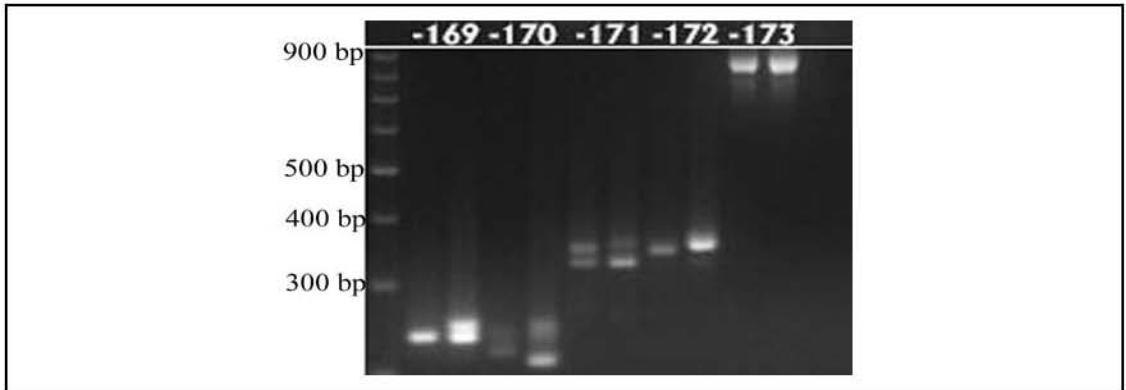
Şekil Ek-17. EST-SSR primerlerinin (MK133-MK144) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



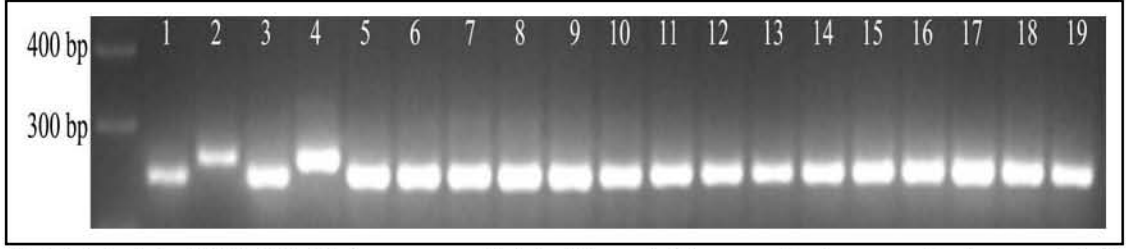
Şekil Ek-18. EST-SSR primerlerinin (MK145-MK156) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



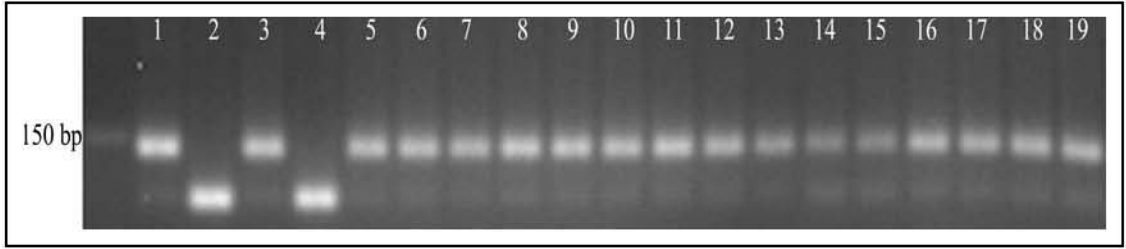
Şekil Ek-19. EST-SSR primerlerinin (MK157-MK168) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



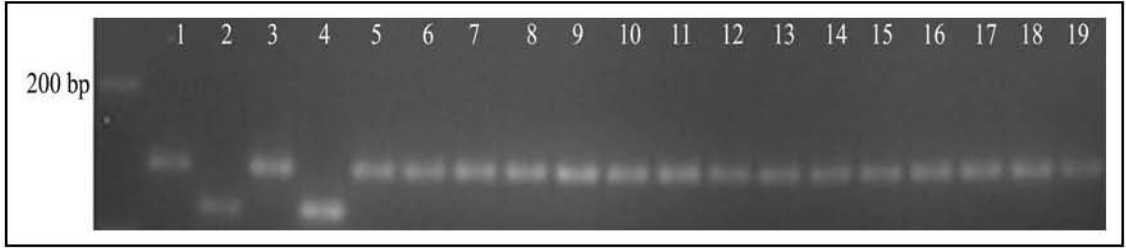
Şekil Ek-20. EST-SSR primerlerinin (MK169-MK173) TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



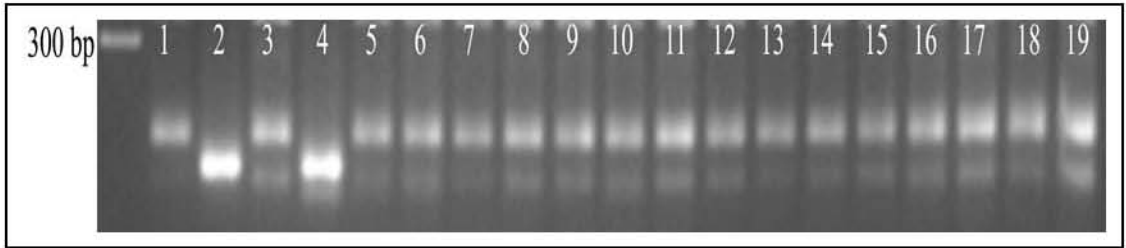
Şekil Ek-21. BNL1434 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



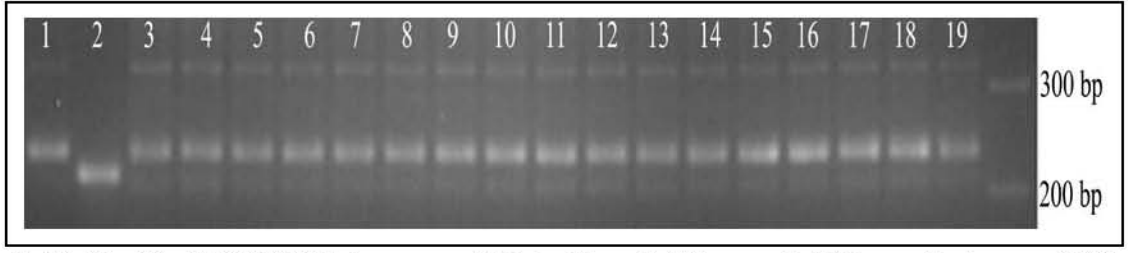
Şekil Ek-22. BNL3971 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 1)



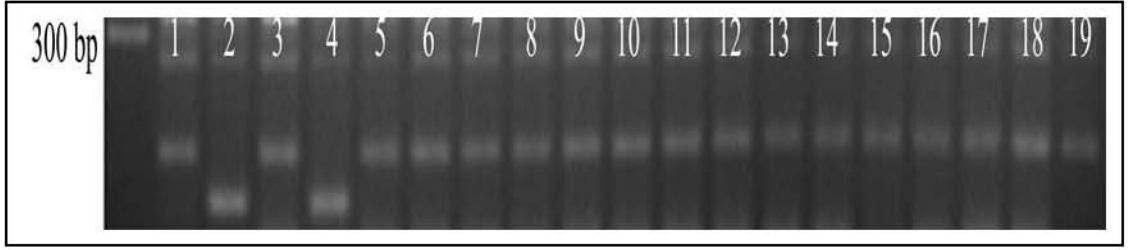
Şekil Ek-23. BNL3971 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



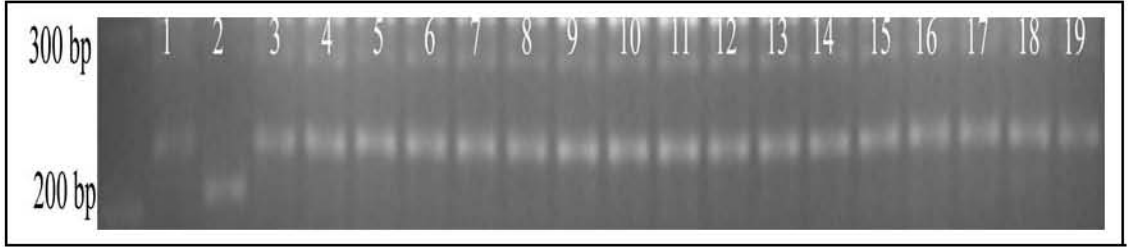
Şekil Ek-24. BNL3792 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 1)



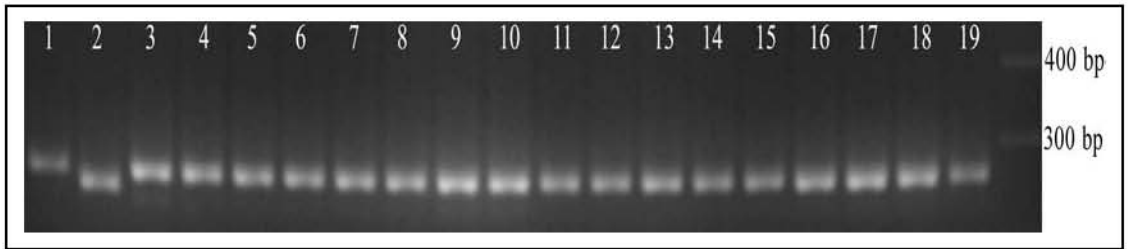
Şekil Ek-25. BNL3792 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



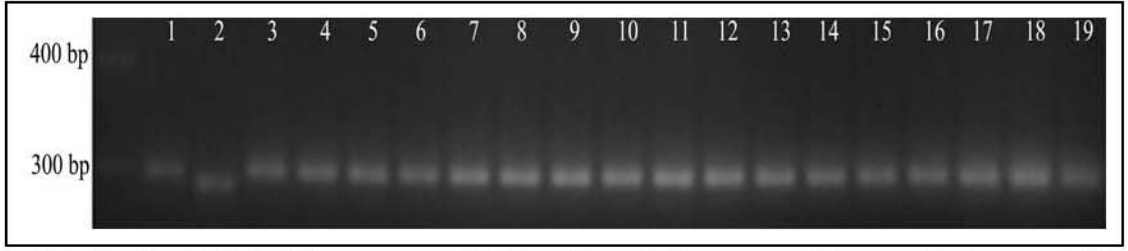
Şekil Ek-26. BNL3255 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 1)



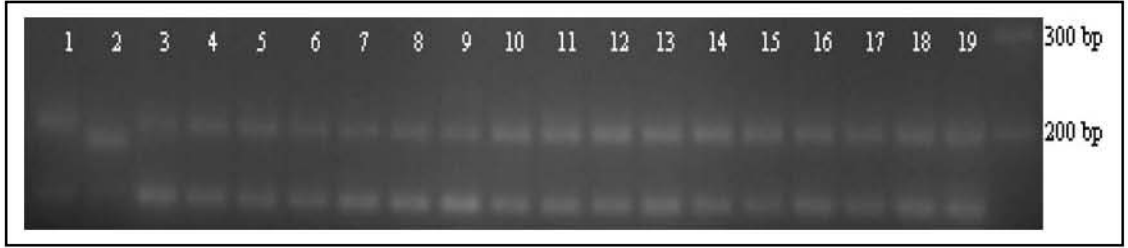
Şekil Ek-27. BNL3255 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



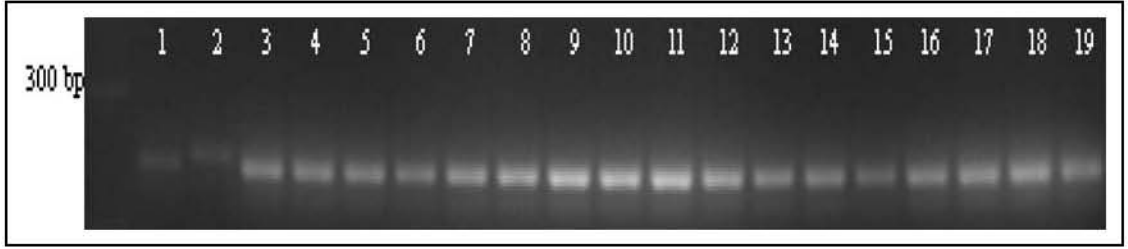
Şekil Ek-28. TMB0154 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



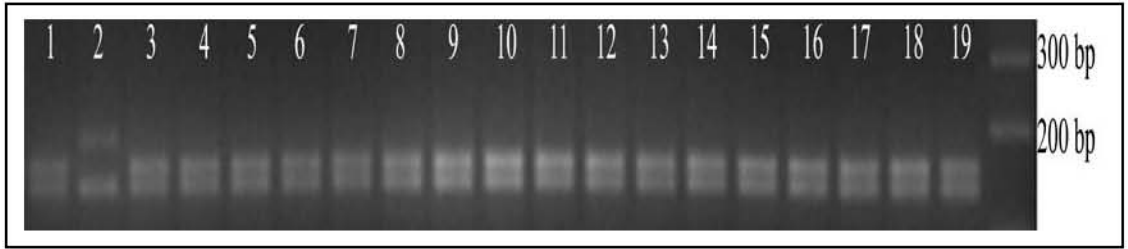
Şekil Ek-29. BNL3995 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



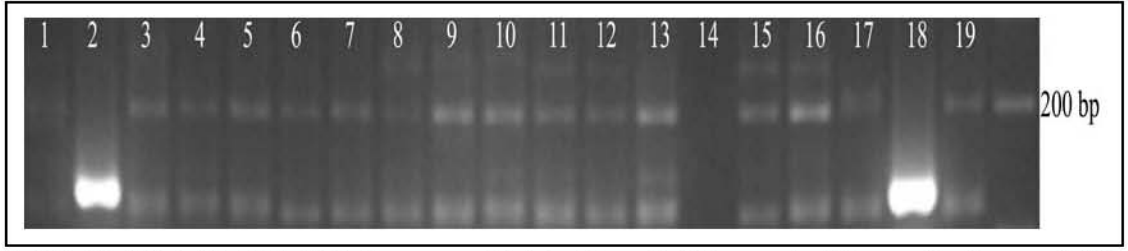
Şekil Ek-30. CIR141 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



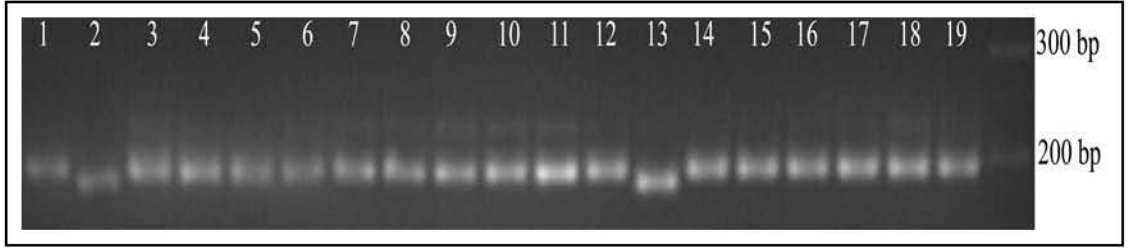
Şekil Ek-31. BNL3415 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



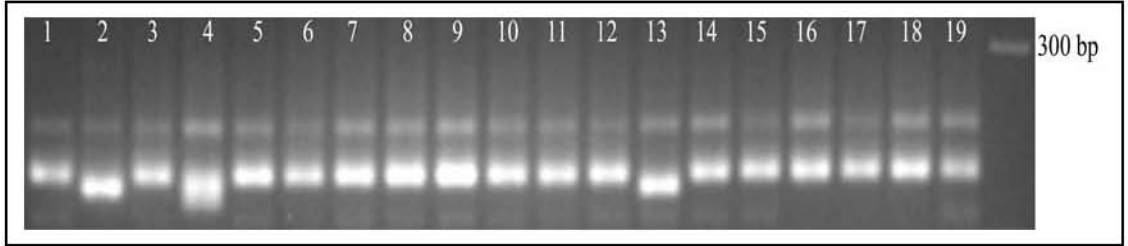
Şekil Ek-32. BNL1679 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



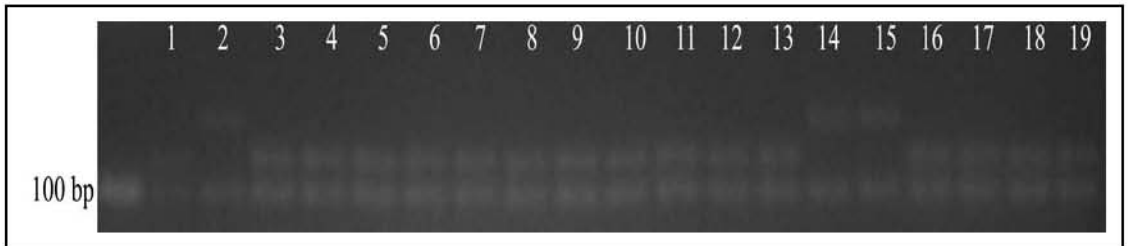
Şekil Ek-33. MGAES-10 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



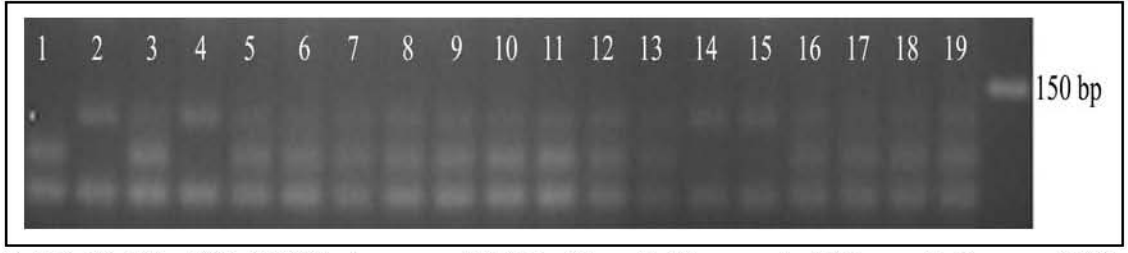
Şekil Ek-34. BNL3065 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



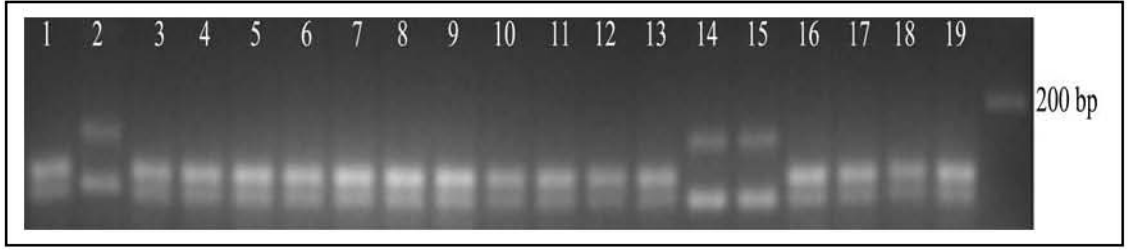
Şekil Ek-35. BNL3065 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 1)



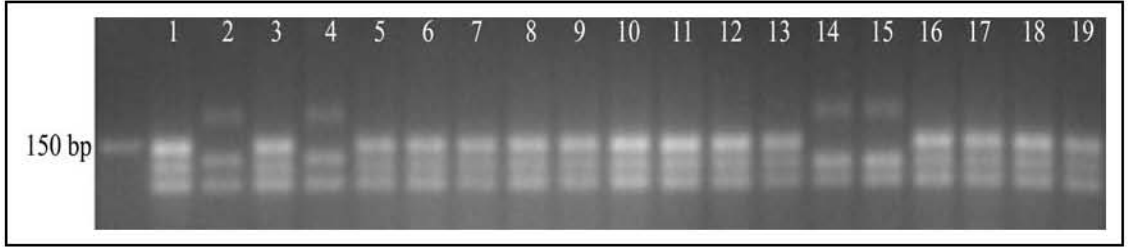
Şekil Ek-36. BNL2496 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



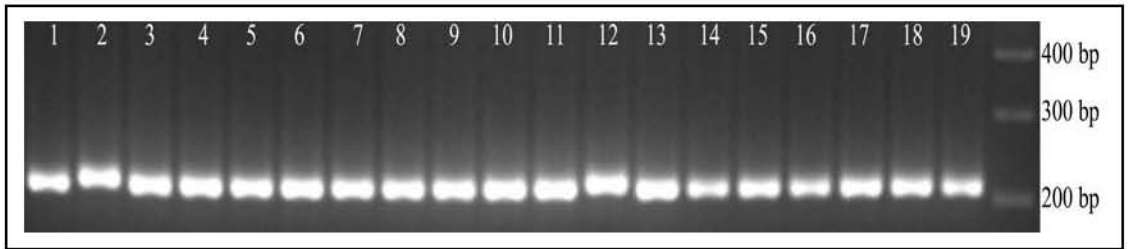
Şekil Ek-37. BNL2496 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 1)



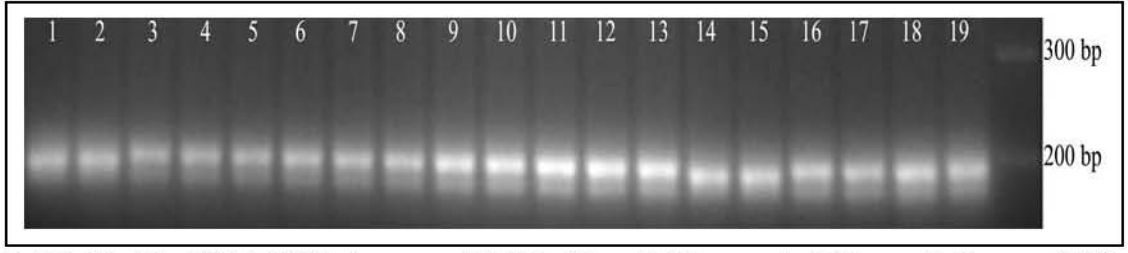
Şekil Ek-38. BNL3408 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



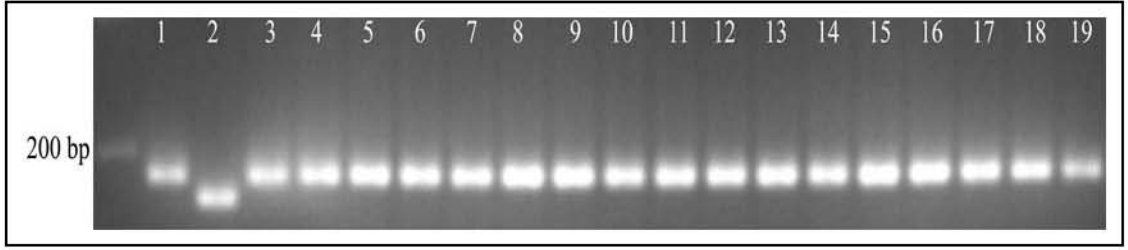
Şekil Ek-39. BNL3408 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 1)



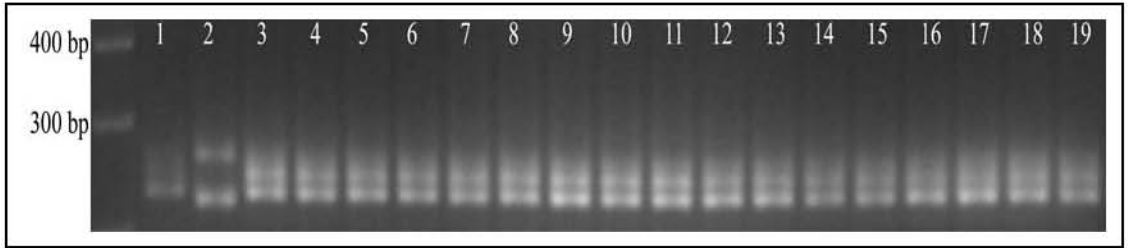
Şekil Ek-40. BNL1597 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 3)



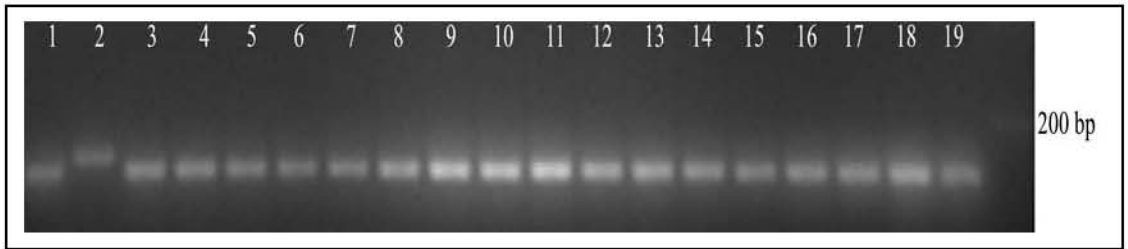
Şekil Ek-41. BNL1606 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



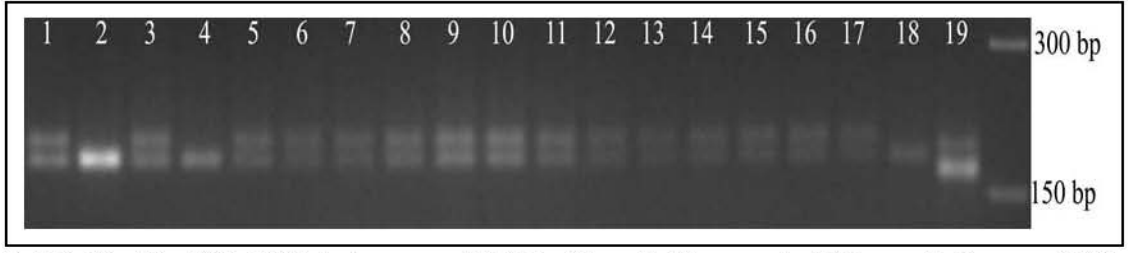
Şekil Ek-42. BNL1721 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



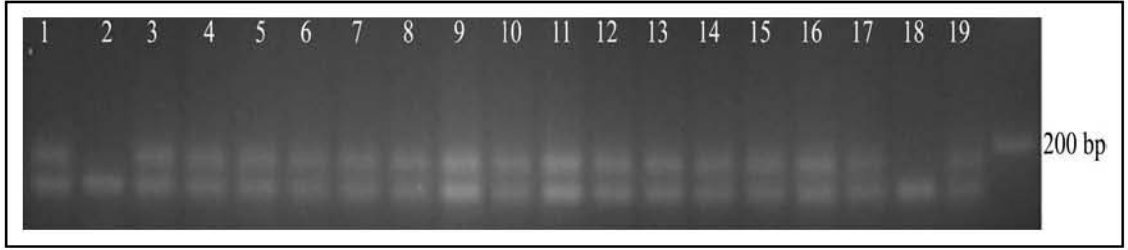
Şekil Ek-43. BNL2571 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



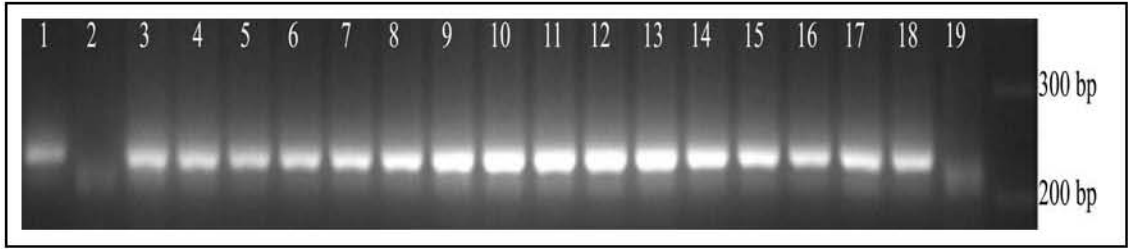
Şekil Ek-44. BNL1079 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



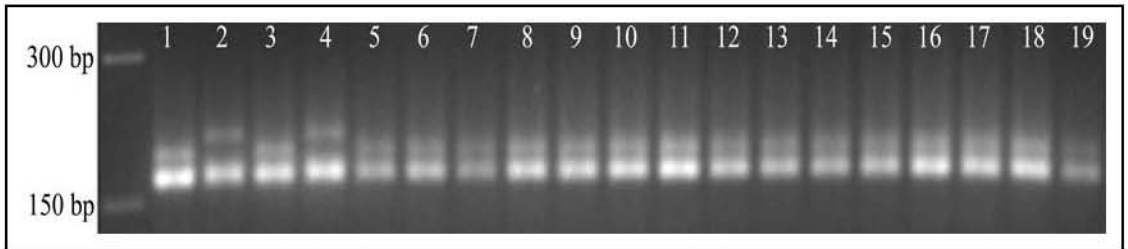
Şekil Ek-45. BNL0673 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 1)



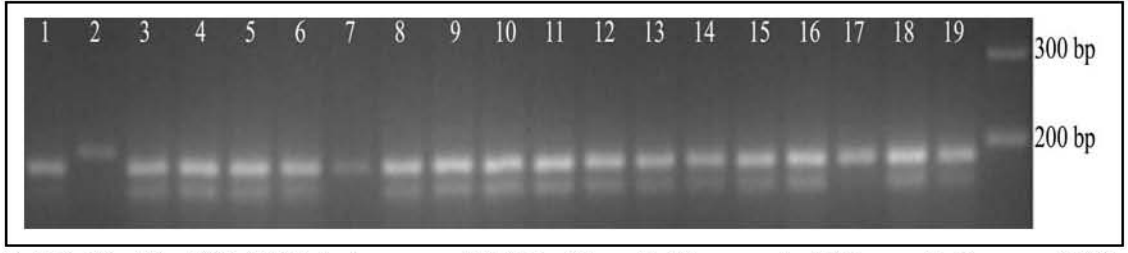
Şekil Ek-46. BNL0673 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



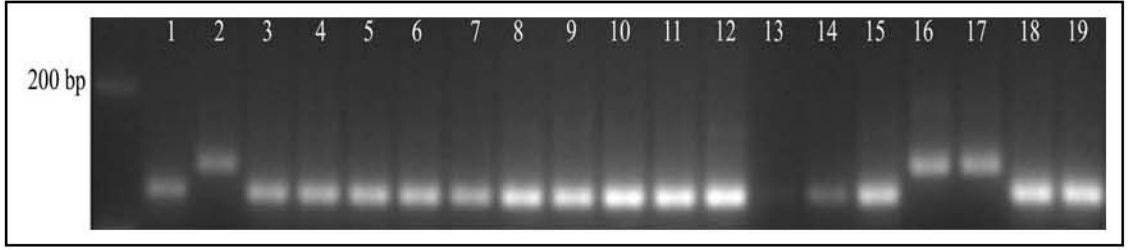
Şekil Ek-47. BNL3463 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



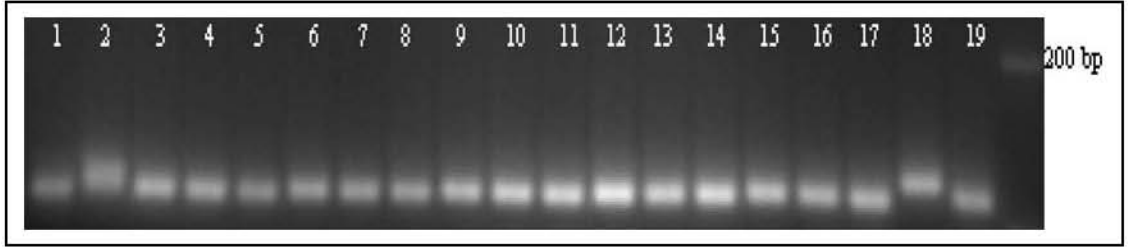
Şekil Ek-48. BNL3103 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 1)



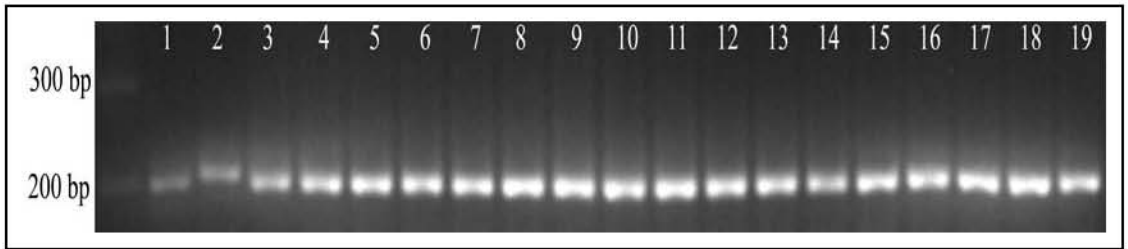
Şekil Ek-49. BNL3103 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



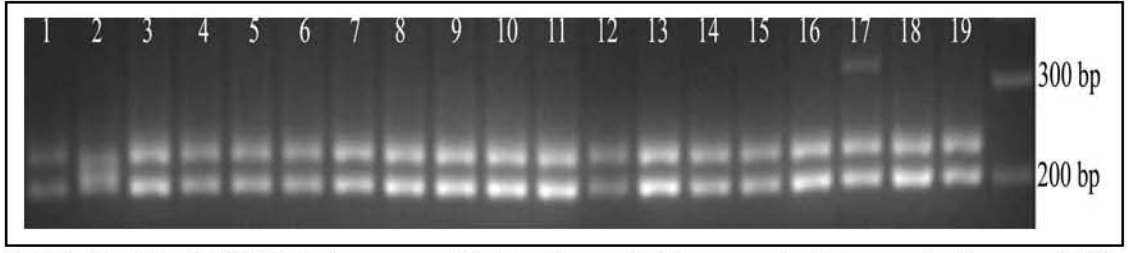
Şekil Ek-50. BNL3873 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 3)



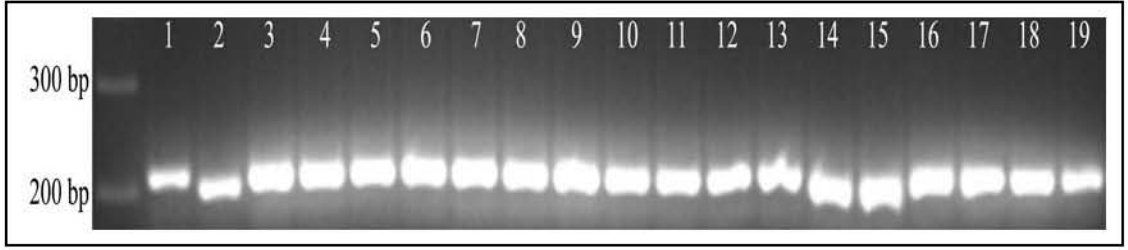
Şekil Ek-51. BNL4030 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 3)



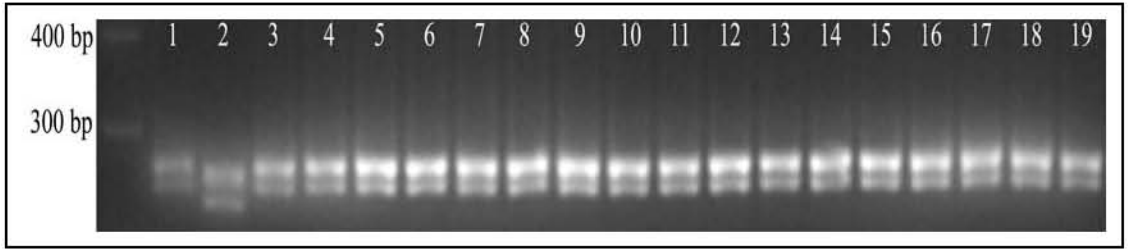
Şekil Ek-52. MK007 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



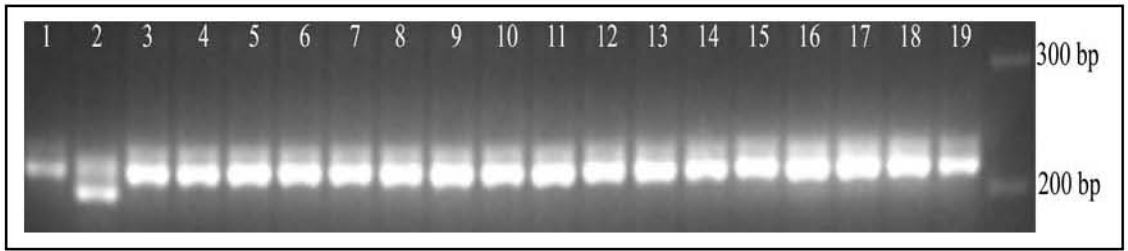
Şekil Ek-53. MK017 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



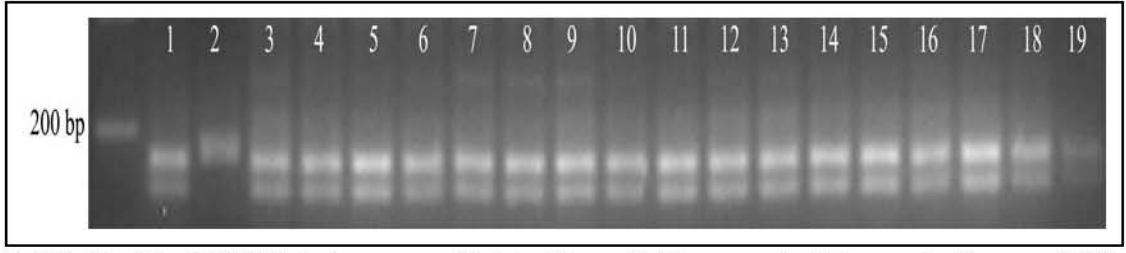
Şekil Ek-54. MK019 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



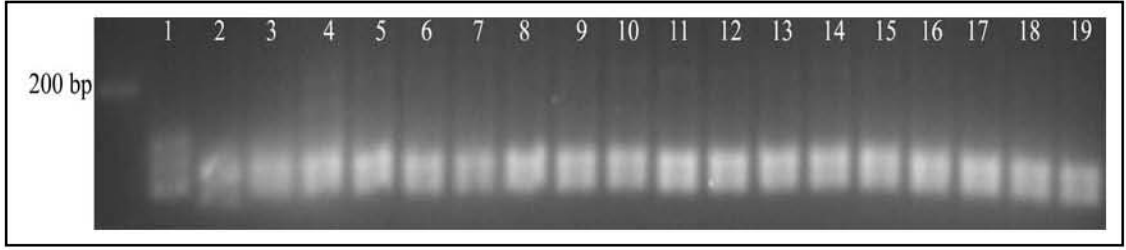
Şekil Ek-55. MK027 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



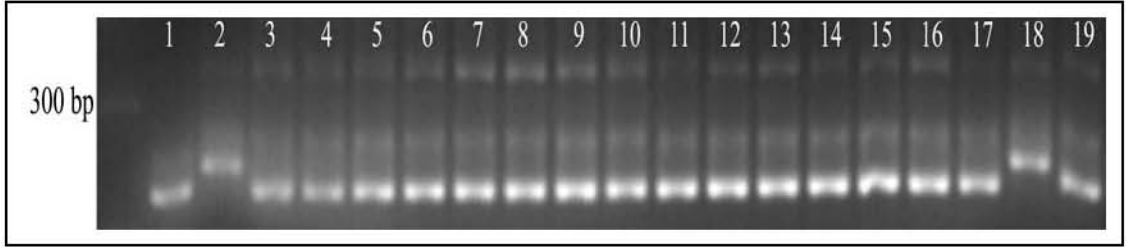
Şekil Ek-56. MK033 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



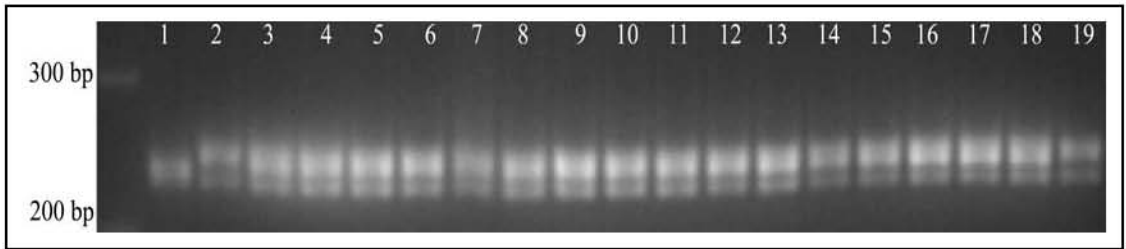
Şekil Ek-57. MK035 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



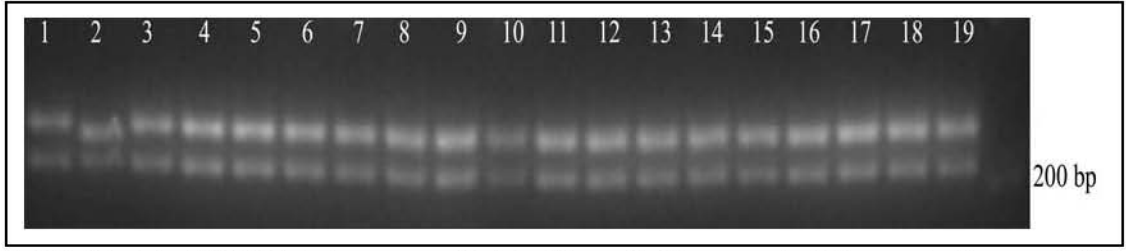
Şekil Ek-58. MK039 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



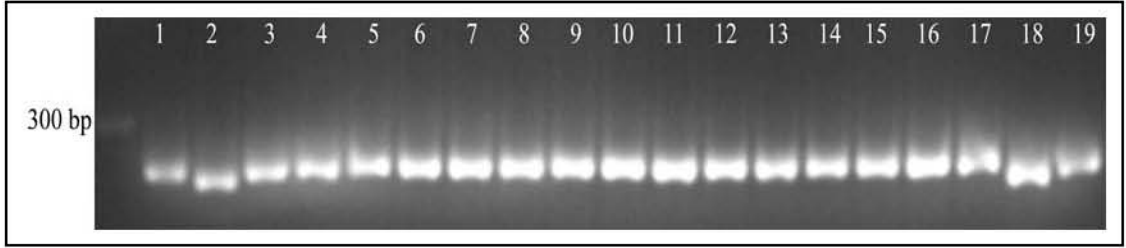
Şekil Ek-59. MK41 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



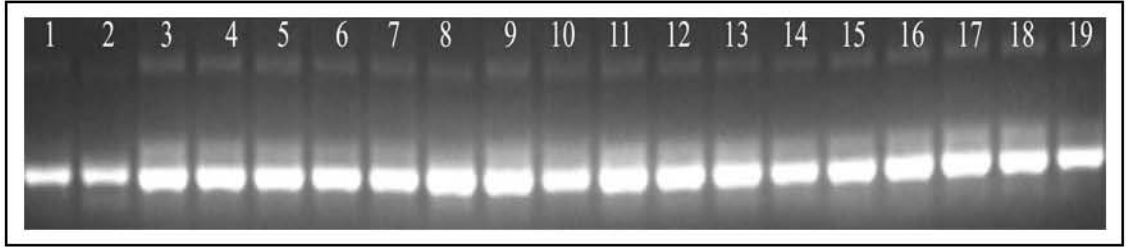
Şekil Ek-60. MK044 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



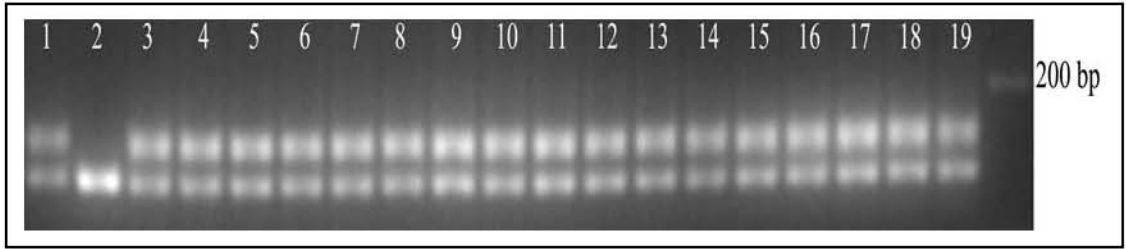
Şekil Ek-61. MK046 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



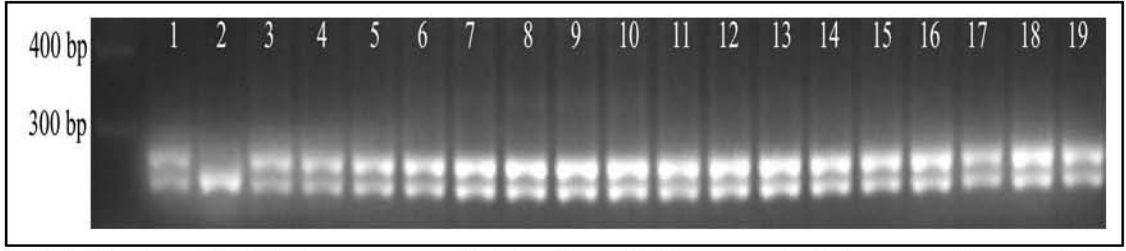
Şekil Ek-62. MK051 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



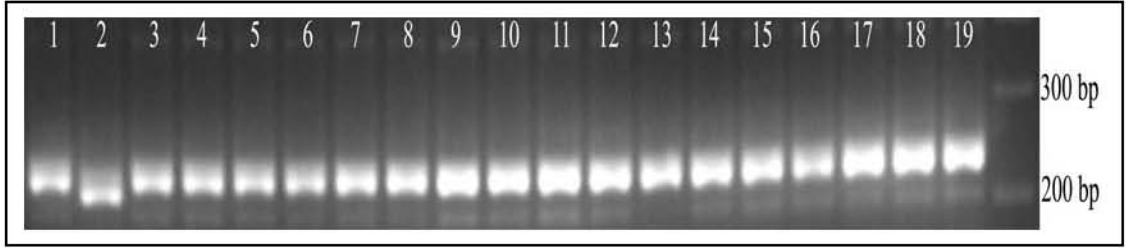
Şekil Ek-63. MK052 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



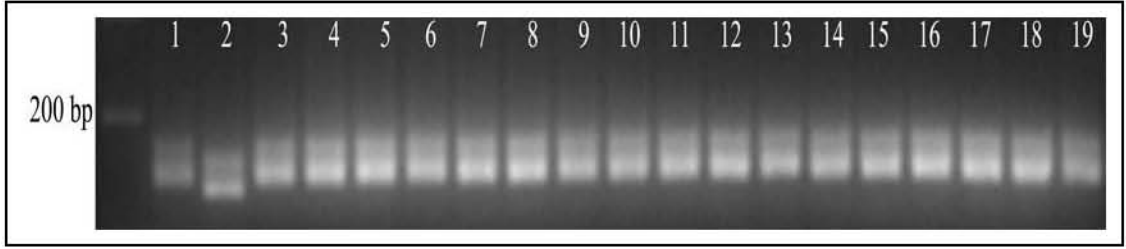
Şekil Ek-64. MK053 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampliconların jel görüntüsü (Set 2)



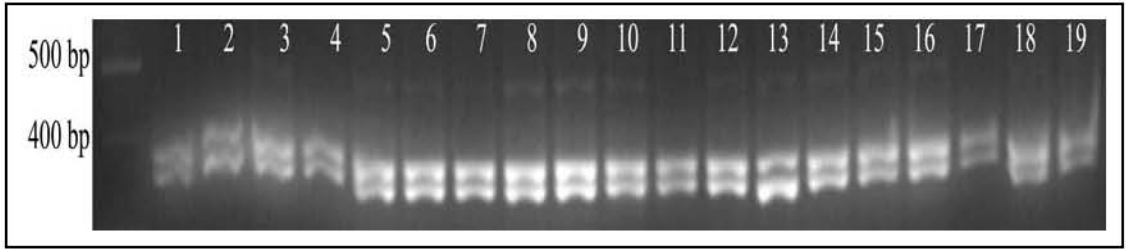
Şekil Ek-65. MK054 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



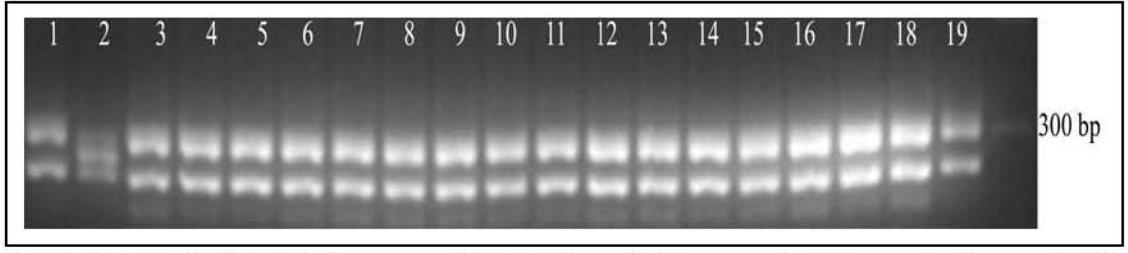
Şekil Ek-66. MK060 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



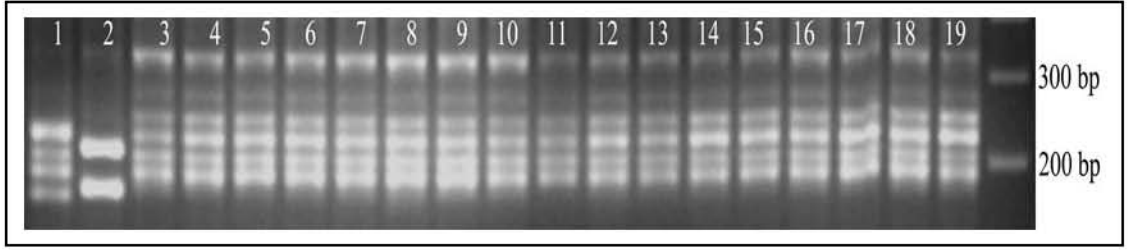
Şekil Ek-67. MK061 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



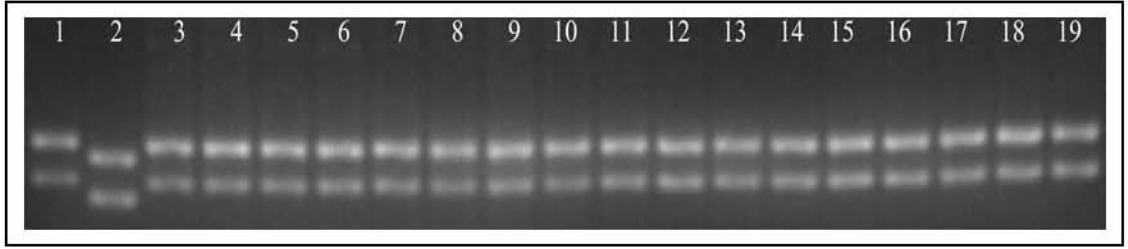
Şekil Ek-68. MK064 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



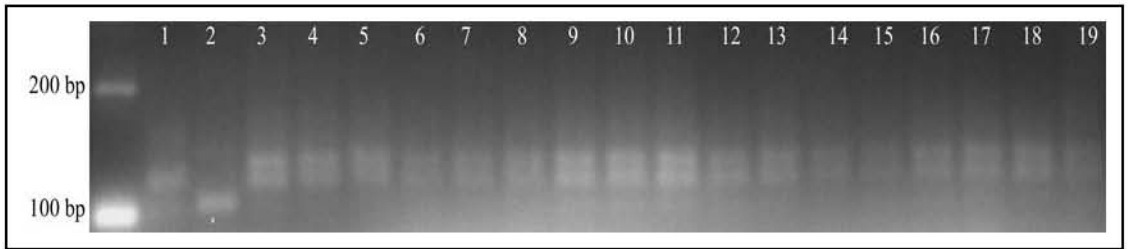
Şekil Ek-69. MK065 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



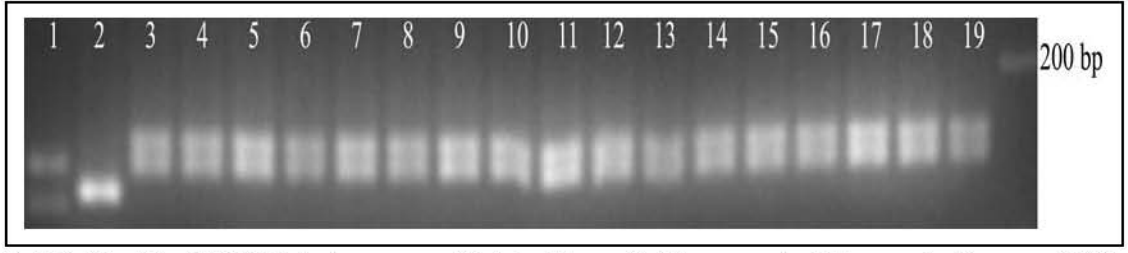
Şekil Ek-70. MK072 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



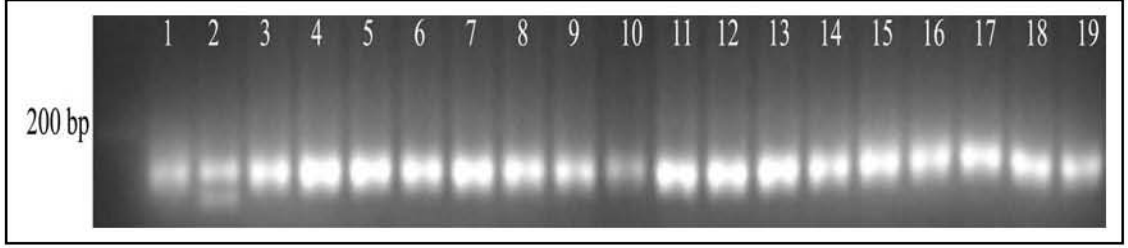
Şekil Ek-71. MK073 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



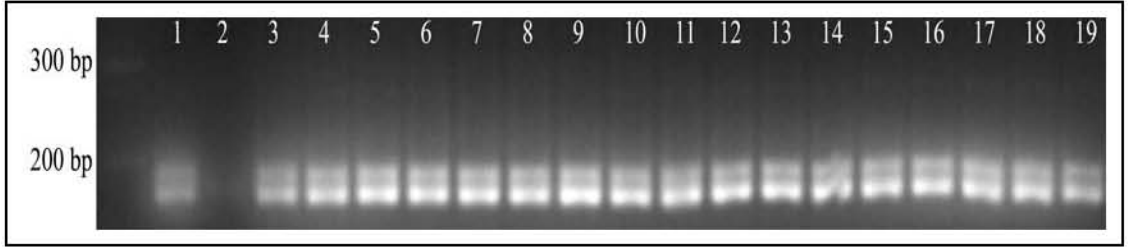
Şekil Ek-72. MK079 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



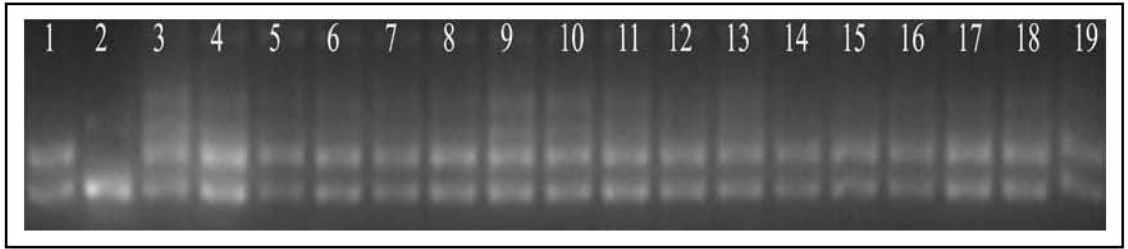
Şekil Ek-73. MK088 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



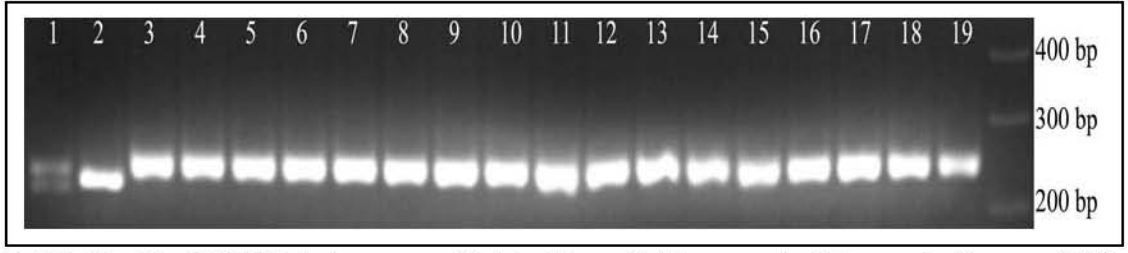
Şekil Ek-74. MK093 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



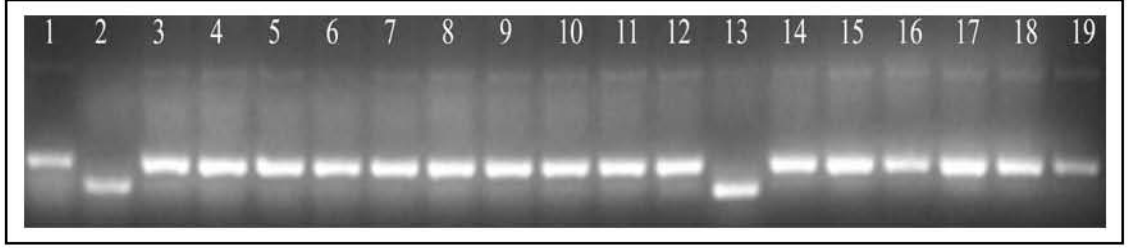
Şekil Ek-75. MK107 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



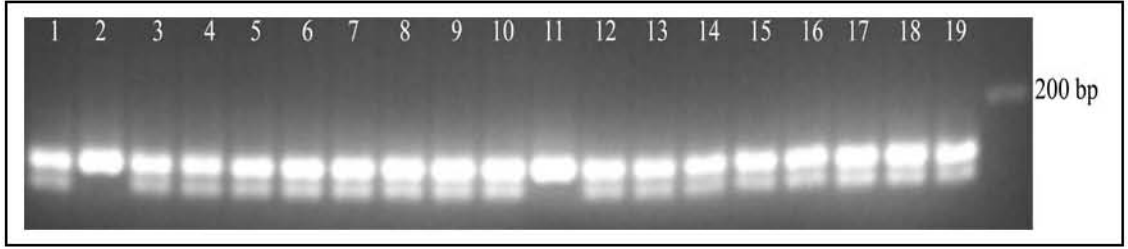
Şekil Ek-76. MK108 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



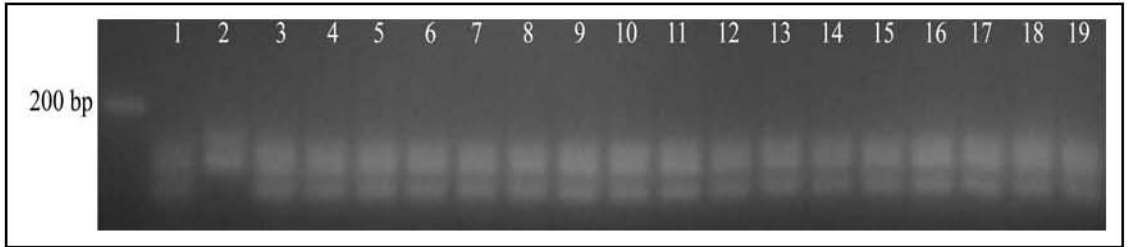
Şekil Ek-77. MK131 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



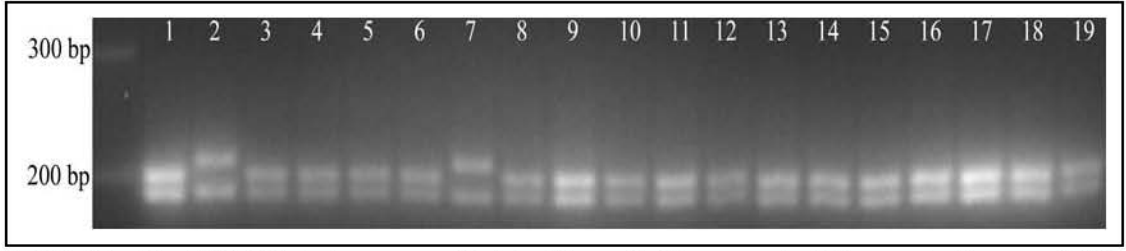
Şekil Ek-78. MK139 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



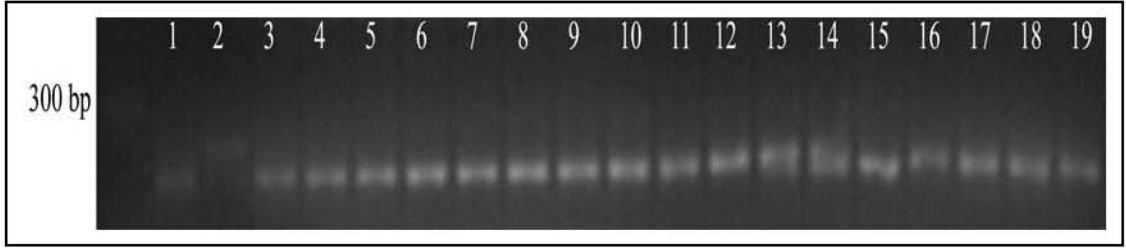
Şekil Ek-79. MK143 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



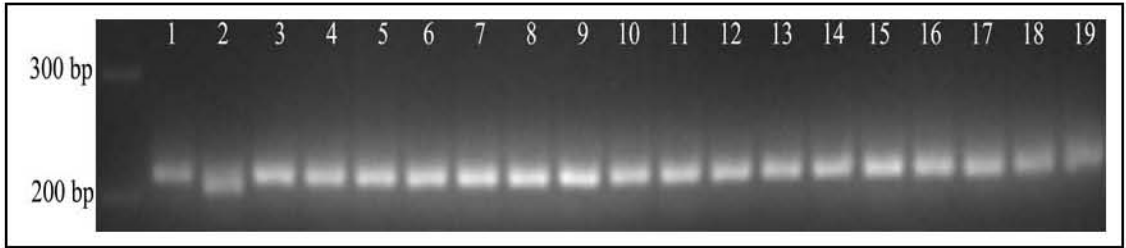
Şekil Ek-80. MK147 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



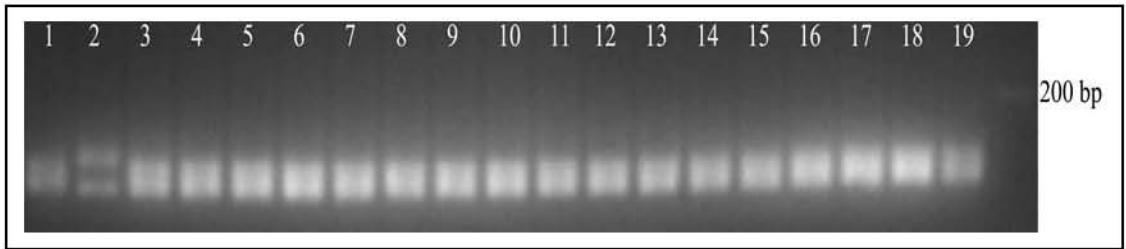
Şekil Ek-81. MK156 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



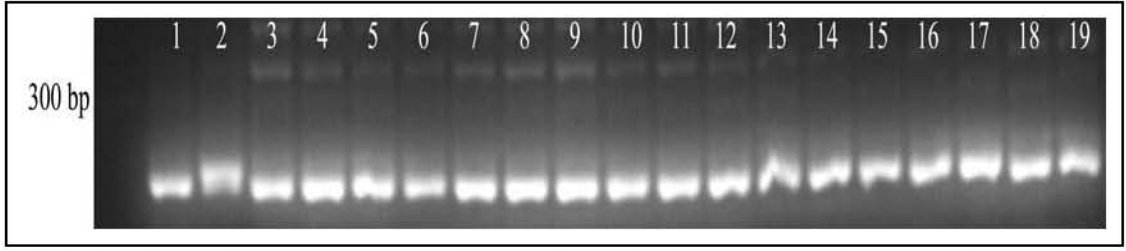
Şekil Ek-82. MK157 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



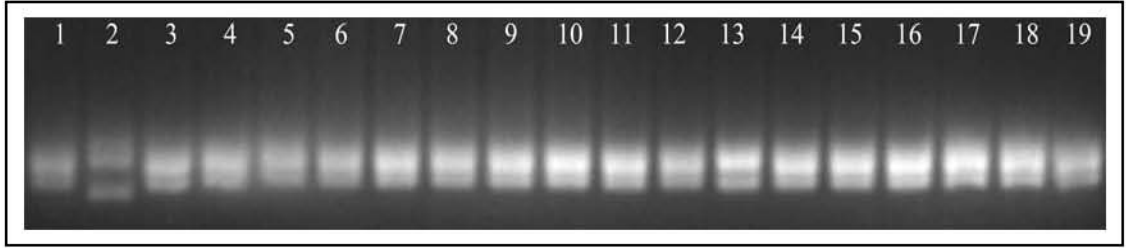
Şekil Ek-83. MK160 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



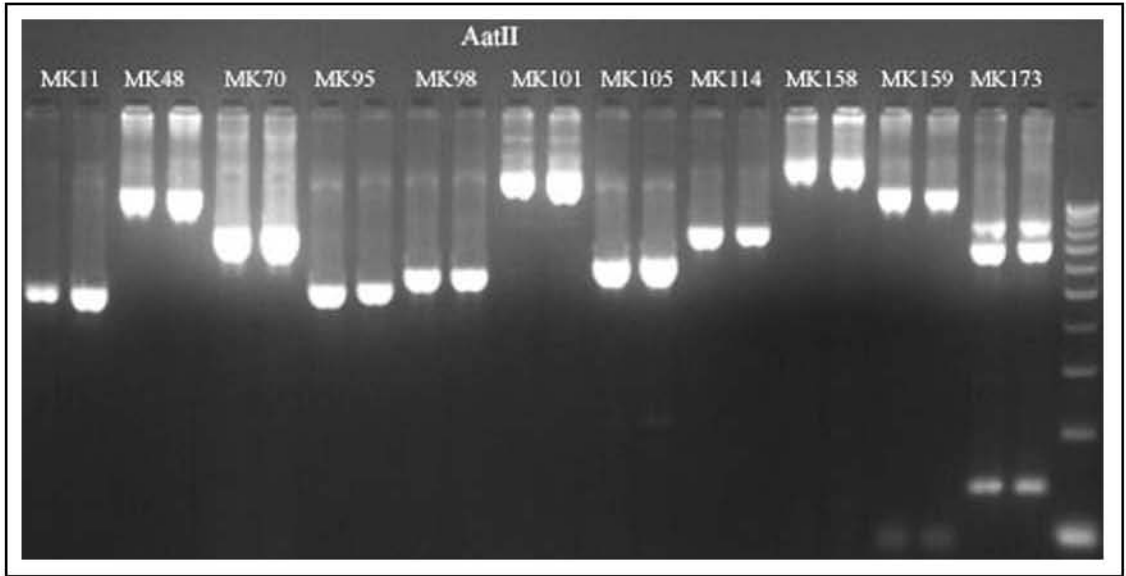
Şekil Ek-84. MK168 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



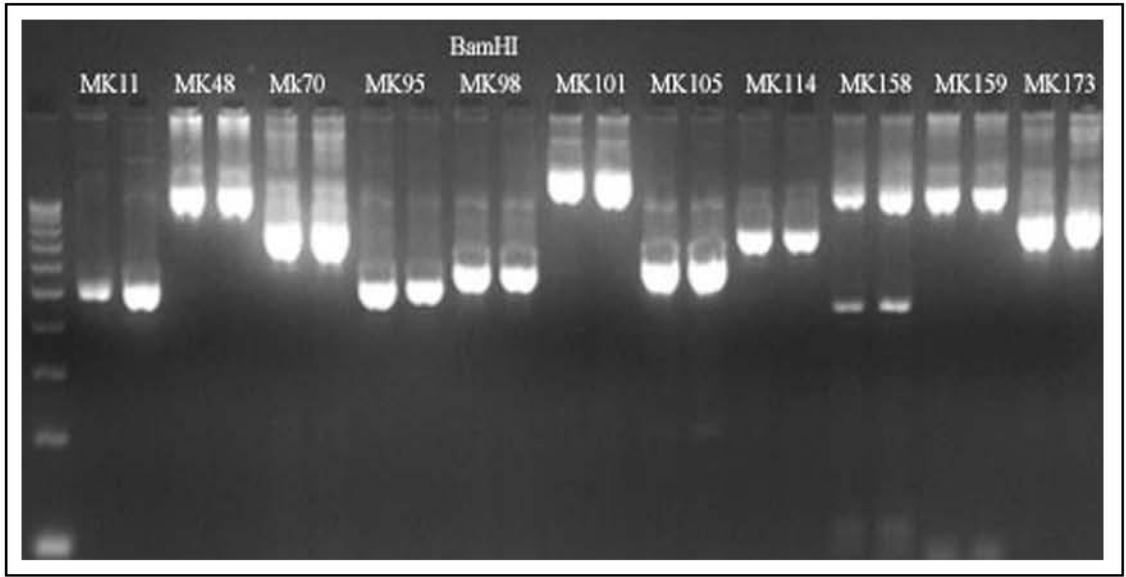
Şekil Ek-85. MK169 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



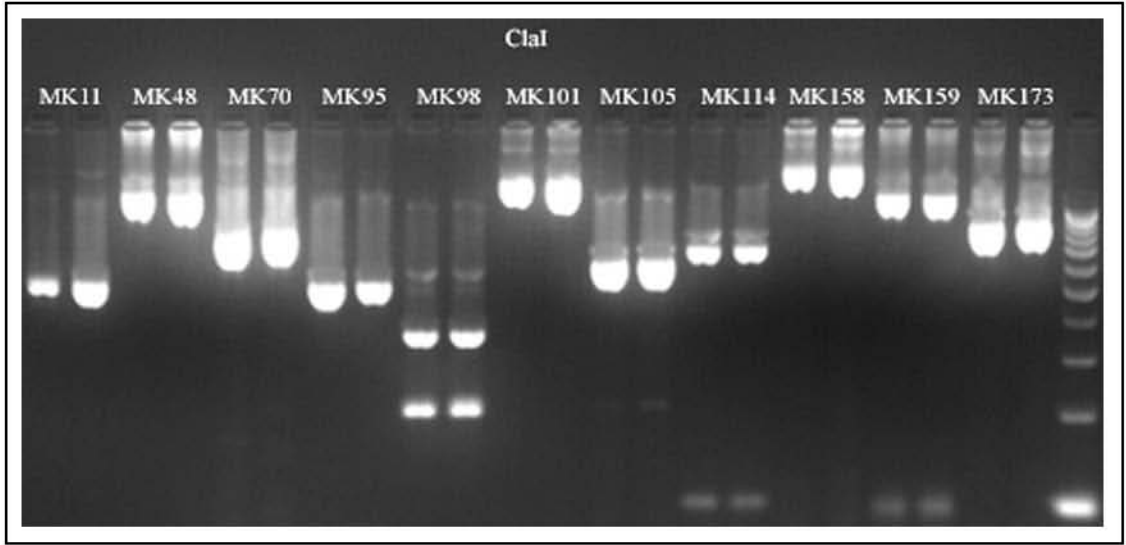
Şekil Ek-86. MK170 lokusunun TM-1, Pima 3-79 ve substitüsyon hatlarının PZR sonucu oluşturduğu ampikonların jel görüntüsü (Set 2)



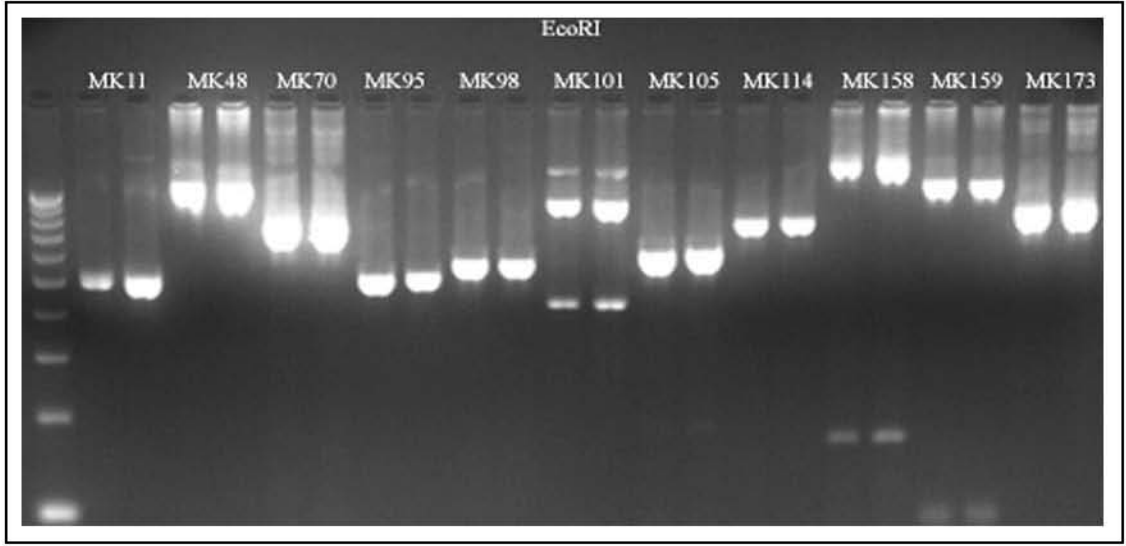
Şekil Ek-87. *Aat* II restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



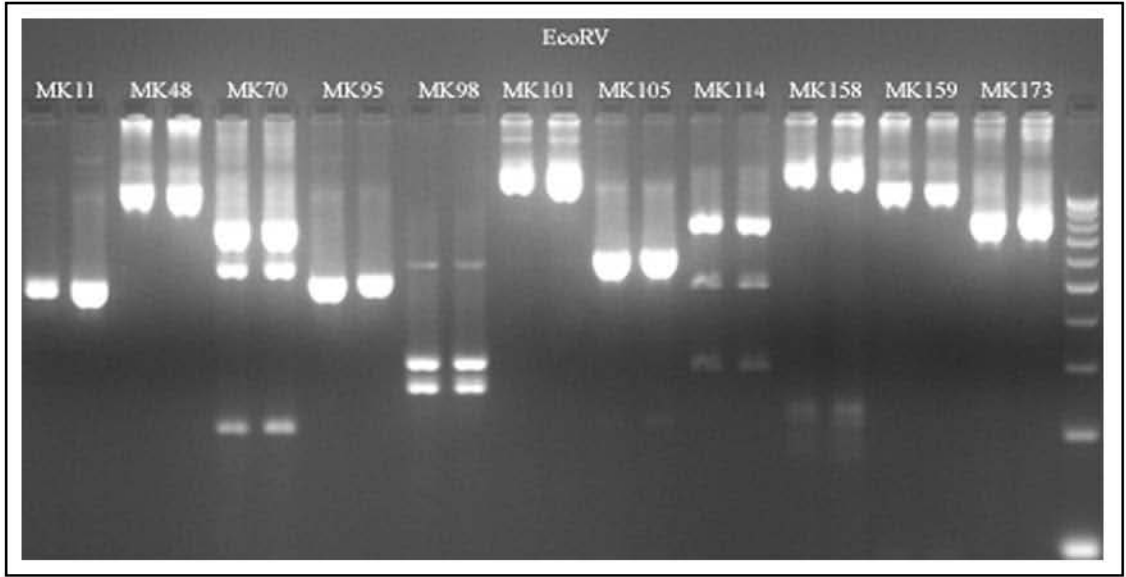
Şekil Ek-88. *BamH* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



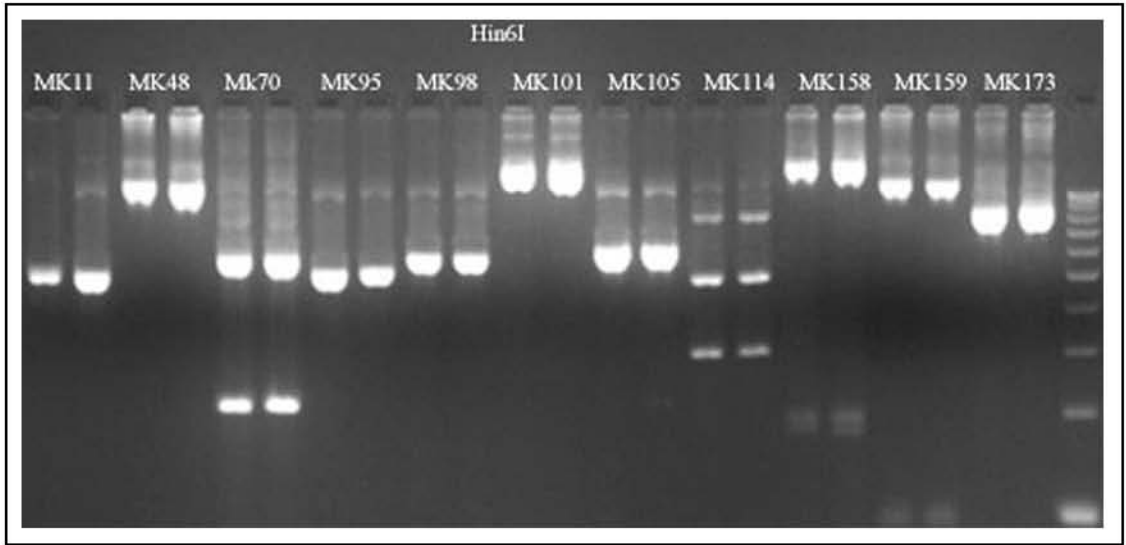
Şekil Ek-89. *Cla* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



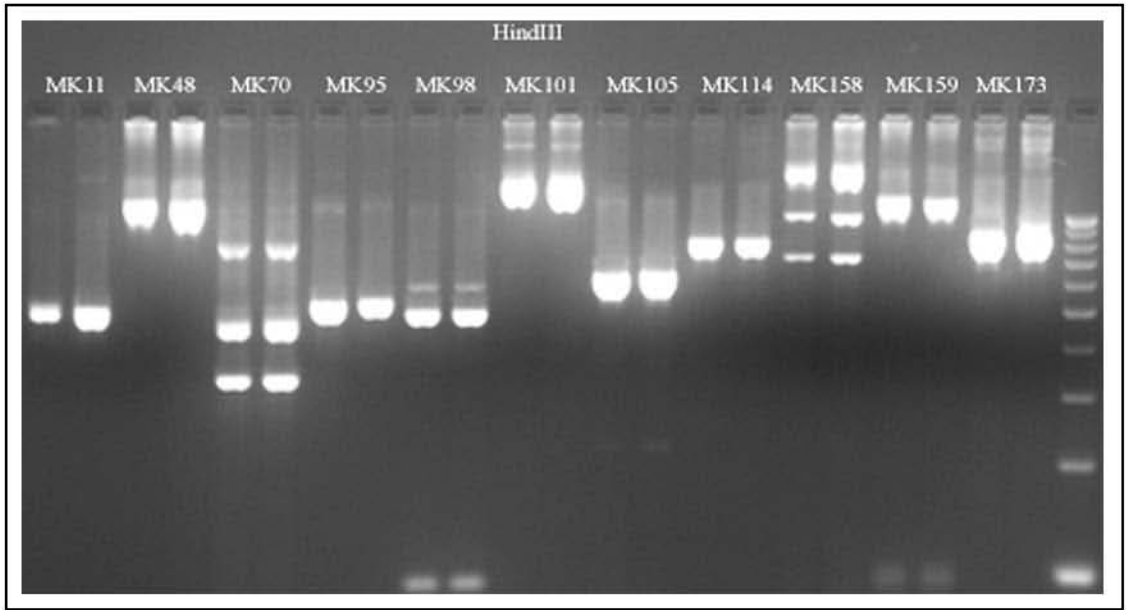
Şekil Ek-90. *EcoR* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



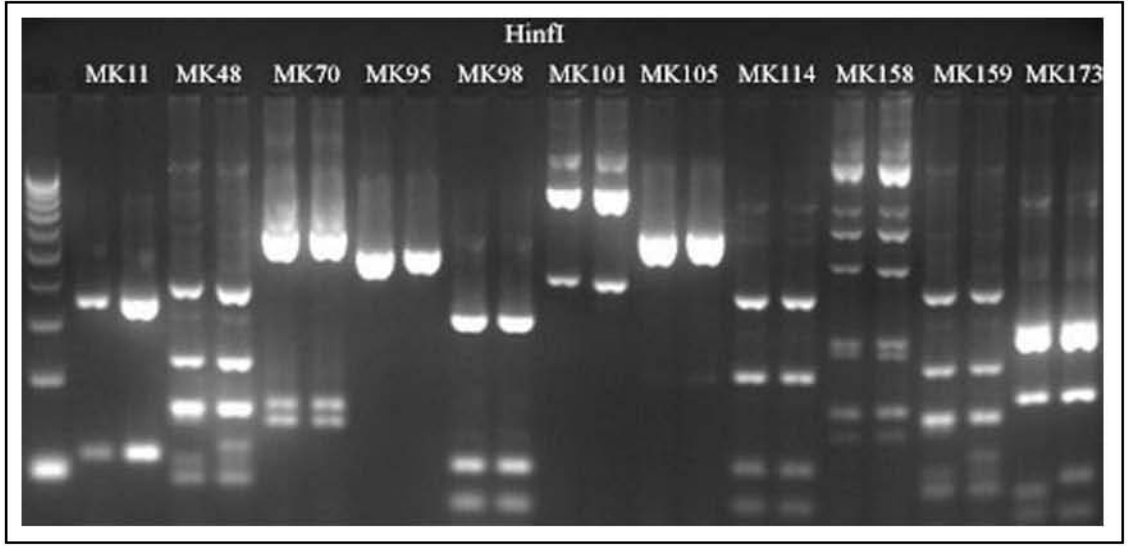
Şekil Ek-91. *EcoR* V restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



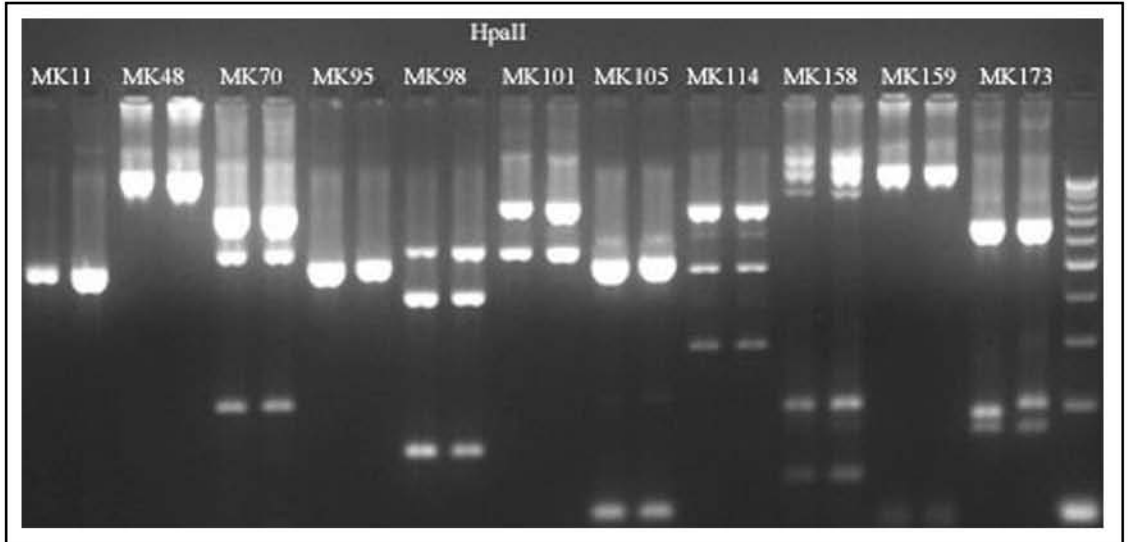
Şekil Ek-92. *Hin6* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



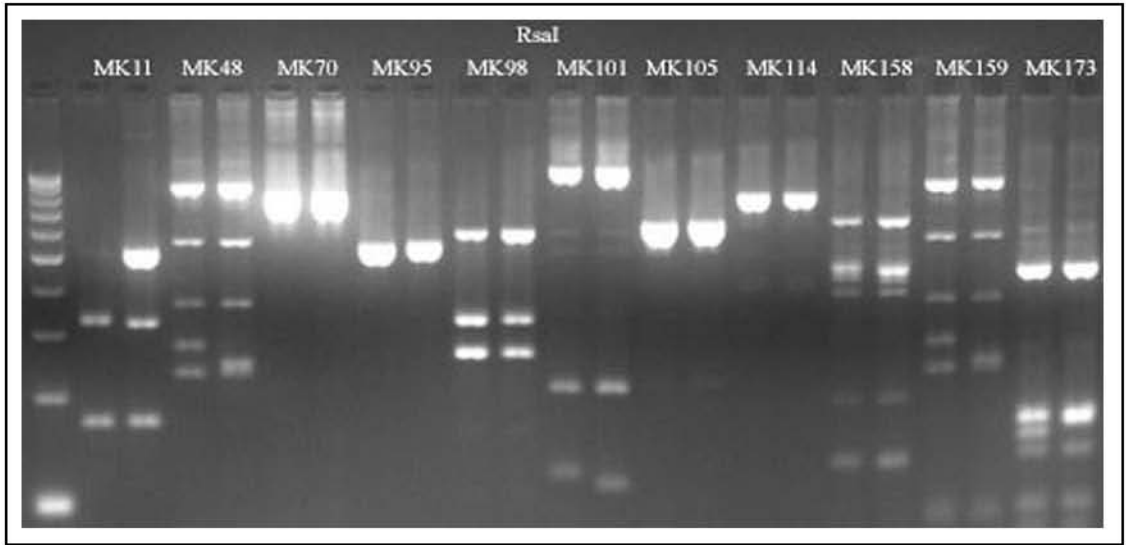
Şekil Ek-93. *Hind* III restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



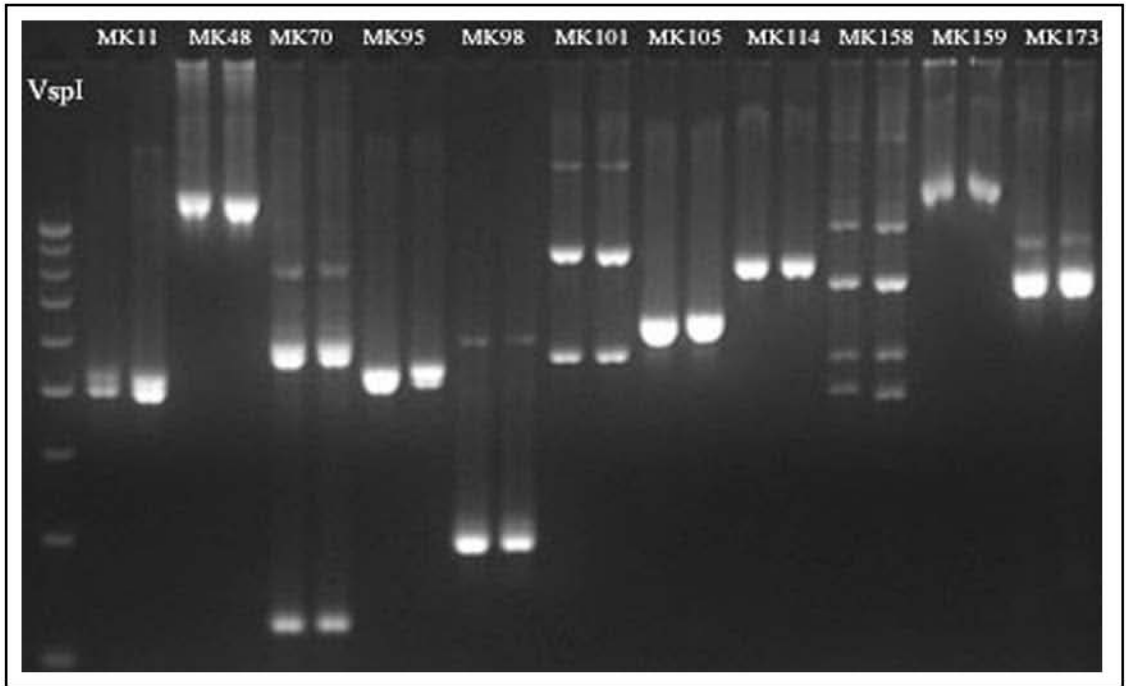
Şekil Ek-94. *Hinf* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



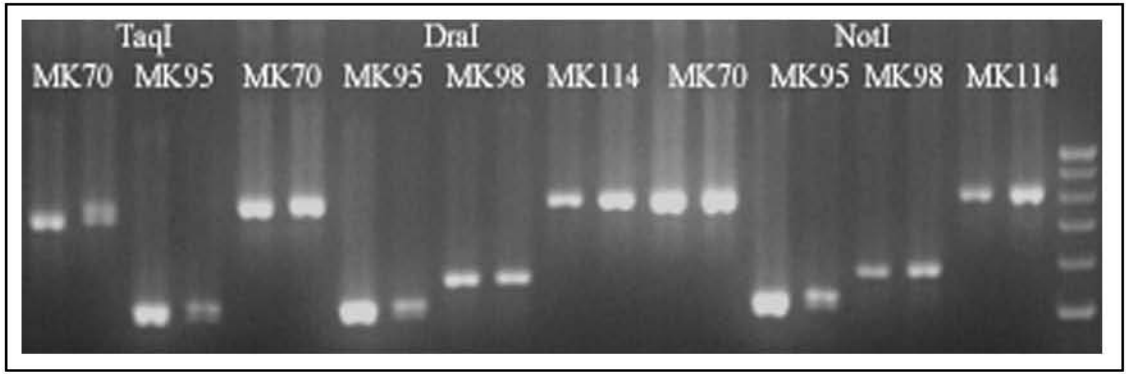
Şekil Ek-95. *Hpa* II restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



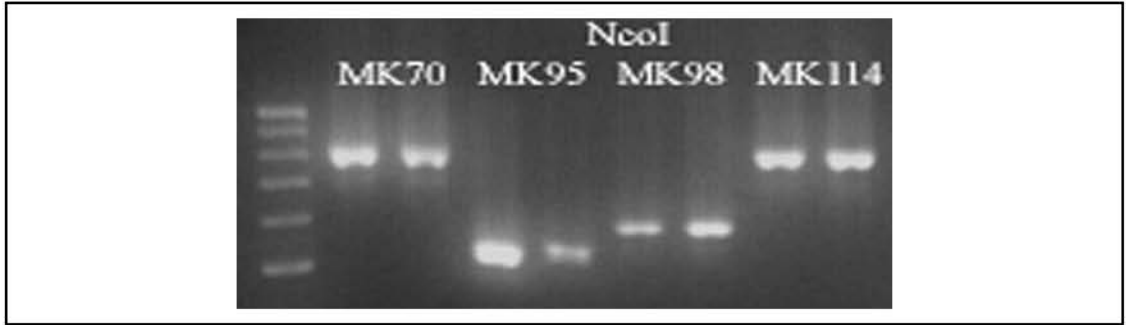
Şekil Ek-96. *Rsa* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



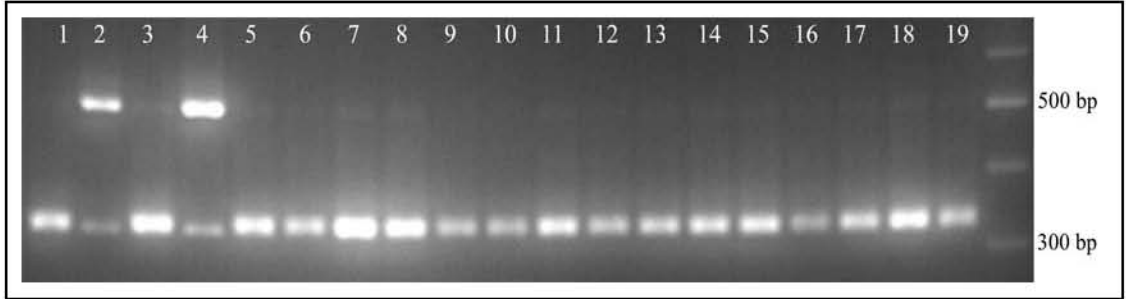
Şekil Ek-97. *Vsp* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



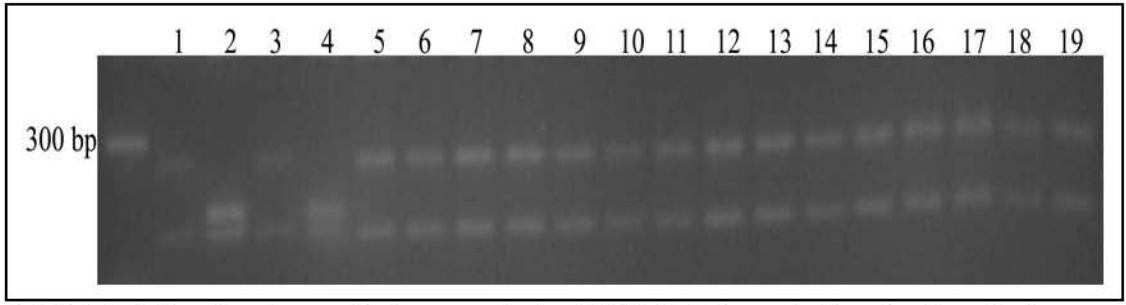
Şekil Ek-98. *Taq* I, *Dra* I ve *Not* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



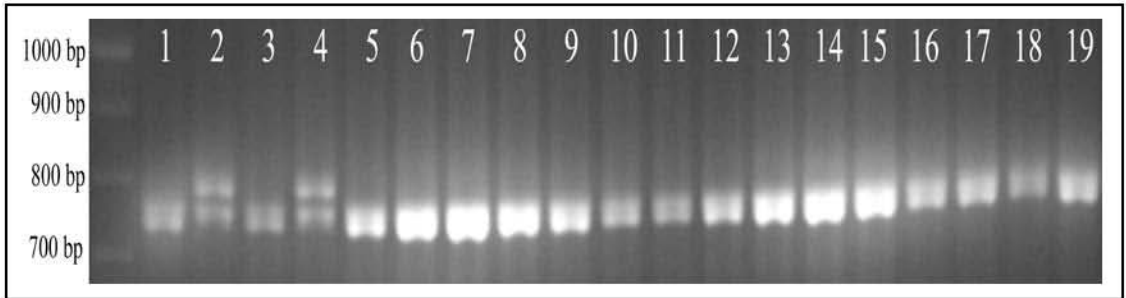
Şekil Ek-99. *Nco* I restriksiyon enziminin MK lokusları kullanılarak TM-1 ve Pima 3-79 hatlarında taranması



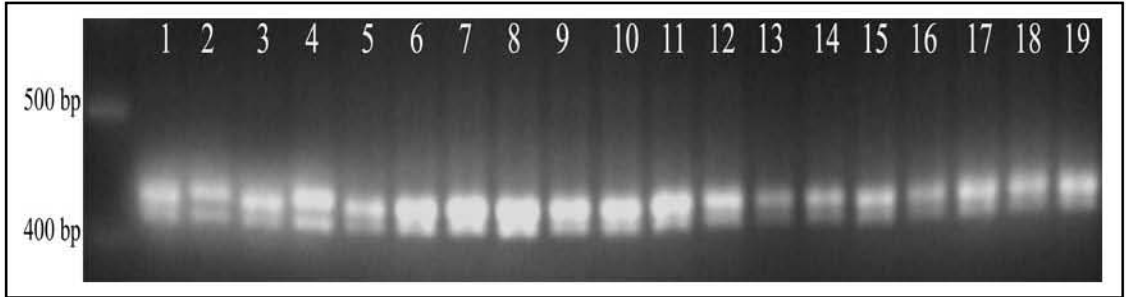
Şekil Ek-100. *Rsa* I restriksiyon enziminin MK011 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



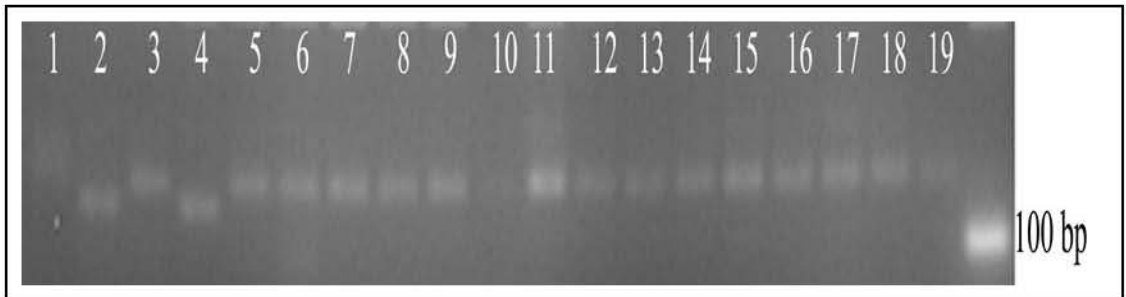
Şekil Ek-101. *Rsa* I restriksiyon enzimin MK048 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



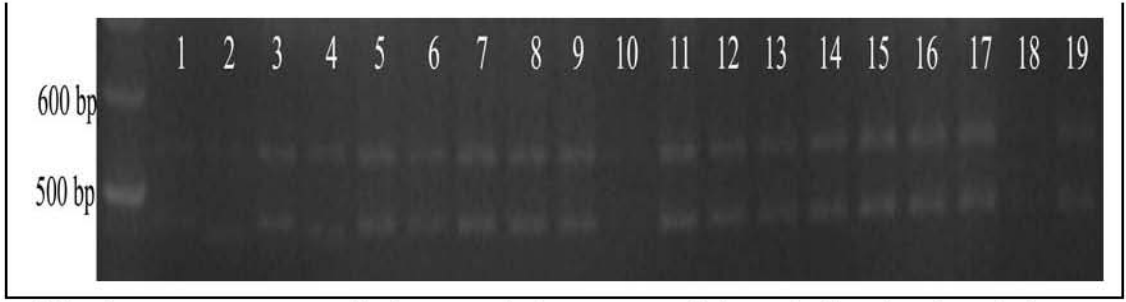
Şekil Ek-102. *Taq* I restriksiyon enzimin MK070 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



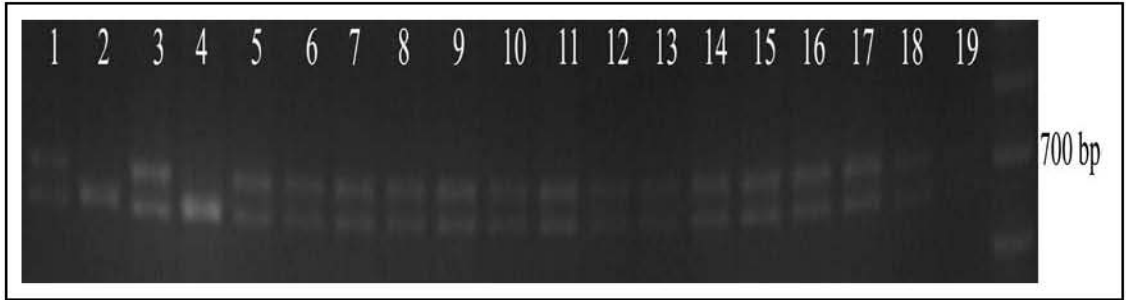
Şekil Ek-103. *Hae* III restriksiyon enzimin MK095 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



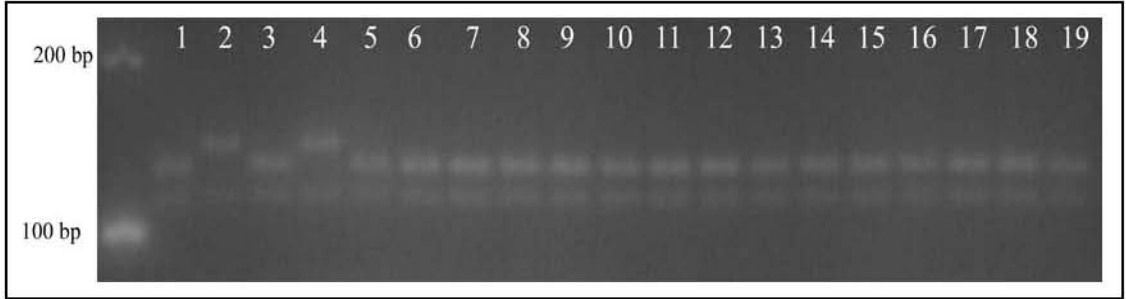
Şekil Ek-104. *Rsa* I restriksiyon enzimin MK101 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



Şekil Ek-105. *Vsp* I restriksiyon enzimin MK158 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



Şekil Ek-106. *Hae* III restriksiyon enzimin MK159 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi



Şekil Ek-107. *Hae* III restriksiyon enzimin MK173 lokusu kullanılarak substitüsyon hatlarında analiz edilmesi

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad	: Adnan Aydın
Doğum Yeri Ve Tarihi	: Mardin – 1982
Adres	: Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü
Telefon	: 0 242 310 65 67
Faks	: 0 242 227 45 64
E-Posta	: aydina@Akdeniz.edu.tr

EĞİTİM

Yıl	Derece	Üniversite	Alan
2010-2013	Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	Tarla Bitkileri
2004-2009	Lisans	Akdeniz Üniversitesi	Tarla Bitkileri

AKADEMİK DENEYİM

Yıl	Ünvan	Bölüm	Üniversite
2010-....	Arş. Gör	Tarla Bitkileri	Akdeniz Üniversitesi

PROJELER

“Pamuk (*Gossypium* L.) Kromozom Substitüsyon Hatlarının Mikrosatellit Markırları Kullanılarak Belirlenmesi” Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, 2011.02.0121.052, **Yardımcı Araştırmacı**, 2012-2013.

“Pamuk Lif ve Ovül Gelişiminde DNA Sitozin Metilasyonunun Epigenetik Regülasyonu Üzerine Bir Araştırma” COST-TUBİTAK, 112T386, **Bursiyer**, 2012-2014.

KURS/TOPLANTI/WORKSHOP

“Epigenetics: from bench to bedside” Konferans. Salerno, İTALYA, 5-6 Kasım 2012.

YAYINLAR

SCI’ce taranan dergilerde yayınlanan yayınlar

KARACA, M., INCE, A.G., **AYDIN, A.**, AY S.T. 2012. Cross-genera transferable e-microsatellite markers for 12 genera of *Lamiaceae* family. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.5982.

INCE, A.G., KARACA, M., **AYDIN, A.** 2011. Comparison of multiple DNA alignment algorithms for *Labiatae* molecular phylogeny inferences. *Planta Medica* 12:1280.

Ulusal toplantılarda sunulan çalışmalar

İNAL, B., KARACA, M., **AYDIN, A.**, İNCE, A.G. 2012. Değişik Biyoinformatik Araçlar Kullanılarak ITS1, ITS2 Gen Bölgelerinin Substitüsyon Modellerin Ortaya Konulması. 21. ULUSAL BİYOLOJİ KONGRESİ, 3-7 Eylül 2012/İZMİR.

İNCE, A.G., **AYDIN, A.** KARACA, M. ONUS, A.N. 2011. Moleküler Markır Tekniklerinin Gelişimi ve Bitki Islahı ve Tohumculukta Kullanım Alanları. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011/Samsun. s:264-270.