

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİBERDE (*Capsicum annuum* L.) ÇİNKO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE
HARİTALANMASI**

Cansu ŞİMŞEK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

2015

ÖZET

BİBERDE (*Capsicum annuum* L.) ÇİNKO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE HARİTALANMASI

Cansu ŞİMŞEK

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nedim MUTLU

Aralık 2015, 60 sayfa

Yürütülen bu çalışmada, çinko eksikliğine karşı dayanıklılığı kontrol eden genlerin/QTL'lerin kromozom bölgelerinin belirlenmesi, bu genlere bağlı moleküler markırların tespit edilmesi ve Inter Primer Binding Sites (IPBS) markırlarının biber genomunda ilk defa haritalanması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular ve yöntemler, biberin (*Capsicum annuum* L.) üyesi olduğu *Solanaceae* familyasına ait diğer bitki türleri için de kullanılabilir nitelikte olabilir.

Bu çalışmada Alata/Mersin Bahçe Kùltürleri Araştırma Merkezine ait çinko (Zn) etkinliği yüksek *Capsicum annuum* L. hattı Alata21A ile Zn etkinliği düşük *Capsicum frutescens* L. PI281420'nin melezlenmesi ile oluşturulan 93 adet F₂ bireyine ait F_{2,3} popülasyonu kullanılmıştır. Genetik haritalama çalışması F₂ popülasyonunda, çinko etkinliği testlemeleri seçici genotipleme ile belirlenen 93 F₂ bitkisine ait F_{2,3} projenileri kullanılarak yürütülmüştür. Zn etkinlik testlemeleri, her F_{2,3} projesine yirmidört (24) bitkinin yarısı çinko destekli, diğer yarısı çinko desteksiz bitki düşecek şekilde üç tekerrürlü tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuştur. Yetiştirilen bitkiler 0-5 skalasına göre puanlanmış ve kuru madde miktarları her birey için ayrı ayrı belirlenmiştir. Hesaplamalar ile elde edilen sonuçlar, karakteri kontrol eden genleri/QTL'leri barındıran kromozom bölgelerinin yerinin tespitinde kullanılmıştır. Haritalama için kullanılan her bağlantı grubu dominant SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), IPBS (Inter Primer Binding Sites) markırları ve ko-dominant SSR (Simple Sequence Repeat) markırları kullanılarak belirlenmiştir. Markır analizleri sonucu elde edilen veriler ile JoinMap 4.1 programında genetik harita oluşturulmuş ve MapQTL 6 programıyla da genlerin/QTL'lerin yerleri tespit edilmiştir. Çinko etkinliğini kontrol eden 36 QTL 2, 3, 5, 8.1, 8.2, 10.2, 11, 12, X1, X3 ve X4 kromozomlarında tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile ilk defa IPBS markırları (44 adet) biber genomunda haritalanmıştır. Bu araştırma ile saptanan sonuçlar, çinko eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan gizli ve görünür verim kayıplarını gidermek için kullanılabilir niteliktedir. Çinko etkinliğinin genetik mekanizmasının anlaşılması ve bu karakteri kontrol eden genlerin bağlantı gruplarının belirlenmesi, çinko etkinliği yüksek biber çeşitlerinin geliştirilip ülkemizin dünyada bir adım öne taşınması sağlanabilir.

ANAHTAR KELİMELER: Bitki besin elementi, moleküler markır, QTL, IPBS

JÜRİ: Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN

Yrd. Doç. Dr. Hasan PINAR

ABSTRACT

DETERMINATION AND MAPPING OF ZINC EFFICIENCY IN PEPPER

CANSU ŞİMŞEK

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nedim MUTLU

December 2015, 60 pages

The aim of the study was to identify chromosomal regions of QTL/genes determining zing-efficiency, development of molecular markers linked to the trait, and mapping the Inter Primer Binding Sites (IPBS) markers in the pepper genome. Results may be applicaple to other plant species that belong to Solanaceae family.

The plant material of the study was developed by crossing *Capsicum annuum* L. Alata21A and *Capsicum frutescens* L. PI281420, and selfing to generate F2 population. Genetic mapping was carried out in the F2 population while phenotyping was done using F3 progenies of F2 plants selected from two contrasting groups, low vs high zinc-efficient plants. Zinc efficiency was tested at F2:3 generation, 12 plants for low-zinc and 12 plants for normal zinc fertilization with three replications at Alata Horticulture Research Institute, Erdemli, Mersin. Zinc deficiency was scored using a 0-5 scale, and dry matter of each plant was measured at the end of treatment. The mean value of F3 progenies was used to map the trait in pepper genome. Linkage groups were created using dominant SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) and IPBS, and co-dominant SSR (Simple Sequence Repeat) markers. Molecular markers were analyzed using JoinMap 4.1 software to create linkage map, and MapQTL 6 software to map the QTL/genes on pepper genome. The 36 QTLs affecting zinc efficiency were mapped on chromosomes 2, 3, 5, 8.1, 8.2, 10.2, 11, 12, X1, X3, and X4. The 44 IPBS markers were mapped on pepper genome for the first time. The results are expected to be usefull for breeding zinc efficient pepper lines/cultivars for areas suffering from hidden yield loss due to available soil zinc content.

KEYWORDS: Molecular marker, plant nutrition element, QTL, IPBS

COMMITTEE: Prof. Dr. Nedim MUTLU (Supervisor)

Asst. Prof. Dr. Hatice İKTEN

Asst. Prof. Dr. Hasan PINAR

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında biberde (*Capsicum annuum* L.) çinko etkinliğinin belirlenmesi, çinko noksanlığına karşı dayanıklılığı kontrol eden genlere bağlı moleküler markırların tespit edilmesi ve söz konusu özelliklerin haritalanması amaçlanmıştır.

Öncelikle tez konumu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım. Tezimin ilerleyişi için yardım talep ettiğim yardımı esirgemeyen Mersin/Erdemli'de faaliyet gösteren Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına ve bu zorlu tez sürecinde benden desteğini bir an için bile bırakmayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hasan PINAR'a, en önemlisi tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bugün bu tezi hazırlamama vesile olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. Çinkonun Bitkiler İçin Önemi.....	5
2.2. Toprak ve Çinko İlişkisi.....	8
2.3. Çinkonun Toprakdan Alınımı ve Bitkiye Taşınımı.....	9
2.4. Bitkilerin Çinko Etkinliğiyle İlişkisi ve Kalıtımının Belirlenmesi.....	10
2.5. Çinko ile Bağlantılı Genler ve Haritalama Çalışmaları.....	12
2.5.1. Basit tekrarlı dizi (Simple sequence repeats (SSR)) markırları.....	13
2.5.2. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD)).....	14
2.5.3. Sekans ilişkili çoğaltılan polimorfizmi (Sequence-related amplified polymorphism (SRAP)).....	15
2.5.4. Primer bağlanma bölgesi arası (inter primer binding sites (IPBS)) markırları (retrotranspozonlar).....	15
3. MATERYAL ve METOT.....	17
3.1. Analiz İçin Kullanılan Bitki Materyali.....	17
3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	18
3.3. Genetik Haritalama ve Çinko Etkinliği İçin Popülasyonların Oluşturulması.....	19
3.4. Çinko Etkinliğinin Belirlenmesi.....	20
3.5. F ₂ Bitkilerinden DNA İzolasyonu.....	20
3.6. Markır Analizleri.....	21
3.6.1. SSR markır analizleri.....	22
3.6.2. SRAP markır analizleri.....	24
3.6.3. RAPD markır analizleri.....	26
3.6.4. IPBS markır analizleri.....	27
3.7. Jel Elektroforezi.....	28
3.8. Bağlantı Gruplarının Oluşturulması ve QTL Haritalama.....	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	30
4.1. Biberde Çinko Eksikliğine Karşı Testlemenin Yapılması ve Kalıtım ile İlişkisi.....	30
4.2. Genetik Haritalama.....	31
4.2.1. Moleküler çalışmalar.....	32
4.2.2. Bağlantı gruplarının oluşturulması.....	38
4.2.3. QTL analizleri.....	42
5. SONUÇ.....	48
6. KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
∞	Sonsuz
cM	Centimorgan
g	Gram
kb	Kilobaz
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
Mg	Miligram
pg	Pikogram
Zn	Çinko Elementi

Kısaltmalar

BATEM	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FAO	Food and Agriculture Organization
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribo Nükleik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biber yaprağında çinko noksanlığına bağlı olarak oluşan kloroz.....	6
Şekil 2.2. Bitki besin elementlerinin bitkiler tarafından optimum şekilde alındığı pH değerleri.....	9
Şekil 2.3. Sürgün ve köklerdeki ZIP1, ZIP2 ve ZIP4 genlerinin northern blot görüntüleri.....	12
Şekil 3.1. Alata 21A ve PI 281420 ebeveynleri ve bunların melezlenmesi ile oluşan F ₁ bireyleri.....	17
Şekil 3.2. Alata Bahçe Kültürleri İstasyonu'nda yürütülen saksı denemeleri.....	18
Şekil 3.3. Çinko noksanlığı skorlamasında kullanılan skala görünümü (Pınar 2013).....	19
Şekil 3.4. Tüplerin alt kısmında oluşan pelletler.....	21
Şekil 3.5. F ₂ popülasyonunun ilk 9 genotipine ait DNA (5 µl) görüntüsü.....	21
Şekil 4.1. Alata 21A ve PI 281420 ebeveynleri ile yapılan SSR primeri taramasının 32 adet primer çiftine ait görüntüsü.....	32
Şekil 4.2. Alata 21A, PI 281420 ve diğer bireylerin Hpms141 (A), Hpms245 (B), GP20036 (C) ve CA516439 (D) primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüleri.....	33
Şekil 4.3. SRAP primer kombinasyonları (A: Em5-(Me1-Me12), B: Em6-(Me1-Me12), C: E8-(Me1-Me12), D: Em9-(Me1-Me12)) ile elde edilen polimorfik PCR ürünlerine ait örnek görüntüler.....	35
Şekil 4.4. Alata 21A (1) ve PI 281420 (2) ebeveynleri ile yapılan IPBS primerleri tarama görüntüleri.....	36
Şekil 4.5. IPBS primerleri (2381 (A), 2380 (B), 2387 (C), 2244 (D)) ile yapılan örnek tarama görüntüleri.....	38
Şekil 4.6. SRAP, RAPD, IPBS ve SSR markırları ile oluşturulan bağlantı grupları.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dünya biber üretiminde önemli ülkeler ve üretimdeki payları (FAO 2006).....	4
Çizelge 2.2. Soya fasulyesinin taze ağırlığı, RNaz aktivitesi ve protein azotuna çinko uygulamasının etkisi (Johnson ve Simons 1979).....	8
Çizelge 3.1. Ebeveynlerle yapılan primer taraması sonucu polimorfik bulunan SSR markırları ve sekans bilgileri.....	22
Çizelge 3.2. SSR analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri.....	24
Çizelge 3.3. SSR analizlerinde kullanılan PCR döngüsü.....	24
Çizelge 3.4. SRAP primerine ait forward ve reverse primerlerinin sekans bilgileri.....	24
Çizelge 3.5. Polimorfizm gösteren SRAP primer kombinasyonları.....	25
Çizelge 3.6. SRAP analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri.....	25
Çizelge 3.7. SRAP analizlerinde kullanılan PCR döngüsü.....	26
Çizelge 3.8. Polimorfizm elde edilen RAPD primerleri ve sekans bilgileri.....	26
Çizelge 3.9. RAPD analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri.....	26
Çizelge 3.10. RAPD analizlerinde kullanılan PCR döngüsü.....	27
Çizelge 3.11. En fazla polimorfik bant veren IPBS primerleri.....	27
Çizelge 3.12. IPBS analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri.....	28
Çizelge 3.13. IPBS analizlerinde kullanılan PCR döngüsü.....	28
Çizelge 4.1. -Zn ve +Zn koşullarında yetiştirilen Alata 21A, PI 281420 ve <i>C. frutescens</i> / <i>C. annuum</i> sitoplazması taşıyan F ₁ genotiplerine ait çinko etkinliği değerleri.....	31
Çizelge 4.2. Alata 21A ve PI 281420 ebeveynlerinde SRAP primer kombinasyonları ile elde edilen polimorfik bant sayıları.....	34
Çizelge 4.3. %2'lik agaroz jelde 12 RAPD primerinden elde edilen polimorfik bant sayıları.....	36
Çizelge 4.4. IPBS primerlerinden elde edilen polimorfik bant sayıları.....	37
Çizelge 4.5. Genetik haritada kullanılan markırlar ve ait olduğu kromozomlar.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.6. Biberde çinko etkinliğine ilişkin önemli QTL'lere ait diğer özellikler.....	44
Çizelge 4.7. Biberde çinko etkinliği ile ilgili belirlenen diğer QTL'ler.....	45

1. GİRİŞ

Tüm canlıların sağlıklı gelişebilmeleri onların dengeli bir şekilde beslenebilmelerine bağlıdır. Bitkilerin beslenmesinde mutlak gerekli olan elementler; makro ve mikro besin elementi olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Beslenmede daha yüksek oranda ihtiyaç duyulan azot, fosfor, potasyum, magnezyum, kalsiyum gibi elementler makro element sınıfında yer alırken, miktar bazında daha az ihtiyaç duyulan demir, mangan molibden, bor, bakır ve çinko gibi elementler ise mikro element sınıfında yer almaktadırlar. Bu bitki besin elementlerinin kullanıldığı çeşitli gübreleme programları bitkinin türü, gelişim dönemi, iklim, yetiştirme tekniği vb. gibi faktörlere bağlı olarak dengeli bir biçimde bitkiye uygulanmaktadır.

Türkiye’de artan üretim alanı ile stratejik bir ürün haline gelen biber yetiştiriciliğinde, makro ve mikro bitki besin elementlerinin yeri oldukça önemlidir. İnsan, hayvan ve bitkide sağlıklı bir gelişim için elzem olan en önemli mikro besin elementlerinden birisi de çinkodur (Zn). Çünkü Zn elementi, enzimlerde katalitik, kokatalitik ve yapısal olarak üç şekilde rol almaktadır (Vallee ve Auld 1990, Vallee ve Falchuk 1993). Çinkonun metabolik fonksiyonları özellikle azot, oksijen ve kükürt ile tetrahedral kompleksler oluşturmaya yatkın olması üzerine kuruludur ve böylece enzim reaksiyonlarında fonksiyonel (katalitik) ve strüktürel rol oynar (Vallee ve Auld 1990). Rol aldığı bu enzimlerden en önemlilerine karbonik anhidraz, Cu-Zn süperoksit dismutaz, alkol dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, fosfolipaz, karboksipeptidaz, alkalen fosfataz ve RNA polimeraz örnek gösterilebilir. Çinko ayrıca Zn-finger, Zn-cluster ve Ring-finger gibi transkripsiyonu düzenleyen proteinlerde önemli yapısal rol oynar ve enzim sınıflarının altısında da bulunan tek metaldir (Barak ve Helmke 1993). Bitkilerde çinko içeren veya çinkonun aktive ettiği enzimler karbonhidrat metabolizmasında, protein sentezinde, hücre membranının korunmasında, oksin sentezinin düzenlenmesinde ve polen oluşumunda görev almaktadırlar (Marschner 1995).

FAO tarafından 15 ülkede 190 tarla denemesi ile yürütülen bir mikro element projesinde, çinkonun verime en yüksek etkiyi yapan mikro element olduğu tespit edilmiştir (Sillanpää 1990). Bitkilerin çinkoya nispeten daha az ihtiyaç duymalarına karşın çinkonun bitki sağlığı ve gelişimindeki payı çok büyüktür. Yetersiz çinko beslenmesi durumunda bitkinin gelişim ve diğer yaşamsal fonksiyonlarının azalması neticesinde verim ve kalite kayıpları baş gösterecektir. Bu durum ülkemiz ve dünya tarım ekonomisinde çeşitli sorunların oluşmasına neden olacaktır.

Çinko eksikliğinin neden olduğu fizyolojik bozuklukların en başında “bodurlaşma” gelmektedir. Bitkilerde büyüme hormonu olarak görev yapan indol asetik asit (IAA) metabolizmasının bozulması sonucu yaprak ve bitki boyunda azalmalar gözlenmektedir. Buna ek olarak yapraklarda kloroz ve/veya rozetleşme de görülmektedir. Bütün bu çinkonun noksanlık belirtileri ilk önce bitkilerin genç yapraklarında meydana gelmektedir. Ayrıca çinko, protein sentezi ve karbonhidrat metabolizmasında da önemli rol oynamaktadır. Çinko noksanlığında çinkoya bağımlı enzimlerin etkinliğinin azalması sonucunda bitkide önemli derecede metabolik sorunlar oluşmaktadır. Şiddetli çinko noksanlığı koşullarında kloroplast yapısının bozulması ve fotosentetik elektron transferinin engellenmesi nedeniyle de bitkide fotosentez ağı sekteye uğramaktadır (Sharma vd 1982).

Türkiye toprakları alınabilir çinko yönünden “en yaygın çinko noksanlığı” gösteren ülkelerden birisi olarak tanımlanmıştır (Alloway 2009). Topraklarımızın çinko yönünden yetersiz olmasının nedenleri olarak; yüksek kil ve yüksek kalsiyum karbonat içeriği, pH’nın 7’den fazla olduğu toprak koşullarda çinkonun zor çözünebilir olması, alınabilir düşük çinko içeriği, antagonistik etkiye sebep olan yüksek fosfor, magnezyum, kalsiyum içerikleri sayılabilir. Bu nedenle çinko noksanlığının fazla olarak görüldüğü ülkemiz topraklarında, noksanlığa toleransı yüksek çeşitlerin ıslahı önem kazanmaktadır.

Gelişen teknoloji ve biyoteknoloji alanındaki bilgi birikimlerinin artması ile günümüzde ıslah çalışmaları hız kazanmıştır. Yıllardan beri süregelen klasik ıslaha ek ve alternatif olarak markır yardımcı seleksiyon (MAS) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Çinko etkinliğinin fizyolojik ve genetik olarak kompleks bir yapı göstermesi ve çinko etkinliği yüksek çeşitlerin geliştirilmesinde fenotipik seleksiyondan elde edilecek genetik ilerlemenin yavaş (kalıtım derecesinin düşük) olması nedeni ile markır yardımcı seleksiyon (MAS) çok güçlü bir alternatif yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Pınar 2013). Ayrıca bu yöntem, araştırmaya konu olan genlerin genomda yerinin tespiti için çok önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Biberde ise şimdiye kadar türler arasında (Livingstone vd 1999, Rao vd 2003) ve tür içerisinde (Barchi vd 2007, Ben-Chaim vd 2001, Lefebvre vd 1995) farklı genetik kaynaklarla ve amaçla birçok genetik harita oluşturulmuştur. Bu amaç doğrultusunda dominant karakterde olan çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), sekans ilişkili çoğaltılan polimorfizmi (SRAP), değişken DNA dizilerinin tesadüfen çoğaltılması (RAPD) ve kodominant karaktere sahip olan basit sekans tekrarı (SSR), bölünerek çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS), sınırlayıcı enzim parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) markırları kullanılmaktadır. Bu markırlar, araştırma için kullanılan popülasyona ait türler haricinde akraba olan türlerin genotipleri ile yapılan çalışmalar için de kullanılabilirler. Biberde ise *Capsicum annuum* x *Capsicum frutescens* türleri arası melez popülasyonları (Portis vd 2006, Ben-Chaim vd 2006) ve *Capsicum annuum* x *Capsicum chinense* melez popülasyonları (Yi vd 2006, Lee vd 2009) basit sekans tekrarı markırı (SSR) kullanılarak haritalanmıştır.

Wu vd (2009) tarafından Sol Genomics Network’te yayınlanan 94 adet *C. frutescens* var. *BG 2814-6* x *C. annuum* cv. *NuMex RNaky*. melezlemesi ile elde edilen F₂ popülasyonunun kullanıldığı ve 12 adet biber kromozomuna denk gelen 12 bağlantı grubunun oluşturulduğu ilk tam biber haritasında toplam 381 adet olmak üzere SSR, COSII, CAPS, dCAPS ve SCAR markırları kullanılmıştır. Aynı entegre haritada kullanılabilir 280 adet COSII markırının olası kromozom bölgesi belirtilmiştir. Buna ek olarak 47 tane SSR markırı da *C. annuum* x *C. frutescens* melez popülasyonunda haritalanmıştır (Portis vd 2006).

Biberde daha önce çinko etkinliği ile ilgili yapılan çalışmalarla çinkonun kalıtım mekanizması tespit edilmiştir (Pınar 2013). “Biberde (*Capsicum annuum* L.) çinko etkinliğinin belirlenmesi ve haritalanması” konulu çalışmanın sonucu ile bütün bu bilgiler birlikte kullanıldığında, ilgilenilen genin/özelliğin (QTL) yerinin genomdaki lokasyonunun belirlenmesi ile biber ıslahında bu özellik bakımından büyük bir gelişme kaydedilmiş olacaktır. Özelliğe ait olan genin, çinko noksanlığına hassas olan diğer

biber türlerine aktarılması ile yine aynı özellik bakımından verimli çeşitlerin geliştirilebilmesi mümkün olacaktır.

Tezin ilerleyen bölümlerinde, konu ile ilgili terimler hakkında genel bilgiler verilecek, daha önce yapılan çalışmalara değinilecek, çalışmada kullanılan materyaller ve yöntemler detaylı olarak incelenecek ve yapılan analizler doğrultusunda elde edilen veriler birbirleri ile karşılaştırılıp saptanan sonuçlar sunulacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Dünyada 31.171.567 ton, Türkiye’de 2.159.348 ton üretim miktarına sahip olan biber, Türkiye’nin dünyada lider olduğu ilk beş üründen biri olan stratejik bir bitkidir (TÜİK 2013). Biberin anavatanı Güney ve Ota Amerika Kıtası olup; özellikle Bolivya, Peru, Paraguay, Kuzey Arjantin, Güney Brezilya ve Meksika birçok biber türünün gen merkezidir, Antartika hariç tüm dünyada yetiştirilebilmektedir (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) 2009). Çin, Türkiye, Meksika, İspanya, ABD, Endonezya biber üretimindeki önemli ülkelerdir (Çizelge 2.1.). Haploid kromozom sayısı 12 (n=12) olan biber Magnoliopsida (İki çenekliler) sınıfına üyedir. *Solanaceae* familyasının içerisinde yer alan biberin en fazla kullanılan türü ise *Capsicum annuum* L. olarak adlandırılmaktadır. *Capsicum* L. cinsine ait bilinen biber türleri; *C. annuum*, *C. chinense*, *C. pendulum*, *C. pubescens*, *C. minimum*, *C. baccatum*, *C. abbreviatum*, *C. anomalum*, *C. breviflorum*, *C. buforum*, *C. brasilianum*, *C. campylopodium*, *C. cardenasii*, *C. chacoense*, *C. ciliatum*, *C. chlorocladium*, *C. coccineum*, *C. cordiforme*, *C. cornutum*, *C. dimorphum*, *C. dusenii*, *C. exile*, *C. eximium*, *C. fasciculatum*, *C. fastigiatum*, *C. flexuosum*, *C. galapagoensis*, *C. geminifolium*, *C. hookerianum*, *C. lanceolatum*, *C. leptopodium*, *C. luteum*, *C. microcarpum*, *C. minutiflorum*, *C. mirabile*, *C. parvifolium*, *C. praetermissum*, *C. schottianum*, *C. scolnikianum*, *C. stramonifolium*, *C. tetragonum*, *C. tovarii*, *C. villosum*, *C. violaceum*’dur.

Çizelge 2.1. Dünya biber üretiminde önemli ülkeler ve üretimdeki payları (FAO 2006)

Ülkeler	Üretim Miktarı (Ton)	%
Çin	13.031.000	50.4
Türkiye	1.842.175	7.1
Meksika	1.681.116	6.5
İspanya	1.074.100	4.1
ABD	893.610	3.6
Endonezya	871.080	3.4
Diğer Ülkeler	6.473.783	25.03
TOPLAM	25.866.864	100

Biberin biyolojik özelliklerine bakacak olursak; biber bitkisinin çiçekleri erselik (hermafrodit) yapıdadır. Stamenli ve karpelli çiçekler ayrı bireyler üzerinde bulunmaktadır. Kendine döllemenin yanı sıra % 3-30 oranında yabancı döllemeye de rastlanır. Bunun nedeni; erkek ve dişi organın farklı zamanlarda dölleme olgunluğuna erişmesidir (Günay 1981). Biber çiçeklerinde erkek ve dişi organların boy ve konumları ile dölleme yapabilecek devreye geçiş zamanları arasında çeşitli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan birçok araştırmacı biberlerde çeşit karakteri ve ekolojik koşullara göre % 9-32 oranında yabancı dölleme olduğunu kabul etmektedirler. (Bayraktar 1970).

100 g taze yeşil tatlı biberde, 1.2 g protein, 0.29 g yağ, 92.6 g su, 4.2 g karbonhidrat ve 1.4 g selüloz bulunmaktadır. Ayrıca yeşil tatlı biberler A, B1, B2, P, K ve C vitaminlerince de zengindir. Biberde vitaminlerin yanı sıra alkaloidler de

bulunmaktadır. Biber özellikle C vitamini miktarı bakımından çok değerlidir. Biberin 100 gramında ortalama 125 mg vitamin C vardır. İçerdiği mineral ve vitaminlerin yanında, acı biberlerde acı ve yakıcı tadı veren “capsaicin” alkaloidi önemli bir antioksidandır.

Ökaryotik hücre yapısına sahip olan canlılardaki diploid somatik hücre çekirdeğindeki miktarın yarısında ya da haploid çekirdekte bulunan DNA miktarının pikogram olarak ifadesine “C Değeri” denmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda kromozomun 2 kopyasında da bulunan DNA miktarları (2C) *C. annuum* türü için 7.65 pg/çekirdek, *C. pubescens* için 9.72 pg/çekirdek ve genel olarak *Capsicum* türleri için ise ortalama 8.42 pg/çekirdek olarak hesaplanmıştır (Belletti vd 1998). Değerler karşılaştırıldığında biber genomunun domates (*Solanum lycopersicum* L.) genomundan 3-4 kez daha büyük olduğu ortaya çıkmaktadır (Arumuganathan ve Earle 1991).

Dünyada ve Türkiye’de artan üretim alanı ve ekonomik olarak önemli bir ürün haline gelen biberin yetiştiriciliğinde etkisi olan faktörlerden birisi bitki beslemesidir. Türkiye’de yetiştirilen ürünlerde özellikle tahıllarda çinkonun önemli bir beslenme sorunu olduğu bildirilmiştir (Çakmak 2004). Topraklardaki çinko eksikliği probleminin giderilmesi için uygulanabilecek iki önemli yöntemden birincisi; toprakların bitki ihtiyacını karşılayabilecek miktarda çinko ile gübrenmesi, ikincisi ise çinkonun noksan olduğu ortam şartlarında bile verim kaybına uğramayan yüksek çinko etkinliğine sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesidir. Bugüne kadar gerek işçilik gerekse uzun ıslah süreçlerinin zamansal zorlukları nedeni ile özellikle çinko gibi önemli bitki besin elementlerinde etkinliğin belirlenmesi, kalıtımının hesaplanması ve haritalama çalışmaları yavaş bir seyirde ilerlemiş olsa da, artan biyoteknolojik gelişmeler sayesinde bu ve benzeri çalışmaların yürütülmesi günümüzde hız kazanmıştır.

2.1. Çinkonun Bitkiler İçin Önemi

Çinko periyodik cetvelin geçiş elementleri grubunda kabul edilen ve yer kabuğunda en çok bulunan elementler arasında 23. sırada yer alan +2 değerlikli bir elementtir. Toprak ve organizmaların yapısında bulunan birçok elemente nazaran daha az miktarda bulunmasına rağmen, özellikle canlı organizmaların yaşamsal fonksiyonları açısından önemli görevleri üstlenmektedir. Noksanlığının söz konusu olduğu durumlarda yapısal ve metabolik işlevlerde çeşitli problemlerin meydana gelmesi, çinko elementinin önemini daha iyi vurgulamaktadır. İnsanlardaki çinko noksanlığı riskinin dünya nüfusunun yaklaşık olarak üçte birine tekabül ettiği belirlenmiştir (World Health Organization 2004).

Çinkonun bitkinin sağlıklı gelişmesi için mutlak gerekli bir bitki besin elementi olduğu Sommer ve Lipman (1926) tarafından çalışmalarla belirlenmiştir. Noksanlığı ise ilk defa çinkoya karşı duyarlı ve bu konudaki çalışmalar için iyi bir test bitkisi olan mısır bitkisinde gözlemlenmiştir (Barnette ve Warner 1935).

Bitkilerdeki bitki besin maddesi miktarını toprak, iklim, toprak işleme teknikleri gibi faktörler etkileyebileceği gibi bitkinin yaşı, türü ve genetik özellikleri gibi bitkisel faktörler de etkilemektedir. Bitkinin ihtiyaç duyduğu elementin noksanlığı arttıkça, bitkideki gerekliliği de o derecede artmaktadır.

Çinkonun sahip olduğu önem, onun birden fazla metabolik faaliyet ve strüktürel yapıda rol almasından ileri gelmektedir. Bilindiği üzere canlıların yapı taşı olarak adlandırılan hücrelerin işlevselliğinde proteinler önemli rol oynamaktadırlar. Ve çinko bitkide protein sentezine doğrudan katılan ve 300'den fazla enzimin etkinliğinde doğrudan veya dolaylı olarak rol alan bir elementtir (Coleman 1992, Marschner 1995, Çakmak 2000). Çinko birçok enzimde merkez atom olarak görev almaktadır.

Karbonik anhidraz enzimi, bitkilerin fotosentez yeteneği ile birleştirildiğinde yine çinkonun önemi ön plana çıkmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi, CO₂'nin dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen ve Zn⁺² içeren bir enzimdir (Odabaşoğlu ve Küfrevioğlu 2001). Karbonik anhidraz (CA), bitkisel dokularda en çok yapraklarda bulunur ve fotosentezde elektron transport zincirinde elektron vericisi olan HCO⁻³ iyonlarını temin eder (Vaklinova vd 1984, Majeau vd 1994). Bu nedenle çinko noksanlığında karbonik anhidraz enziminin yapısında meydana gelen bir problem nedeni ile fotosentez oranında azalmalar gözlenecektir. Bu durum C₃ bitkilerine göre C₄ bitkilerinin fotosentez oranlarını daha çok etkileyecektir (Burnell vd 1990). Fotosentez yetisinin azaldığı bitkilerin yapraklarında klorozlar meydana gelmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Biber yaprağında çinko noksanlığına bağlı olarak oluşan kloroz

CuZn-süperoksit dismutaz (CuZnSOD) ise süperoksidin, hidrojen perokside (H₂O₂) dismutasyonunu katalizlemektedir. Bu enzimde çinko ve bakır bir arada bulunmaktadır. Çinko noksanlığında yine bu enzimin aktivitesi azalırken açığa çıkan oksijen (O⁻²) miktarı da ters oranda artmaktadır. Toksik O⁻² radikallerinin artmasıyla birlikte membran lipidlerinin peroksidasyonu ve membran geçirgenliği de artmaktadır (Çakmak ve Marschner 1988). Bu durum ise hücrelerde çeşitli hasarlara yol açmaktadır.

Çinko noksanlığı plazma membran geçirgenliğini arttırarak özellikle köklerden küçük moleküllü bileşiklerin yıkanmasına ve buradaki fosfolipid miktarının azalmasına neden olmaktadır (Welch vd 1982). Buna ek olarak çinko hücre membranının yapısı ve bütünlüğü için gerekli bir unsurdur. Hücre dışı ortamdaki çinko konsantrasyonu yükseldiği zaman membran yapısındaki çinko konsantrasyonu da artarak koruyucu bir etki göstermektedir (Vallee ve Galdes 1984). Çinko, membranın fosfolipid ve sülfidril gruplarına bağlanarak veya polipeptid zincirlerinde kalan sistein proteini ile tetrahedral kompleksler oluşturarak membran lipidlerini ve proteinlerini oksidatif zararlanmaya karşı korur (Güneş vd 2000).

Çinko noksanlığında genotip sel farklılıklara bağlı olarak, demir noksanlığında olduğu gibi köklerden fitosideresfer salınması meydana gelebilmektedir (Zhang vd 1989, Çakmak vd 1994). Bu durumun ise rizosfer ve köklerin hücre duvarlarından çinkonun mobilitesine katkı sağladığı belirlenmiştir (Treeby vd 1989, Zhang vd 1991). *Triticum aestivum* ve *Triticum durum* buğday türleri ile yapılan bir araştırmada, fitosideresfer salımının genotip sel olarak varyasyon göstermesinin temel nedeninin deoxymugineic asitteki farklılıklardan kaynaklandığı belirlenmiştir (Çakmak vd 1994, 1996).

Bitkilerde büyüme ve gelişmede rol alan en önemli hormonlardan birisi de doğal bir oksin hormonu olan indol asetik asittir. Indol asetik asidin biyolojik sentezi için triptofan aminoasidi görev almaktadır. Bitkilerde çinko noksanlığının en açık belirtisi olan bodur büyüme ve küçük yaprak oluşumu oksin metabolizmasındaki bozulmadan ve özellikle indol asetik asit (IAA) oluşumundaki azalmadan ileri gelmektedir (Kaçar 1998). Yaprakların küçülüp kümeleşmesi şeklinde ortaya çıkan yapı çinko noksanlığı belirtisinin en tipik örneklerindedir.

Fruktoz 1,6-bifosfat az enzimi altı karbonlu şekerlerin kloroplastlarda ve sitoplazmada dağılımı düzenlerken, aldolaz ise üç karbonlu fotosentez ürünlerinin kloroplastlardan sitoplazmaya taşımını düzenler ve aldolaz enzim aktivitesi bitkilerin çinko ile beslenme durumunu önemli oranda yansıtır (O'Sullivan 1970). Bu durum ise çinko elementinin karbonhidrat metabolizmasındaki rolünü açıkça ortaya koymaktadır.

Çinko eksikliğinin olduğu bitkilerde düşük protein içeriği ve yüksek aminoasit içeriği RNA yapısının bozulmasının bir sonucudur. RNaz aktivitesinin daha yüksek oranda olmasının bitkide çinko eksikliğinin tipik özelliği olduğu belirtilmektedir. (Sharma vd 1982). Johnson ve Simons (1979) tarafından yapılan bir araştırmada soya fasulyesindeki RNaz aktivitesi ile çinko arasındaki bağ ilişkilendirilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Soya fasulyesinin taze ağırlığı, RNaz aktivitesi ve protein azotuna çinko uygulamasının etkisi (Johnson ve Simons 1979)

Çinko Uygulaması (mg/L)	Taze Ağırlık (g)	RNaz Aktivitesi (%)	Protein Azotu (%)
0.005	4.0	74	1.82
0.01	5.1	58	2.25
0.05	6.6	48	2.78
0.10	10.0	40	3.65

Çinkonun DNA ve RNA metabolizması, hücre bölünmesi ve protein sentezindeki rolleri uzun zamandır bilinmesine rağmen son zamanlarda DNA kopyalanması, tanımlanması ve gen baskınlığının düzenlenmesi gibi işlevleri yürüten protein moleküllü (çinko-metal proteinleri) de bulunmuştur (Coleman 1992, Vallee ve Falchuk 1993). Örneğin; Zinc-finger proteini, transkripsiyonda görevli olan TF-III A (transkripsiyon faktör III A)'da çinkonun yer aldığı bölgedir. DNA çift sarmalının büyük oluğuna yerleşir, DNA bazları ile temasa geçer ve DNA'da özgün bağlanma bölgesine bağlanarak gen regülasyonunda görev alır. DNA sentezinde rolü olan birçok enzimin sentezi için çinko gerekmektedir. DNA sentezi için hücre döngüsünün G1 fazında çinkoya gereksinim vardır ve DNA sentezi için majör enzim olan DNA polimerazın aktivitesi için çinko gereklidir (Belgemen ve Akar 2004). RNA polimeraz, çinko varlığında RNA içindeki dört ribonükleozidin de polimerizasyon reaksiyonunu katalize eder. Çinko eksikliği hücrelerin total RNA içeriğini değiştirmez fakat mRNA sentezinin kompozisyonunu değiştirir (Arcasoy 2002).

2.2. Toprak ve Çinko İlişkisi

Çinko, yerkabuğunu oluşturan elementler arasında yer almaktadır. Ortalama çinko konsantrasyonları sırasıyla mineral toprakta $50 \mu\text{g total Zn g}^{-1}$, organik toprakta $66 \mu\text{g total Zn g}^{-1}$ ve birçok tarım topraklarında ise $10\text{-}300 \mu\text{g total Zn g}^{-1}$ bulunmaktadır (Alloway 1995, Barber 1995).

Kayaçlar çinkoyu değişik formlarda bünyelerinde barındırırlar. Bu formlara çinko sülfür, çinko sülfat, çinko oksit, çinko fosfat, çinko karbonat ve çinko silikat örnek olarak verilebilir. Bu bileşikler içeren kayaçların ayrışması ile oluşmuş topraklar, yüksek konsantrasyonlarda çinko ve diğer elementleri içeren topraklardır (Barak ve Helmke 1993). Yapılan bir çalışmada ise killi toprakların çinko adsorbsiyon kapasitelerinin kumlu topraklara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Shuman 1975).

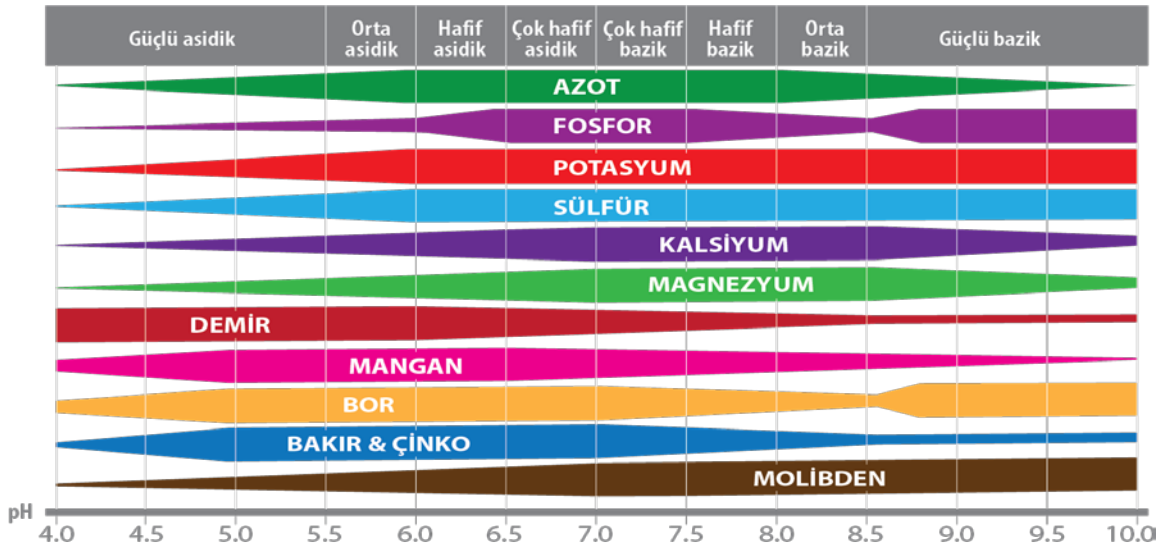
Topraklarda noksanlığı en yaygın görülen bitki besin maddelerinin arasında çinko da yer almaktadır. Toprak çözeltisinin çinko konsantrasyonu oldukça düşüktür ve $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ve $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ arasında değişir (Hodgson vd 1966). White ve Zasoski (1999)'ye göre, çinko noksanlığının en yaygın olduğu ülkeler Akdeniz Bölgesi, Güney Doğu ve Doğu Asya ülkeleri ve Avustralya'dır. Türkiye topraklarının %49.83'ünün (14 milyon hektar) yarayırlı çinko kapsamı kritik değer olarak kabul edilen 0.5 mg/kg 'nin altındadır (Eyüpoğlu vd 1994). Toprakta bulunan organik madde miktarı, toprağın pH değeri,

kireç içeriği, yarayışlı fosfor, demir ve mangan kapsamı, topraktaki kil miktarı ve tipi gibi faktörler topraklarda bulunan yarayışlı çinko miktarını etkileyen faktörlerdendir. %2'den düşük organik madde ve yüksek oranda kalsiyum karbonat (CaCO₃) içeren topraklar çinko noksanlığının en çok görüldüğü topraklardır. 1511 adet toprak örneği ile yapılan bir çalışmada, Türkiye'de en düşük ortalama çinko değerine sahip ilk 5 il sırası ile Van (0.26 mg/kg), Tunceli (0.32 mg/kg), Denizli (0.33 mg/kg), Burdur (0.34 mg/kg), Kastamonu (0.37 mg/kg) olarak tespit edilirken en fazla ortalama çinko içeriğine sahip iller ise Muş (2.52 mg/kg), Mersin (1.86 mg/kg), Artvin (1.78 mg/kg), Rize (1.62 mg/kg) ve Trabzon (1.44 mg/kg) olarak belirlenmiştir (Eyüpoğlu vd 1998).

Hatay, Adana ve Mersin illerindeki turunç bahçelerinde yapılan bitki besin maddelerinin düzeyini belirleme çalışmasında, yapılan yaprak analizlerine göre başta çinko olmak üzere mikro elementlerin genellikle yetersiz düzeyde olduğu belirlenmiştir (Torun vd 2005). İç Anadolu bölgesinde yapılan diğer bir çalışmada ise yüksek pH değerine sahip kireçli toprakların ve yetersiz organik madde düzeyinin (< %2) bu alandaki toprakların çinko açısından yetersiz oluşunu açıklamıştır (Çakmak vd 1996).

2.3. Çinkonun Topraktan Alınımı ve Bitkiye Taşınımı

Çinko toprakta yalnızca Zn⁺² formunda bulunmaktadır ve bitki tarafından da aynı formda alınmaktadır. Topraktaki ortalama 5.0 ve 7.0 pH aralığı, çinkonun optimum düzeyde alınabilmesi için en elverişli değer olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Bitki besin elementlerinin bitkiler tarafından optimum şekilde alındığı pH değerleri

Bitkilerin genellikle çinko istekleri düşüktür. Kuru maddede sahip oldukları çinko içerikleri en fazla 100 mg/kg düzeyindedir. Akan su kültürü ile yapılan bir çalışmada 0.01×10^{-6} ile 2.5×10^{-6} M çinko içeriğine sahip olan sıvı besin çözeltisi 8 farklı bitki türünden maksimum ya da maksimuma yakın verimin alınabileceğini belirlemiştir (Carroll ve Loneragan 1969).

Topraktan kök yüzeyine çinko taşımını sağlayan en önemli mekanizma, topraktan köke taşınan solüsyonun yüksek miktarda çinko içermesidir (Barber ve Silberbush 1984). Çinko, kireçli topraklarda karbonatlar tarafından adsorbe edilmekte ya da $ZnCO_3$ ve $Zn(OH)_2$ gibi çözünürlüğü çok düşük olan bileşikler oluşturmaktadır (Trehan ve Sekhon 1977, Erdal vd 2003). Bu durumda olan toprak koşullarında köklerce çinkonun topraktan alınımı zorlaşmaktadır ya da hiç alınım olmamaktadır. Fakat yapılan çalışmalar doğrultusunda çinkonun yüksek pH değerlerinde tek değerlikli kation ($ZnOH^+$) olarak alınabildiği tespit edilmiştir (Marschner 1995). Yine de toprakta fazla miktarda bulunan bikarbonat, bitkiler tarafından çinkonun alınmasını ve toprak üstü organlarına taşınmasını olumsuz etkilemektedir (Mengel ve Kirkby 1982).

Arbuskular mikoriza köklerin bulunduğu toprağın hacmini genişleterek çinkonun topraktan alınımı arttırabilmektedir (Kothari vd 1991, Ortas 2012). Bitki köklerinden salgılanan fitosiderosferin topraktaki rizosfer pH'sını değiştirmesiyle de çinkonun şelatlanıp bitkilerce alınabilir hale getirilmesinde rol oynamaktadır (Fageria ve Stone 2006).

Çinkonun yarayırlılığı iklim koşullarıyla da bağlantılıdır. Çinkonun bitki köklerinde alınımında toprak nemi önemli bir rol oynamaktadır. İlkbaharın soğuk, yağışlı ve az güneşli geçtiği lokasyonlardaki çinko eksikliği, mikrobiyal faaliyetlerin azalması neticesinde daha sık olarak görülür (Lucas ve Knezek 1972, Güneş vd 2000).

Çoğu bitki besin elementi toprakta birbiriyle rekabet halindedir. Ayrıca bazı elementlerin, aynı ortamdaki bir diğer elementin yarayırlılığını arttırabildiği gibi aynı şekilde azaltabilmektedir. Fosfor, çinkoya antogonistik etki yapan elementlerden birisidir. Fosfor bitki gelişimini arttırdığı için seyreltme etkisi yaparak da çinkonun miktar olarak azalmasına neden olabilmektedir (Stukenholtz vd 1966). Fosforun çinko alınımı azaltıcı etkisi küçük kök sistemine sahip bitkilerde ve özellikle ortamdaki çinko miktarı orta ya da az olduğunda daha belirgin hal almaktadır (Marschner ve Schropp 1977).

2.4. Bitkilerin Çinko Etkinliğiyle İlişkisi ve Kalıtımının Belirlenmesi

Teze konu olan biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi, tınlı-kumlu, tınlı-killi ve organik maddece zengin topraklarda en iyi gelişimi göstermektedir. Biberin fasulye, turunçgil, mısır, pirinç gibi göreceli olarak çinko noksanlığına karşı duyarlılığının yüksek olduğu belirlenmiştir (Eken, 2007). pH'nın 6.0 ve 6.5 arasında olduğu koşullar biber için optimumdur. Yapılan çalışma ile topraktaki çinko eksikliğinin özellikle yüksek tuz uygulaması altında (yüksek pH değerinde) biberin yeşil aksam büyümesini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Artan sodyum klorür (NaCl) uygulaması yeşil aksam kuru madde üretimini azaltmıştır, fakat bu azalma 2 mg çinko/kg toprak uygulamasında 10 mg çinko/kg toprak uygulamasına göre daha fazla olmuştur (Aktaş vd 2006).

Topraktaki yarayırlı çinkonun alınımı bitki köklerinin yapısıyla da ilişkili bir durumdur. Saçak kök yapısına sahip olan biber gibi bitkiler, daha fazla kök yüzey alanına sahip olduğu için çinko ve diğer besin elementlerin kullanılabilirliğini arttırabilmektedir.

Çinko randımanlı genotipler, çinko takviyesi yapılmayan koşullarda çinko randımanlı genotiplere göre köklerden sürgünlere daha fazla çinko taşımaktadırlar (Çakmak vd 1996, Rengel ve Graham 1995). Ancak yapılan çalışmalar doğrultusunda düşük çinko içeren toprak koşullarında yetişen buğdaydaki analiz sonuçları, çinko açısından etkin olan ve olmayan çeşitlerin sitoplazma ve kofullarda benzer oranlarda çinko içerdiklerini, hücre içi çinko durumunun çinko etkinliği ile ilişkili olmadığını ortaya çıkarmıştır (Hacısalihoglu vd 2003).

Çinko elementinin noksan olduğu kireçli topraklardaki arazi denemelerinde, çinko etkinliği ile sürgündeki toplam çinko miktarı arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Çakmak vd 1997, Graham vd 1992). Tahıllarda ise yüksek çinko etkinliğinin ifade edilebilmesinin bitkilerin çinkoyu topraktan alabilmesi ve dokularda etkili bir şekilde kullanabilmesi ile ilişkilendirmiştir (Çakmak vd 1998). Yüksek verimli bitkilerin elde edilmesi besinsel problemlerin önüne geçmek ve yetiştiricilikte ekonomik açıdan yarar sağlaması açısından önem teşkil etmektedir. Bu durumda bitki ıslahı, verimli çeşitlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Yüksek pH'dan kaynaklanan mikroelement noksanlıkları gübreleme ile giderilemeyebilir ve bu nedenle genetik çözümler gereklidir (Erenoglu vd 1999). Bitki tür ve çeşitleri arasında çinko etkinliği açısından büyük genotipik varyasyonlar olduğu için bu varyasyonların seleksiyon yolu ile kullanımıyla çinko bakımından yüksek etkinliğe sahip bitkilerin ıslah edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Çakmak vd 1998). *Phaseolus vulgaris* ile yapılan çalışmada kontrollü melezlemeler ile çinko içeriğinin %10'a kadar artırılmasının mümkün olduğu bulunmuştur (Gelin vd 2007). Fakat arazi ortamında yapılan klasik testlemeler lokasyon, toprak türü ve iklim gibi kriterlere bağlı olarak varyasyon gösterdiği için daha güvenilir bir alternatif metot olan moleküler çalışmalara başvurulmaktadır. Çalışmada kullanılan saksı denemeleri analiz fenotipik gözlem ve besin elementi etkinliğinin kalıtımının hesaplanabilmesi imkanı sunmaktadır.

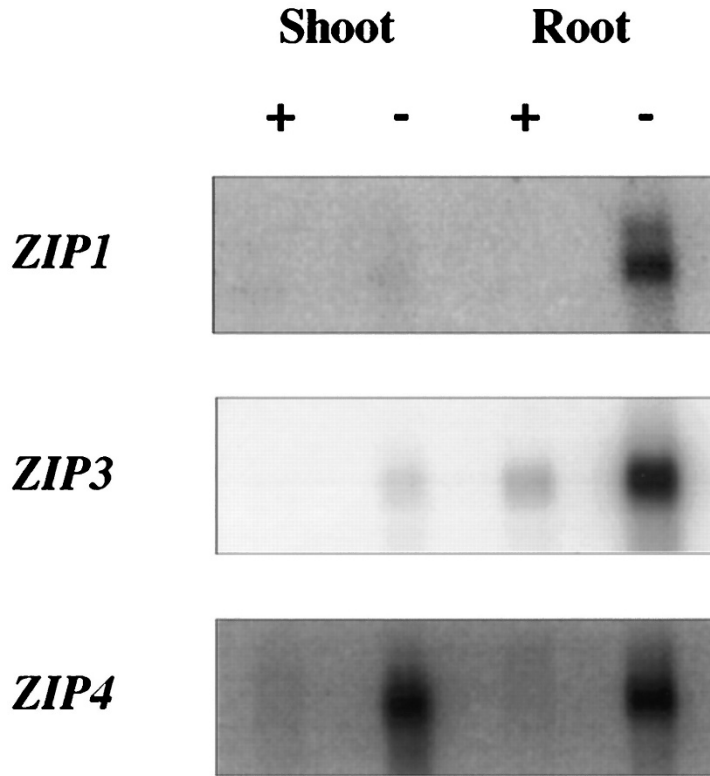
Kalıtım hesabı, meydana gelen fenotipik varyasyonun ne kadarının çevresel etmenlerden ve ne kadarının genotipik etmenlerden kaynaklandığını ifade etmek için kullanılan bir yöntemdir. Kalıtım iki şekilde ifade edilebilir: 1. Bir popülasyondaki genetik varyasyon (V_G) nedeniyle oluşan fenotipin (V_P) oranının ifade edildiği "geniş anlamda kalıtım (H^2)"dır ve $H^2 = V_G/V_P$ şeklinde hesaplanmaktadır (Klug ve Cummings 2005). Geniş anlamda kalıtım derecesinin 1.0'a yakın olması, bir popülasyondan elde edilen fenotipik varyasyona çevre etkisinin çok az olduğunu, 0'a yakın olması ise varyasyonun hemen hemen tamamının çevresel etkiden kaynaklandığını belirtmektedir (Klug ve Cummings 2005). 2. Eklemeli genetik varyasyon (V_A) nedeni ile meydana gelen fenotipik varyasyonun "dar anlamda kalıtım (h^2)" ile ifade edilmesidir ve $h^2 = V_A/V_P$ olarak hesaplanmaktadır (Klug ve Cummings 2005). Yüksek demir ve çinko içeriğine sahip yumruların geliştirilmesinin hedef olduğu tatlı patates ıslahında, demir ve çinko arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Courtney 2007). Bitki besin elementi açısından yüksek derecede kalıtım derecesi ve genetik varyasyona sahip olan türler, yine bitki besin elementi açısından etkin olan türlerin ıslahında kullanılabilir.

Ekmeklik buğday genotipleri ile yapılan bir çalışmada, kuru şartlarda bayrak yaprak klorofil içeriği ve başakta tane sayısı kalıtımının eklemeli gen etkisinde olduğu ve bayrak yaprak yeşil kalma süresi, bayrak yaprak kül içeriği, üst boğum uzunluğu,

bitki boyu, 1000 tane ağırlığı ve tek bitki tane verimi kalıtımının eklemeli olmayan gen etkisinde olduğu belirlenmiştir (Ozturk vd 2006).

2.5. Çinko ile Bağlantılı Genler ve Haritalama Çalışmaları

Çinko taşınımı ile bağlantılı genler ilk defa *Arabidopsis thaliana* bitkisi ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Eng vd 1998). Bu genler ZIP gen ailesine üye olan ZIP1, ZIP2, ZIP3 ve ZIP4 genleridir (Şekil 2.3). ZIP gen ailesi, kadmiyum, demir, mangan, çinko gibi katyonların bitkideki taşınımında görev alan genlerdir (Eng vd 1998). ZIP1 ve ZIP3 genleri bitki köklerinde ekspres olmakla birlikte çinkonun topraktan alımında görevli iken ZIP2 geninin nerede ekspres olduğu belirlenmemiştir. ZIP4 geni, genom sekanslaması yardımı ile çinko noksanlığı yaşayan bitkilerin sürgün ve köklerinde tespit edilmiştir (Grotz vd 1998). Ayrıca mayalarda çinko taşınımı ile ilgili ZRT1 ve ZRT2 genleri bulunmaktadır (Zhao ve Eide 1996). Yine mayalarla yapılan bir çalışmada IRT1 geninin demir taşınımındaki yanı sıra mangan ve çinko taşınımında da görev aldığı belirlenmiştir (Korshunova 1999).



Şekil 2.3. Sürgün ve köklerdeki ZIP1, ZIP2 ve ZIP4 genlerinin northern blot görüntüleri

Pirinçte (*Oryza sativa*) yapılan bir çalışmada fonksiyon bakımından benzerlikleri bulunan fakat farklı pH koşullarında farklı aktivite gösteren iki adet çinko bağlantılı gen keşfedilmiştir (Ramesh vd 2003).

Kompleks özelliklerin bulunduğu genotiplerdeki genetik varyasyonun tanımlanmasında fenotipik ve genotipik dataların arasındaki bağı kullanıldığı istatistiksel bir yöntem olan QTL (Quantitative trait locus), spesifik bir özelliği kontrol eden çoklu

gen bölgelerini haritalama çalışmalarında çeşitli moleküler markır yöntemleri ile birlikte kullanılmaktadır (Miles ve Wayne 2008).

Buğday ile yapılan bir çalışmada çinko konsantrasyonu ile ilgili 4 QTL ve çinko kapsamı ile alakalı 7 QTL bölgesi belirlenmiştir (Shi vd 2008).

Madhukar ve Swarna melezinden geliştirilen bir pirinç popülasyonunda ise yapılan haritalama sonucu 1., 3., 5., 7., ve 12. kromozomda çinko ve demire bağlı 5 adet QTL bölgesi belirlenmiştir (Anuradha vd 2012).

Fasulyede yapılan bir çalışmada ise, tohumdaki çinko içeriğinin tek dominant karakterdeki bir gen tarafından kontrol edildiği ifade edilirken (Cichy vd 2005), soya fasulyesinde ise çinko alımının daha çok eklemeli genlerin tekelinde olduğu tespit edilmiştir (Spehar 1995).

Arabidopsis halleri ve *Arabidopsis lyrata* ile yapılan türlerarası melezleme çalışması ile çinko toleransında rol oynayan 3 adet QTL haritalanmıştır (Willems vd 2007).

Triticum discocum yabani buğday türü ve *Triticum durum* ile yapılan çalışmada çinko, demir ve bakır ile bağlantılı olan QTL bölgeleri ile Tohumlardaki protein konsantrasyonu ile ilgili QTL bölgeleri arasında önemli ilişkiler tespit edilmiştir (Peleg vd 2009).

Moleküler markırlar, PZR temelli moleküler markırlar (RAPD, SSR, AFLP, SRAP gibi), PZR temelli olmayan moleküler markırlar (RFLP) ve DNA çip ve dizilemeye bağlı olanlar (SNP'ler gibi) olmak üzere üç guruba ayrılmaktadırlar (Sadeghzadeh 2008). Son yıllarda sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar çeşitli avantajlara sahiptir; 1) çevre faktörlerinden etkilenmezler, 2) çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir, 3) genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofikdir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi), 4) her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik kökeni tespit edilebilir, 5) sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir (Gülşen ve Mutlu 2005). Teze konu olan ve haritalama için kullanılan moleküler markırlara SSR, RAPD, SRAP ve IPBS (retrotranspozonlar) örnek verilebilir.

2.5.1. Basit tekrarlı dizi (Simple sequence repeats (SSR)) markırları

Yüksek organizmalarda henüz görevleri bilinmeyen, ancak düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen, rasgele tekrarlanan DNA bölgeleri (minisatellitler ve mikrosatellitler) vardır (Rafalski ve Tingey 1993). Bitkilerde (AT)_n, (AAG)_n ve (AAT)_n gibi tekrarlar bitkilerde çok yaygındır (Akkaya vd 1992). Basit dizi tekrarı olarak bilinen mikrosatellitlerin (1-6 bp) iki ucunda da bulunan bazların sekans bilgisine dayanılarak o bölgelere özgü 18-22 bp'lik primerler tasarlanabilmektedir. Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında, yani telomere yakın bölgelerde bulunmasına karşın, mikrosatellitler ökaryotlara ait kromozomlar üzerinde daha bol ve gelişigüzel bir dağılım gösterir (Tautz 1989). Polimorfizm tekrar sayısındaki farklılıklara bağlı olarak

gelişmektedir. Tekrar sayısındaki farklılıkların kaynağı ise DNA replikasyonu sırasındaki kaymalardır (Schlotterer ve Tautz 1993). Jel görüntümesinde farklı büyüklüklerde belirlenen bantlar farklı allelleri göstermektedir. SSR kodominant bir markır olduğundan homozigot ve heterozigot genotiplerin ayrımları yapılabilmektedir. SSR markırları bu çalışmada olduğu gibi genetik haritalama ve genetiksel varyasyonun belirlenmesinde kullanılabilirlerdir.

Fasulye popülasyonunun kullanıldığı ve SSR markırlarının yardımı ile 11 kromozomu kapsayan genetik haritanın oluşturulduğu bir çalışmada, demir ve çinko besin elementleri ile ilişkili QTL bölgeleri tespit edilmiştir (Blair vd 2010).

Gana'daki çocukların beslenmesi ve anne sağlığı için önemli, demir ve çinko içeriği yüksek olan *Solanum torvum*, *Solanum aethiopicum* ve *Solanum anguivi* (patlıcan türleri) ile yapılan çalışmada türler arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi için SSR markırları kullanılmıştır (Oppong vd 2015).

Avustralya'daki kanola çeşitlerinin arasındaki akrabalık derecesinin belirlenmesi için genotiplerin 18 SSR primeri ile taranması sonucunda 112 adet polimorfik gen bölgesi tespit edilmiştir (Wang vd 2009).

6 tane elit Şili biberi (*Capsicum annuum* L.) arasındaki genotipik farkı belirlemek için yapılan çalışmada ise 58 adet SSR markırı ile 83 adet allel belirlenmiştir. Elde edilen bazı bantların biber için spesifik olabileceği ve çeşitlerin ayrımında kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir (Dhaliwal vd 2013).

Biberde markır destekli seleksiyon yöntemi için, *Capsicum annuum* L.'nin cDNA sekans bilgisinden yararlanılarak 2 ve 3'er bazlık SSR markırı geliştirilmiştir (Sugita vd 2013).

2.5.2. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD))

DNA parçasının rastgele çoğaltımını temel alan genellikle 10 bp'lik primerin kullanıldığı markır yöntemidir. Polimorfizm, primerlerin bağlanma bölgelerinin çeşitliliği ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçacıklarından kaynaklanmaktadır (Williams vd 1990). Sekans bilgisine gerek olmayışı avantajıdır. Dominant bir markır olduğundan dolayı homozigot ve heterozigot genotipleri ayıramamaktadır. Bu nedenle daha güvenli olan SCAR markırlarına dönüştürülerek bu markırların güvenilirliği arttırılabilmektedir (Yu vd 2000). RAPD tekniği genetik kaynaklar arasındaki çeşitlilik, bitki popülasyonunda kullanılan bireyler arasındaki ilişkilerin tespitinde ve genetik haritalama çalışmalarında en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir (Williams vd 1990, Villordon ve LaBonte 1995).

29 adet acı biber genotipi arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amacı ile yürütülen bir çalışmada 10 adet RAPD primeri kullanılmıştır ve 8 tanesi ile polimorfik bant elde edilmiştir (Rego vd 2010).

70 adet *Capsicum* cinsi biber arasında tür içi ve türler arası genetik çeşitlilik belirleme çalışmasında yine RAPD markırları kullanılmıştır. 53 adet genotip açısından (16 *C. annuum*, 7 *C. frutescens*, 14 *C. baccatum* ve 16 *C. chinense*) bu primerlerin doğruluğu teyit edilmiştir (Costa vd 2005).

39 adet patates (*Solanum tuberosum* L.) genotipinin arasındaki genotipik farklılığı belirlemek için yapılan çalışmada ise SSR, ISSR ve AFLP markırlarının yanı sıra 20 adet RAPD markırı kullanılmıştır (McGregor vd 1999).

Bir patates türü olan *Solanum phureja*'nın genotipik karakterizasyon analizi için 106 adet RAPD primeri kullanılmıştır. 102 adet polimorfizmin elde edildiği çalışmada 12 tane primerin bu çalışma için en verimli olduğu tespit edilmiştir (Ghislain vd 1999).

2.5.3. Sekans ilişkili çoğaltılan polimorfizmi (Sequence-related amplified polymorphism (SRAP))

Genomdaki açık okuma bölgelerini (open reading frame (ORF)) hedef alan bir markır sistemidir. 17 nükleotidli ileri (forward) ve 18 nükleotidli geri (reverse) primerinden meydana gelmektedir. Forward primerinin 5' ucunda 13-14 nükleotidli çekirdek dizisinden (core sequence) sonra CCGG dizisi bulunurken reverse primerinde AATT dizisi bulunmaktadır. Primerlerin 3' ucunda ise üç adet seçici nükleotid bulunmaktadır. SRAP markırları, RAPD markırlarına göre daha yüksek oranda tutarlı sonuçlar ortaya koymaktadır (Li ve Quiros 2001).

56 adet patlıcan genotipinde yapılan analizde 55 adet SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda SRAP markır yönteminin genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişki belirlemek için kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir (Li vd 2010).

Rastgele seçilen 27 primer kombinasyonu ile tarama yapılan 44 patates varyetesinde 104 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Yapılan çalışma ile söz konusu olan patates türüne ait genotipin 4 tane büyük büyük grup olmak üzere 7 tane alt gruba ayrıldığı tespit edilmiştir (He vd 2007).

72 biber genotipinin kullanıldığı bir çalışmada 17 adet SRAP kombinasyonu kullanılarak genotipler arasındaki ilişki belirlenmiştir. Elde edilen 182 bantın 118 tanesinin farklı uzunlukta olduğu gözlemlenmiştir. Analizler sonucu genotiplerin 8 farklı grup meydana getirdiği tespit edilmiştir (Xu vd 2011).

2.5.4. Primer bağlanma bölgesi arası (inter primer binding sites (IPBS)) markırları (retrotranspozonlar)

Genomda çeşitli hareket edebilme kabiliyetine sahip retrotranspozonlar gibi genetik elemanlar bulunmaktadır. Retrotranspozonlar (Sınıf I transpozonlar) bir RNA ara ürün aracılığıyla kendilerini kopyalayarak hareket eden kalıtım materyalleri olarak adlandırılmaktadırlar ve transkripsiyon ile kendilerini RNA olarak kopyaladıktan sonra ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi aracılığı ile tekrar DNA'ya çevrilerek

genoma dahil edilirler. Retrotranpozonlar LTR adı verilen uzun uç tekrar dizilerine ve tRNA'ya komplementer olan korunmuş primer bağlanma bölgesine sahiptirler. Bu markır yönteminde bu bağlanma bölgeleri hedef alınmaktadır.

IPBS primerleri 12, 13 veya 18 bp uzunluklarındadır. Primerlerin yapışma (annealing) sıcaklıkları, primer uzunlukları ve GC (guanin ve sitozin) içeriklerine göre 45°C ile 60°C arasında değişmektedir (Kalendar vd 2010).

Genetik varyasyon ve ilişkinin belirlendiği, Güneydoğu bölgesinde bulunan 5 adet yıllık yabani ve 1 adet ticari türe (*Cicer arietinum*) ait 71 bireyle yapılan çalışmada IPBS primeri ile 130 polimorfik bant tespit edilmiştir (primer başına 13 polimorfik bant). NeighborNet programı ile belirlenen grupların, IPBS ve ISSR markırları ile oluşturulanların her ikisi için de benzer olduğu sonucu elde edilmiştir (Andeden vd 2012).

Genetik çeşitliliğin belirlenmek istendiği ve 6 tane dominant IPBS markırının kullanıldığı bir çalışmada ise Guava (*Psidium guajava* Linn.)'da 113 adet polimorfik bant elde edilmiştir (Mehmood vd 2013).

Popülasyon yapısının tespit edilmek istendiği bir başka çalışmada ise bezelyede (*Pisum sativum*) 12 adet IPBS markır kullanılmıştır. Skorlanabilir 106 banttan 81 tanesi polimorfik bulunmuştur (Baloch vd 2015).

Moleküler çalışmalarda kullanılan bütün bu markır yöntemleri, QTL haritalarının oluşturulabilmesi için genotipik datayı oluşturabilmek açısından önemlidir. SSR tekrar edilen, SRAP protein kodlayan, ve IPBS markırlarında transposable elementlerin olduğu genom bölgelerini temsil edeceğinden haritalama için iyi bir genom temsili oluştururlar. Ayrıca kromozoma düşen markır sayısının artırılması sayesinde, QTL bölgesinin yerinin daha kesin tespit edilebilmesi sağlanabilmektedir. SSR gibi kodominant bilgi üreten markır sistemlerinin kullanılması, genetik haritalamanın doğruluk payını arttırmada önemli rol oynamaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

Bu teze konu olan haritalama için F₂ biber popülasyonu, PI281420 (*C. frutescens* L.) ve Alata 21A (*C. annum* L.) genotiplerinin melezlenmesi ile oluşturulmuştur. Haritalama için 93 adet F₂ bitkisi kullanılmıştır. Çinko etkinliği denemeleri 450 adet F₂ bitkisi içinden en yüksek ve en düşük çinko eksikliği gösteren F₂ bitkilerinin kendilenmiş F₃ bitkilerinde yürütülmüştür. Her F₃ projenisinden 12 bitki çinko desteksiz, 12 bitki de çinko destekli ortamda yetiştirilmiştir. Denemeler, Alata/Mersin Bahçe Kültürleri Araştırma Merkezi serasında üç tekerrürlü tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuş ve bu bloklar arasındaki varyasyonlar hesaplanmıştır. Bitki materyallerinden 0-5 skalasına göre gözlem alındıktan sonra çeşitli yöntemler doğrultusunda bitkinin farklı aksamlarındaki kuru madde içerikleri belirlenmiştir. Elde edilen verilerin ortalaması, ilgilenilen QTL (Quantitative Trait Loci) bölgelerinin kromozom üzerindeki yerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Haritalamada kullanılan bağlantı grupları 20 adet SSR, 5 adet RAPD, 24 adet SRAP ve 44 adet IPBS markırları kullanılarak oluşturulmuştur. Markır taraması ile elde edilen veriler Microsoft Excel ortamında, kullanılan markırın dominant ve ko-dominant olma özelliğine göre sayısallaştırılıp Joinmap 4.1 ve QTLMap 6 haritalama programları için kullanılabilir hale getirilmiştir.

3.1. Analiz İçin Kullanılan Bitki Materyali

Yapılan bu çalışma için ebeveyn olarak Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu'nun ıslah programları için kullandığı Alata 21A (*C. annum*) saf sivri biber hattı ve Dünya Sebze Merkezi (AVRDC)'nden temin edilen PI 281420 kodlu *C. frutescens* biber türü kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bütün saksı denemeleri Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu'nda bulunan seralarda yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Alata 21A ve PI 281420 ebeveynleri ve bunların melezlenmesi ile oluşan F₁ bireyleri

Genetik haritalama için kullanılan ebeveynler ve oluşturulan popülasyonlar:

1. Alata 21A hattı
2. PI 281420 genotipi
3. Alata 21A (*C. annuum*) ve PI 281420 (*C. frutescens*)'nin melezlenmesi ile elde edilen F₁ popülasyonu
4. F₁ bitkisinin kendilenmesi ile oluşturulan F₂ popülasyonu (93 genotip)
5. F₂ popülasyonunun kendilenmesi ile oluşturulan F₃ popülasyonu

3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Bitkiler, tesadüf blokları deneme desenine üç tekerrürlü olarak Alata Bahçe Bitkileri Araştırma İstasyonu'nun cam seralarında yetiştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Alata Bahçe Kùltürleri İstasyonu'nda yürütölen saksı denemeleri

Testlemede kullanılan bitkilerin yetiştirilmesi için, Eskişehir-Sultanönü bölgesindeki alüvyal ana materyal üzerinde oluşun ve çinko açısından oldukça fakir olan toprak tipi kullanılmıştır (Eken 2007). Bu toprağın DTPA ile ekstrakte edilebilir, bitkilerce alınabilir çinko miktarı, 0.14 mg/kg'dır. Buna ek olarak bu toprak, 7.6 pH değerine, killi tün bünyeye, %20 kireç ve % 0.96 organik madde içeriğine sahiptir.

Biber fideleri 2:1 oranında torf ve perlit içeren viyollerde yetiştirilip 2-3 gerçek yapraklı evreye geldiği zaman, Eskişehir'den temin edilen ve çinko bakımından fakir olan toprakların bulunduğu (yaklaşık 2 kg) saksılara aktarılmıştır. Bu toprağın kil miktarı biber yetiştiriciliğine göre fazla olduğu için üzerlerine bir miktar kumlu toprak ilavesi yapılmıştır. Çinko etkinliğinin belirlenebilmesi için, her bir genotipe ait olan 3 saksıya çinko dahil biber bitkisinin yetişebilmesi için gerekli olan diğer bütün gübreler verilirken (çinko destekli) diğer üç saksıya sadece çinko ilavesi yapılmamıştır (çinko desteksiz).

Kullanılan gübreler ve miktarları:

1. ZnSO₄.7H₂O (3 g/L)
2. Ca(NO₃)₂.4H₂O (194 g/L)
3. KH₂PO₄ (72.435 g/L)
4. FeEDTA (3.1 g/L)

Dikim yapılmadan önce çinko verilen saksılara $ZnSO_4$ 'den ve diğer gübrelere 10 ml, çinko verilmeyen saksılara ise $ZnSO_4$ hariç diğer gübrelere 10 ml verilmiştir. Her saksıda F_2 popülasyonu test edilirken 1 adet, $F_{2,3}$ popülasyonu testlenirken 2 adet bitki yetiştirilmiştir. Saksılara, günlük gereksinimi karşılayacak oranda (tarla kapasitesindeki suyun %70'ine denk gelecek şekilde) su verilmiştir.

Bitkilerin saksıya aktarılmasından yaklaşık 25 gün sonra 1-5 skalasına göre (Şekil 3.3) gözlem alınmıştır. Çinko noksanlık belirtilerine göre yapılan 1-5 skalası şu şekildedir:

1. Çok az ya da simptomsuz (çinko etkinliği yüksek ebeveyne benzer)
2. Hafif şiddetli
3. Orta şiddetli
4. Şiddetli
5. Çok şiddetli (çinko etkinliği düşük ebeveyne benzer)



Şekil 3.3. Çinko noksanlığı skorlamasında kullanılan skala görünümü (Pınar 2013)

3.3. Genetik Haritalama ve Çinko Etkinliği İçin Popülasyonların Oluşturulması

Genetik haritalamada kullanmak amacı ile 10'ar adet Alata 21A ve PI 281420 ebeveyn bitkilerinin yanı sıra 10 adet F_1 ve 455 adet F_2 bitkisi yetiştirilmiştir. F_1 , F_2 ve F_2 genotiplerinin kendilenmesi ile oluşturulan F_3 popülasyonları çinko etkinliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Oluşturulan F_2 popülasyonundaki her genotipten yaprak örneği alınıp DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonunda CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) protokolü izlenmiştir.

455 adet F_2 bitkisinden çinko noksanlığına en fazla tepki gösteren 80 ve en az tepki gösteren 100 bitki seçilmiştir. Bu bitkiler hasat edilmeyip biber yetiştiriciliğine uygun gübreleme yapılan ortamda yetiştirilmiş ve F_3 bitkisinin tohumlarını elde edebilmek için tekrar kendilenmiştir. Her F_2 genotipini temsil eden toplam 24 (12 adet çinko noksan ve 12 adet çinko destekli) tane F_3 bitkisinden de yaprak, kök ve gövde örnekleri alınarak çinko ve kuru madde analizi için kullanılmıştır. Toplam 2232 (93x24) F_3 bitkisi yetiştirilmiştir. Alınan örnekler ilk önce ayrı ayrı tartılıp daha sonra eşit miktarda karıştırılarak kurutulup çinko analizine hazır hale getirilmiştir. Bitkilerdeki

çinko miktarı ICP (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry) cihazında spektrometrik olarak belirlenmiştir. ICP ölçümleri her bitki grubu için üç tekerrürlü olarak yapılmış ve elde edilen değerlerin ortalaması kullanılmıştır. Genetik haritalama için F₃ bitkileri için elde edilen değerlerin ortalaması, F₂ bitkilerinin fenotipik ortalaması olarak kullanılmıştır. F₂ popülasyonuna ait 48 adet skoru 1 (çinko etkinliği yüksek ebeveyn benzer) olan ve 45 adet skoru 5 (çinko etkinliği düşük ebeveyn benzer) olan genotip markır analizi için seçilmiştir.

3.4. Çinko Etkinliğinin Belirlenmesi

Her F₂ bitkisini temsil eden 12 adet F₃ bitkisinden yaprak, kök ve gövde örnekleri alınıp tartılmış ve daha sonra kurutulmuş örnekler karıştırılarak agat değirmende öğütülmüştür. Çinko analizinde kullanılmak üzere öğütülen örnekler kül fırınında yakılmıştır. Yakılan örnekler ICP cihazında analize alınmış ve çinko konsantrasyonu 213.857 dalga boyunda belirlenmiştir. Bitki başına düşen çinko içeriği, ICP okuması ile elde edilen sonuç ile bitki başına elde edilen kuru madde miktarının çarpılması ile hesaplanmıştır.

Çinko içeriğinin belirlenebilmesi amacı ile yaprakların kuru madde ağırlıkları, F₂ ve F₃ bitkileri için skorların ortalaması, bitkilerin boyları, toplam kuru maddedeki çinko miktarı, yapraklardaki çinko konsantrasyonu ve kök/sürgün oranı bakımından çinko etkinliği hesaplanmıştır.

Hesaplanan değerlerden yararlanılarak çinko etkinliği; çinko noksan koşullarda yetiştirilen 12 adet F₃ bitkisinin kuru madde ağırlığının çinko bakımından yeterli ortamda yetiştirilen 12 adet F₃ bitkisinin kuru madde ağırlığına bölünerek hesaplanmıştır.

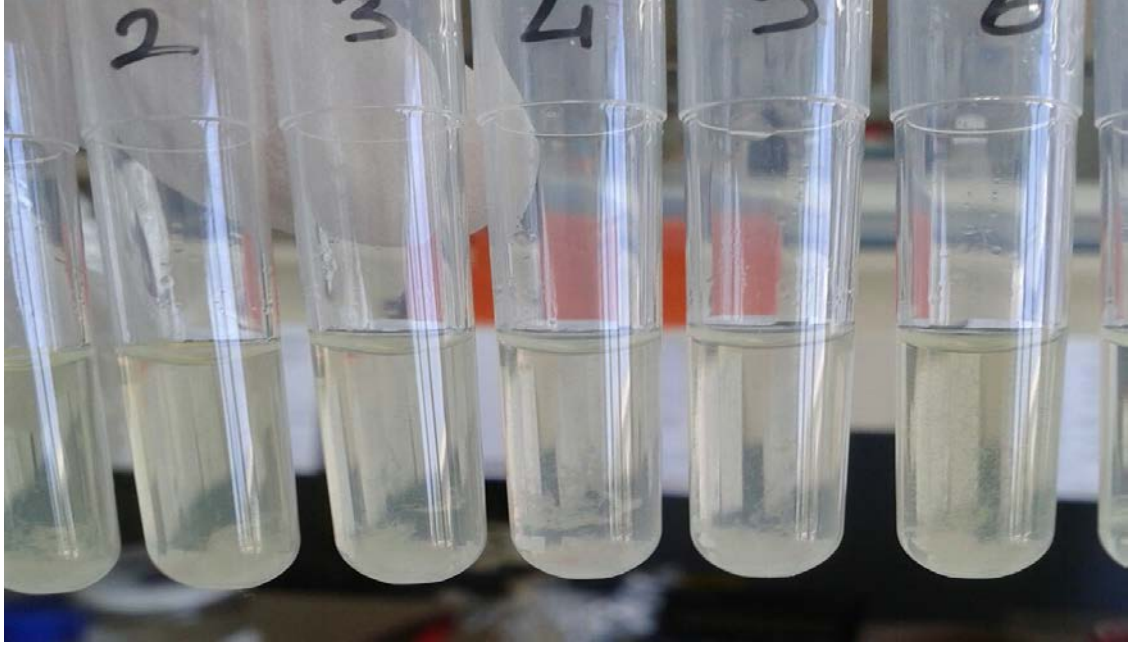
3.5. F₂ Bitkilerinden DNA İzolasyonu

Gelişimini tamamlamış 93 adet F₂ bitkisinin ve 2 adet ebeveyn bitkinin en taze yaprağından izole edilen DNA'lar moleküler analizler için kullanılmıştır. DNA izolasyonu tissue lyser cihazının yardımı ile CTAB protokolüne göre yapılmıştır. CTAB tampon çözeltisi; 2% CTAB, 100 mM TrisHCl (pH=8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol tarifine göre hazırlanmıştır.

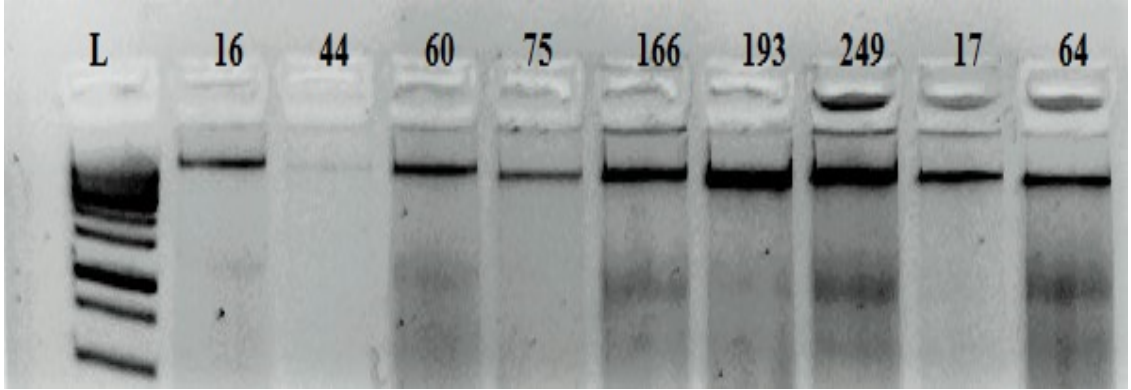
Taze biber yaprakları tüplere konulup üzerlerine 200 µl CTAB çözeltisi eklenerek ezme işlemi yapılmıştır. Ezilen örneklerin üzerlerine 250 µl daha CTAB çözeltisi eklenerek 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saat sonra inkübasyondan alınan örneklere 450 µl 24:1 oranındaki kloroform-izoamil alkol çözeltisi eklenip santrifüjde 20 dk iki fazlı solüsyon oluşması sağlanmıştır. Oluşan iki fazlı çözeltinin üst fazında DNA olduğu kabul edilip pipet yardımı ile yeni tüplere aktarılmıştır (yaklaşık 300 µl). Aktarılan bu fazın üzerine 300 µl izopropanol çözeltisi eklenip 1 gece -20°C'deki dondurucuda bekletilmiştir. Ertesi gün dondurucudan alınan örnekler santrifüj edilip tüplerin tabanında pellet oluşumu sağlanmıştır (Şekil 3.4). Oluşan pelletlerdeki çözelti dikkatlice dökülüp yerine 300 µl etanol konularak tekrar santrifüj yapılmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra tüplerdeki pelletin düşmemesine dikkat edilerek içerisindeki çözelti döküldükten sonra yarım saat

kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplere 100 µl distile su eklenerek stok DNA çözeltisi elde edilmiştir.

Analizlerden önce izole edilen DNA'ların miktarı, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 3.5). Stok DNA, moleküler analizlerde kullanılmak üzere 1:9 oranında distile su ile seyreltilmiştir.



Şekil 3.4. Tüplerin alt kısmında oluşan pelletler



Şekil 3.5. F2 popülasyonunun ilk 9 genotipine ait DNA (5 µl) görüntüsü

3.6. Markır Analizleri

455 adet F₂ bitkisinin arasından genetik haritalama için kullanılmak üzere 93 (+2 ebeveyn) genotip seçilmiştir. Ebeveynler arasında polimorfizm verdiği tespit edilen SSR, SRAP, RAPD ve retrotranspozon primerleri, 8 adet F₂ bitkisine ait DNA'lar kullanılarak moleküler markırlar oluşturulmuştur.

3.6.1. SSR markır analizleri

Sekans ve harita bilgileri Solgenomics.net'te yer alan *C. annuum* ve *C. frutescens* türlerinin melezlenmesi ile oluşturulan popülasyonda; entegre biber haritasında kullanılan markırlar, bağlantı grupları (kromozomlar), markırların kromozom üzerindeki yerlerine dair bilgiler yer almaktadır (Wu vd 2009). Burada yer alan 60 SSR primer çiftinin (F+R) ebeveynler ile taraması yapıldıktan sonra polimorfik olan 24 tanesi dF₂ popülasyonuna ait 93 genotiple analiz edilmek için seçilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Ebeveynlerle yapılan primer taraması sonucu polimorfik bulunan SSR markırları ve sekans bilgileri

No	Primer Adı	Kromozom	Baz		Sekans Bilgisi (5'-3')
1	CP10081	2	263	F	AGGGCTAAGCCGTCTAAA
				R	CTCTTCATGTCCACCCTG
2	Hpms1MADS	8	210	F	TGCTTTCAAAAACAATTTGCATGG
				R	VGCGTCTAATGCAAAACACACATTAC
3	GP20117*	11	214	F	TGACAGCTACCGAAAATGA
				R	CCTCTAATGCTGACGTGAA
4	Hpms1155*	8	207	F	ACGAGGCCCAAGCTGTTATGTC
				R	TTGTCCCGACTCTCCATGACC
5	CP10023	12	177	F	CACCATGTAGCATCTGGG
				R	GATGGATGGATCGACAGA
6	Hpms162*	8	186	F	CATGAGGTCTCGCATGATTTAC
				R	GGAGAAGGACCATGTACTGCAGAG
7	CA514272*	2	259	F	ATCTATTTTCTCCGGCGAC
				R	CGGTAAGCTGCCTTGATCTC
8	Hpms13*	9	223	F	TGGGAAATAGGATGCGCTAAACC
				R	AACTTTAAGACTCAAAATCCATAACC
9	Hpms1117*	9	189	F	ACCCAAATTTGCCTTGTTGAT
				R	AATCCATAACCTTATCCATAAA
10	GPMS171*	9	250	F	TCCACCACAATATTTCAAGG
				R	TGGCTGTCCAACACTGTGAG

Çizelge 3.1.'in Devamı

11	CA525390	11	196	F	GGAAACTAAACACACTTTCTCTCTC
				R	ACTGGACGCCAGTTTGATTCT
12	CA516439*	10	158	F	GACAGTCTTTCAAGAACTAGAGAGAG
				R	TGGAGCAAACACAGCAGAAC
13	GP20068*	10	118	F	TTCCCTGTGAAAACACTG
				R	TGTTCAACTGCTCTGAGAC
14	C2At1g44760*	6	250	F	ACGAGGCGCCCTCTCTC
				R	GAGTCCAAACTGAAGCTGCC
15	GP20036*	11	98	F	TTTGGACCCTTTCCCTAC
				R	GGATCAAGTAGGCCTTGA
16	Hpms245*	5	148	F	CGAAAGGTAGTTTTGGGCCTTTG
				R	TGGGCCCAATATGCTTAAGAGC
17	At1g14810*	8	250	F	GCATTAGTGGTGTGGAC
				R	GACAGGCAAGGCTATGTC
18	BM59622*	3	90	F	CGTCTTTCACTTGTCTTTTGTTCT
				R	AGTGGGTTCACTGACTTGGG
19	Hpms141*	1-8	192	F	GGGTATCATCCGTTGAAAGTTAGG
				R	CAAGAGGTATCACAACATGAGAGG
20	CAeMS060*	6	250	F	ATCAAGACAACAACATCA
				R	GTTTCGCCTATCAACAATC
21	Hpms143	8	154	F	AACCAGCAATCCCATGAAAACC
				R	GGGCTTTGGGGAGAATAGTGTG
22	CA847460*	8	178	F	ACGAGGCGCCCTCTCTC
				R	GAGTCCAAACTGAAGCTGCC
23	GP20095*	1-8	207	F	GGTTATTAATCCGGTTTCG
				R	TGTTGTTAGGAGAAATTAAGA
24	CP10060	1	214	F	TCTCTCGTTTCTTTCCG
				R	CCGAACTTGTAGTGCTG

SSR primerlerinin testlenmesinde PCR bileşenleri Çizelge 3.2’de ve PCR döngüsü ise Çizelge 3.3’de sunulan şekilde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. SSR analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
DNA	2 µL
10x PCR Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.5 µL
25 Mm MgCl ₂	1.5 µL
5 U/µL Taq DNA polymerase	0.2 µL
5 Mm dNTP	1.5 µL
SSR Primeri (Forward)	1.8 µL
SSR Primeri (Reverse)	1.8 µL
H ₂ O	4.7 µL
TOPLAM	15 µL

Çizelge 3.3. SSR analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94.0°C	3 dk	
94.0°C	30 sn	35
57°C	59 sn	35
72°C	59 sn	35
72°C	10 dk	
4°C	∞	

3.6.2. SRAP markır analizleri

SRAP analizinde ileri (forward) primeri olarak Me1’den Me13’e kadar ve geri (reverse) primeri olarak da Em1’den Em16’ya kadar olan primerlerin 208 tane olan kombinasyonu kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Bu kombinasyonlar ile ilk önce Alata 21A ve PI 281420 ebeveynleri ile taranmış ve polimorfizm gösteren 31 adet primer çifti seçilmiştir (Çizelge 3.5).

SRAP primerlerinin testlenmesinde PCR bileşenleri Çizelge 3.6’da ve PCR döngüsü ise Çizelge 3.7’de sunulan şekilde kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. SRAP primerine ait forward ve reverse primerlerinin sekans bilgileri

Primer	Forward Sekans Bilgisi (5’-3’)	Primer	Reverse Sekans Bilgisi (5’-3’)
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA

Çizelge 3.4.'ün Devamı

Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	Em8	GACTGCGTACGAATTCAC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em9	GACTGCGTACGAATTCCAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em10	GACTGCGTACGAATTCAT
Me11	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em11	GACTGCGTACGAATTCTA
Me12	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em12	GACTGCGTACGAATTCTC
Me13	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em13	GACTGCGTACGAATTCTG
		Em14	GACTGCGTACGAATTCTT
		Em15	GACTGCGTACGAATTGAT
		Em16	GACTGCGTACGAATTGTC

Çizelge 3.5. Polimorfizm gösteren SRAP primer kombinasyonları

No	Primer Kombinasyonu	No	Primer Kombinasyonu
1	Em12 Me10	17	Em 1 Me 2
2	Em 16 Me 8	18	Em 6 Me 6
3	Em 11 Me 8	19	Em 5 Me 8
4	Em 16 Me 13	20	Em 3 Me 10
5	Em 9 Me 1	21	Em 3 Me 6
6	Em 16 Me 4	22	Em 10 Me 6
7	Em 5 Me 13	23	Em 7 Me 6
8	Em 5 Me 11	24	Em 13 Me 5
9	Em 10 Me 11	25	Em 10 Me 5
10	Em 4 Me 13	26	Em 15 Me 3
11	Em 11 Me 12	27	Em 6 Me 1
12	Em 5 Me 12	28	Em 14 Me 1
13	Em 4 Me 9	29	Em 16 Me 3
14	Em 13 Me 5	30	Em 6 Me 13
15	Em 10 Me 16	31	Em 11 Me 11
16	Em 8 Me 7		

Çizelge 3.6. SRAP analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
DNA	2 µL
10x PCR Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.5 µL
25 Mm MgCl ₂	1.5 µL
5 U/µL Taq DNA polymerase	0.2 µL
5 Mm dNTP	1.5 µL
SRAP Primeri (Forward)	2 µL
SRAP Primeri (Reverse)	2 µL
H ₂ O	4.3 µL
TOPLAM	15 µL

Çizelge 3.7. SRAP analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94.0°C	2 dk	
94.0°C	1 dk	5
35°C	1 dk	5
72°C	1 dk	5
94°C	1 dk	35
50°C	1 dk	35
72°C	1 dk	35
4°C	∞	

3.6.3. RAPD markır analizleri

150 adet RAPD primeri ile ebeveynler taranarak en fazla polimorfik bant veren 12 adet RAPD primeri seçilmiştir (Çizelge 3.8). 93 F₂ genotipi seçilen RAPD primerleri ile analiz edilmiştir. RAPD primerlerinin testlenmesinde PCR bileşenleri Çizelge 3.9'da ve PCR döngüsü ise Çizelge 3.10'da sunulan şekilde kullanılmıştır.

Çizelge 3.8. Polimorfizm elde edilen RAPD primerleri ve sekans bilgileri

No	Primer Adı	Sekans Bilgisi (5'-3')
1	TIBMBB04	ACCAGGTCAC
2	TIB17	GTTCGCTCCC
3	OPI03	CAGAAGCCCA
4	OPL04	GACTGCACAC
5	OPM11	GTCCACTGTG
6	OPM10	TCTGGCGCAC
7	OPM19	CCTTCAGGCA
8	OPB20	CCTTGACGCA
9	OPB01	GTTTCGCTCC
10	OPAH02	GGCAGTTCTC
11	OPAC10	AGCAGCGAGG
12	OP108	TTTGCCGGT

Çizelge 3.9. RAPD analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
DNA	2 µL
10x PCR Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.5 µL
25 Mm MgCl ₂	1.5 µL
5 U/µL Taq DNA polymerase	0.2 µL
5 Mm dNTP	1.5 µL
10Mm RAPD Primeri	2 µL
H ₂ O	6.3 µL
TOPLAM	15 µL

Çizelge 3.10. RAPD analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94.0°C	3 dk	
94.0°C	1 dk	35
38°C	45 sn	35
72°C	2 dk	35
72°C	10 dk	
4°C	∞	

3.6.4. IPBS markır analizleri

42 adet IPBS primeri ilk önce ebeveynler ile taranarak en fazla polimorfizmi gösteren 20 adet IPBS primeri belirlenmiş ve polimorfik markırlar F₂ populasyonunda haritalanmıştır (Çizelge 3.11).

RAPD primerlerinin testlenmesinde PCR bileşenleri Çizelge 3.12’de ve PCR döngüsü ise Çizelge 3.13’de sunulan şekli ile kullanılmıştır.

Çizelge 3.11. En fazla polimorfik bant veren IPBS primerleri

No	Primer Adı	Sekans Bilgisi (5’-3’)	Bağlanma Sıcaklıkları
1	2076	GCTCCGATGCCA	51°C
2	2077	CTCACGATGCCA	46°C
3	2228	CATTGGCTCTTGATACCA	60°C
4	2230	TCTAGGCGTCTGATACCA	52°C
5	2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	46°C
6	2244	GGAAGGCTCTGATTACCA	53°C
7	2246	ACTAGGCTCTGTATACCA	55°C
8	2249	AACCGACCTCTGATACCA	54°C
9	2253	TCGAGGCTCTAGATACCA	56°C
10	2255	GCGTGTGCTCTCATAACCA	46°C
11	2272	GGCTCAGATGCCA	51°C
12	2375	TCGCATCAACCA	50°C
13	2379	TCCAGAGATCCA	46°C
14	2380	CAACCTGATCCA	46°C
15	2381	GTCCATCTTCCA	48°C
16	2383	GCATGGCCTCCA	46°C
17	2384	GTAATGGGTCCA	45°C
18	2387	GCGCAATACCCA	46°C
19	2389	ACATCCTTCCCA	46°C
20	2393	TACGGTACGCCA	48°C

Çizelge 3.12. IPBS analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
DNA	3 µL
10x PCR Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.5 µL
25 Mm MgCl ₂	1.5 µL
5 U/µL Taq DNA polymerase	0.3 µL
5 Mm dNTP	1.5 µL
10Mm IPBS Primeri	1 µL
H ₂ O	6.2 µL
TOPLAM	15 µL

Çizelge 3.13. IPBS analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94.0°C	3 dk	
94.0°C	30 sn	35
IPBS primerine ait bağlanma sıcaklığı	59 sn	35
72°C	59 sn	35
72°C	10 dk	
50°C	45 sn	
40°C	45 sn	
30°C	45 sn	
20°C	45 sn	
4°C	∞	

3.7. Jel Elektroforezi

PCR yardımı ile üretilen SRAP, RAPD ve IPBS PCR ürünlerinin UV altında görüntülenebilmesi %2'lik jel (400 ml TBE tampon çözeltisi, 8 g agaroz, 6 µL etidyum bromid) kullanılmıştır. SSR ürünlerinin görüntülenmesinde ise %3'lük (400 ml TBE tampon çözeltisi, 12 g agaroz, 6 µL etidyum bromid) agaroz jel kullanılmıştır. Jelin hazırlanmasında kullanılan TBE tampon çözeltisi için ilk önce 108 g tris, 55 g borik asit ve 7.5 g EDTA'nın 1000 ml saf suda çözdürülmesi ile 10X'lik stok çözelti oluşturulmuştur. Daha sonra bu 1X'lik çözelti 9 L saf su ile karıştırılarak 1X'lik seyreltilmiş çözelti hali ile kullanılmıştır. PCR ürünlerinin üzerine 5 µL yükleme boyası (15 ml gliserol, 35 ml saf su, 0.05 g bromofenol blue) eklenerek jele yüklemesi yapılmıştır. Ürünler 110 V elektrik akımı ile yaklaşık 4 saat 1X'lik TBE tampon çözeltisinin içerisinde koşturulmuştur. Her jel yüklemesinde ilk kuyucuklara 3 µL 1 kb'lik DNA Ladder (Thermo, GeneRuler) yüklenmiştir. Jel görüntülemesi Minilumi, DNR Bio-Imaging Systems markalı cihazda yapılmıştır.

3.8. Bağlantı Gruplarının Oluşturulması ve QTL Haritalama

RAPD, SRAP ve IPBS markırlarına ait PCR ürünleri, bu markırların dominant olması nedeni ile 1 (bant var) ve 0 (bant yok) şeklinde skorlanmıştır. SSR markırı kodominant bir markırı olduğu için, SSR markırına ait PCR ürünleri ise A (annedeki bant), B (babadaki bant) ve H (heterozigot) olarak skorlaması yapılmıştır. Bütün veriler Microsoft Excel ortamında analize hazır hale getirilmiştir.

Genlerin ait oldukları bağlantı gruplarının (kromozomların) lokasyonlarının belirlenebilmesi için JoinMap 4.1 genetik haritalama programı kullanılmıştır. Dominant markıra ait "1-0" şeklinde yapılan skorlamalar, JoinMap 4.1 programı için (a,c) ya da (b,d) şeklinde çevrilmiştir. Bu ise aynı primer ile çoğaltılan PCR ürünü görüntüsünde, (b,d) sadece anne olarak kullanılan genotipte bant varken baba olarak kullanılan genotipte bant olmadığı anlamına gelmektedir. (a,c) skorlaması ise bu ifadenin tam tersinin geçerli olduğu durumda kullanılmıştır. JoinMap 4.1 ile bağlantı gruplarının belirlenmesinde en düşük LOD skoru 4.0 ile bir bağlantı grubuna dahil olan ve X^2 (ki-kare) analizinde beklenenden (3:1, 1:3, 1:2:1) önemli sapma göstermeyen markırlar kullanılmıştır. Ardından, oluşturulan bağlantı haritası ve çinko etkinliğine ait veriler MapQTL 6 programında QTL analizlerinde (interval mapping, MQM ve rMQM) kullanılmıştır. MapQTL 6 programının yardımı ile özelliği kontrol eden gen bölgeleri (QTL lokusları) belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Biberde Çinko Eksikliğine Karşı Testlemenin Yapılması ve Kalıtım ile İlişkisi

Biberde çinko noksanlığına karşı testlemenin yapılması amacı ile çinko noksanlığına karşı hassas PI 281420 (*C. frutescens*) ve noksanlığa dayanıklı Alata 21A (*C. annuum*) ebeveynlerinin melezlenmesi ile elde edilen F₁ bireyleri ve bunların kendilenmesi ile elde edilen F₂ bireyleri kullanılmıştır. F₁ ve F₂ bireylerinin testlenmesi yapılırken eş zamanlı olarak çinko destekli (+Zn) ve çinko desteksiz (-Zn) ortamlardaki ebeveynlerin oluşturduğu belirtiler da 90 gün boyunca gözlemlenmiştir.

90 gün boyunca gözlemlenen ebeveynlerden Alata 21A, 75 gün sonra çinko noksanlığından etkilenmeye başlamış ve 90 günün sonunda ise PI 281420 ebeveynine göre daha dayanıklı görünmesine rağmen büyümesinde azalmalar meydana gelmiştir. PI 281420 ebeveyni, tipik çinko eksikliği belirtilerini 15. günden itibaren göstermeye başlamıştır. Çinko noksan koşullarında testlenen F₂ popülasyonunda ise bitki boyu 4-28 cm/bitki arasında, gövde yaş ağırlığı 1.25-9.37 g/bitki, gövde kuru ağırlığı 0.26-1.96 g/bitki, kök yaş ağırlığı 0.43-7.73 g/bitki, kök kuru ağırlığı 0.1-0.99 g/bitki, toplam kuru ağırlık 0.39-2.8 g/bitki ve toplam yaş ağırlık ise 2.34-17.1 g/bitki arasında değişmiştir. Bütün bu değerler incelendiğinde ise F₂ popülasyonunda geniş bir varyasyonun olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle çinko destekli ve desteksiz ortamlar arasındaki farkın daha net anlaşılabilmesi açısından F₃ popülasyonu ile yapılan testleme önem kazanmaktadır.

Geri melez popülasyonu ile yapılan bir çalışmada (Pınar 2013) ise Alata 21A ebeveyninin sitoplazmasını taşıyan ve çinko noksan ortamda yetiştirilen GM₁P₁ bireylerinin skorlamasında 1-5 skalasına göre en fazla 1 skoru gözlemlenmiştir. Belirtilenin şiddeti arttıkça da kuru madde ağırlığında azalmalar meydana gelmiştir. Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ise söz konusu özellik bakımından bir dominant etkinin olabileceği belirtilmiştir. GM₁P₂ popülasyonunda (PI 281420 ebeveyninin sitoplazmasını taşıyan bireylerde) ve F₂ popülasyonuna ait bireylerde aynı şekilde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fakat kuru madde miktarlarının incelenmesi sonucunda, çinko noksanlığı ile açıklanamayan %50'nin üzerinde bir genetik faktörün olduğu kanısına varılmıştır. Aynı çalışmada Alata 21A (*C. annuum*) x (*C. frutescens*) PI 281420 melezlemesinden elde edilen 206 adet F₂ bitkisinin çinko noksanlığı belirtilerini kullanarak Wright (1968)'e göre çinko noksanlığına dayanımı kontrol eden minimum gen sayısı 1,375 olarak hesaplanmıştır. Karakter üzerindeki çevre varyansı toplam varyansın yaklaşık %10'u olarak hesaplanmıştır. Bu durum karakterin kuvvetli bir genetik kontrol altında olduğuna işaret etmektedir. Toplam genetik varyans içinde eklemeli gen etkisinin %28, dominant gen etkisinin ise %72 olduğu hesaplanmıştır. Dar anlamda kalıtım derecesi geniş anlamda kalıtım derecesinden 2.5 kat daha küçük bulunmuştur. Sonuç olarak söz konusu karakterin dominant bir genin etkisinde olduğu ve yapılan X² testi ile 12:3:1 açılımının ve dominant epistasisin var olduğu belirlenmiştir. Alata 21A genotipindeki topraktaki çinko noksanlığına direncin bir major dominant lokus ve bu lokusa epistatik olan ikinci modifiye edici bir lokusun etkisinde olduğuna işaret etmektedir (Pınar 2013).

Çinko etkinliği sitoplazmik etki açısından incelenecek olursa; Alata 21A sitoplazması taşıyan F₁ bireylerinin çinko etkinliği %89 belirlenmiştir ve yüksek çinko

etkinliğine sahip Alata 21A ebeveyninden % 4.7 daha yüksek çinko etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. PI 281420 sitoplazması taşıyan F₁ bireylerinin çinko etkinliği ise % 95 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar *C. annuum* veya *C. frutescens* sitoplazması taşıyan hibrit bitkilerin birbirine yakın derecede çinko etkinliğine sahip olduğunu ve çinko etkinliği üzerine sitoplazmanın ölçülebilir bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Çinko destekli ve çinko desteksiz ortamlarda yetiştirilen Alata 21A, PI 281420 ve *C. frutescens*/*C. annuum* sitoplazması taşıyan F₁ genotiplerine ait çinko etkinliği değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. -Zn ve +Zn koşullarında yetiştirilen Alata 21A, PI 281420 ve *C. frutescens*/*C. annuum* sitoplazması taşıyan F₁ genotiplerine ait çinko etkinliği değerleri

Genotip	Çinko Etkinliği	Sitoplazmasını Taşıdığı Ebeveyn
PI 281420 (+Zn)	%47	<i>Capsicum annuum</i>
21A (+ Zn)	%85	<i>Capsicum annuum</i>
F ₁ (21A x PI281420) +Zn	%89	<i>Capsicum annuum</i>
PI 281420 (+Zn)	%49	<i>Capsicum frutescens</i>
21A (+ Zn)	%91	<i>Capsicum frutescens</i>
F ₁ (21A x PI281420) +Zn	%95	<i>Capsicum frutescens</i>

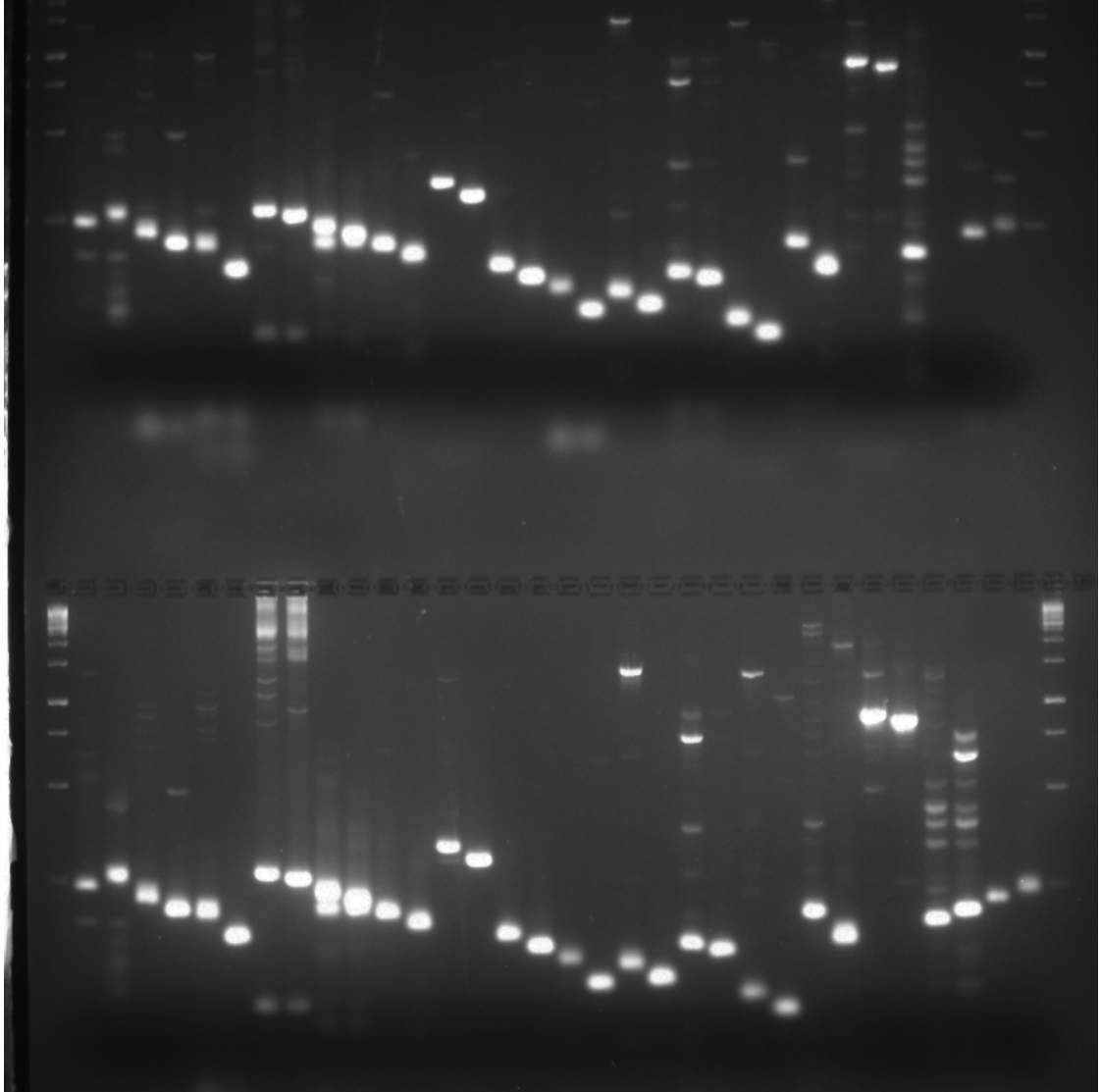
Pınar (2013)’a göre F₁ hibritler çinko noksanlığına tolerant ebeveyninden daha yüksek çinko noksanlık semptomu oluşturmuşlardır. Bu sonuç da çinko noksanlığı semptomlarının oluşumunu kontrol eden genlerin tam (%100) dominant olmadığını (eksik dominansı) ve F₁ hibritlerde overdominant özellik gösteren çinko etkinliği ile çinko noksanlık semptomu oluşturan genlerin tamamının aynı genler olmayabileceğine ve her iki özelliğe spesifik ayrı genlerin de varlığına işaret etmektedir. Dolayısıyla söz konusu özelliğin yüksek kalıtıma sahip tek gen değil de çoklu genle kontrol edilen bir karakter olduğu görülmektedir.

4.2. Genetik Haritalama

Çinko noksan ve destekli koşullarda hem ebeveyn bitkiler hem de F₁ ve F₂ popülasyonunu oluşturan bitkiler yetiştirilmiştir. 455 adet F₂ bitkisi çinko destekli ve çinko noksan koşullarda yetiştirilip belirli aralıklarla gözlemleri alınmıştır. Genetik haritalamada kullanılmak amacı ile çinko noksan koşullarda en az semptomu gösteren 48 adet ve çinko noksan koşullarda en yüksek semptomu gösteren 45 adet F₂ bitkisi seçilmiştir. Bu bitkiler normal bitki besleme rejimine geçilerek F₃ tohumları alınmıştır. F_{2,3} bitkilerinin çinko noksan ve destekli ortamda tekerrürlü yetiştirilmesi sonucu elde edilen çinko etkinliği değerleri QTL haritalaması amacıyla kullanılmıştır.

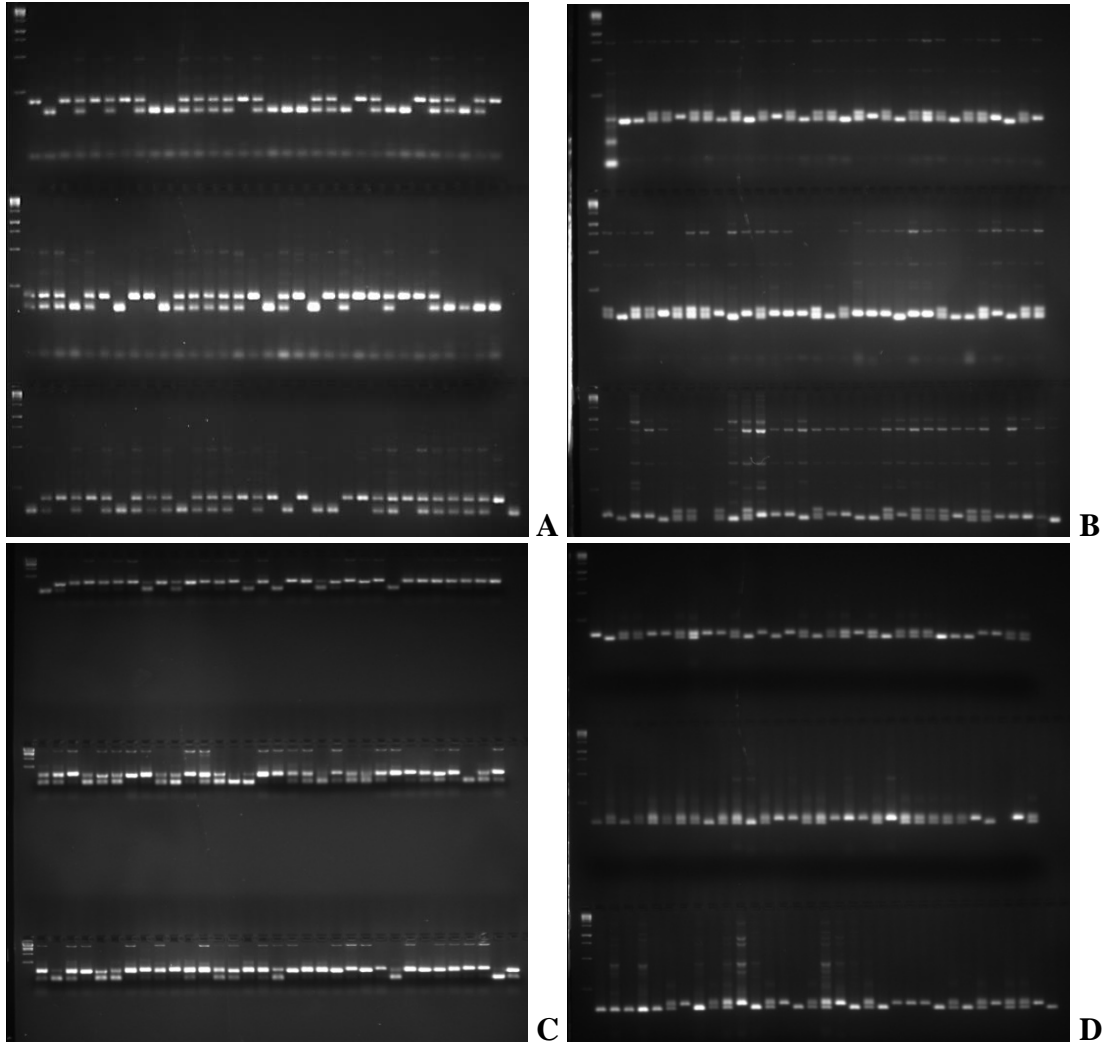
4.2.1. Moleküler çalışmalar

SSR markır analizi için ilk önce Alata 21A ve PI 281420 ebeveynleri ile 60 adet primerin taraması yapılmıştır (Şekil 4.1). Ürünlerdeki polimorfizm durumu %3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir. Polimorfik olan ve agaroz jelde ayrışma gösterebilen 24 adet primer çifti (Çizelge 3.1'de belirtilen) 93 adet F₂ bireyinin SSR markır analizinde kullanılmak amacı ile seçilmiştir.



Şekil 4.1. Alata 21A ve PI 281420 ebeveynleri ile yapılan SSR primeri taramasının 32 adet primer çiftine ait görüntüsü

Elde edilen görüntüler doğrultusunda primer çiftlerinin seçilen 95 birey için kullanılmasından önce 8 örneklilik ve 3 primer kombinasyonu ile 2 tekerrürlü PCR optimizasyonu yapılmıştır. Bu optimizasyon için 55°C ve 57°C olmak üzere iki adet bağlanma sıcaklığı (T_m) kullanılmıştır. Spesifik bağlanmaların daha az olduğu 57°C diğer SSR primerlerinin testlenmesinde bağlanma sıcaklığı olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Alata 21A, PI 281420 ve diğer bireylerin Hpms141 (A), Hpms245 (B), GP20036 (C) ve CA516439 (D) primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görüntüleri

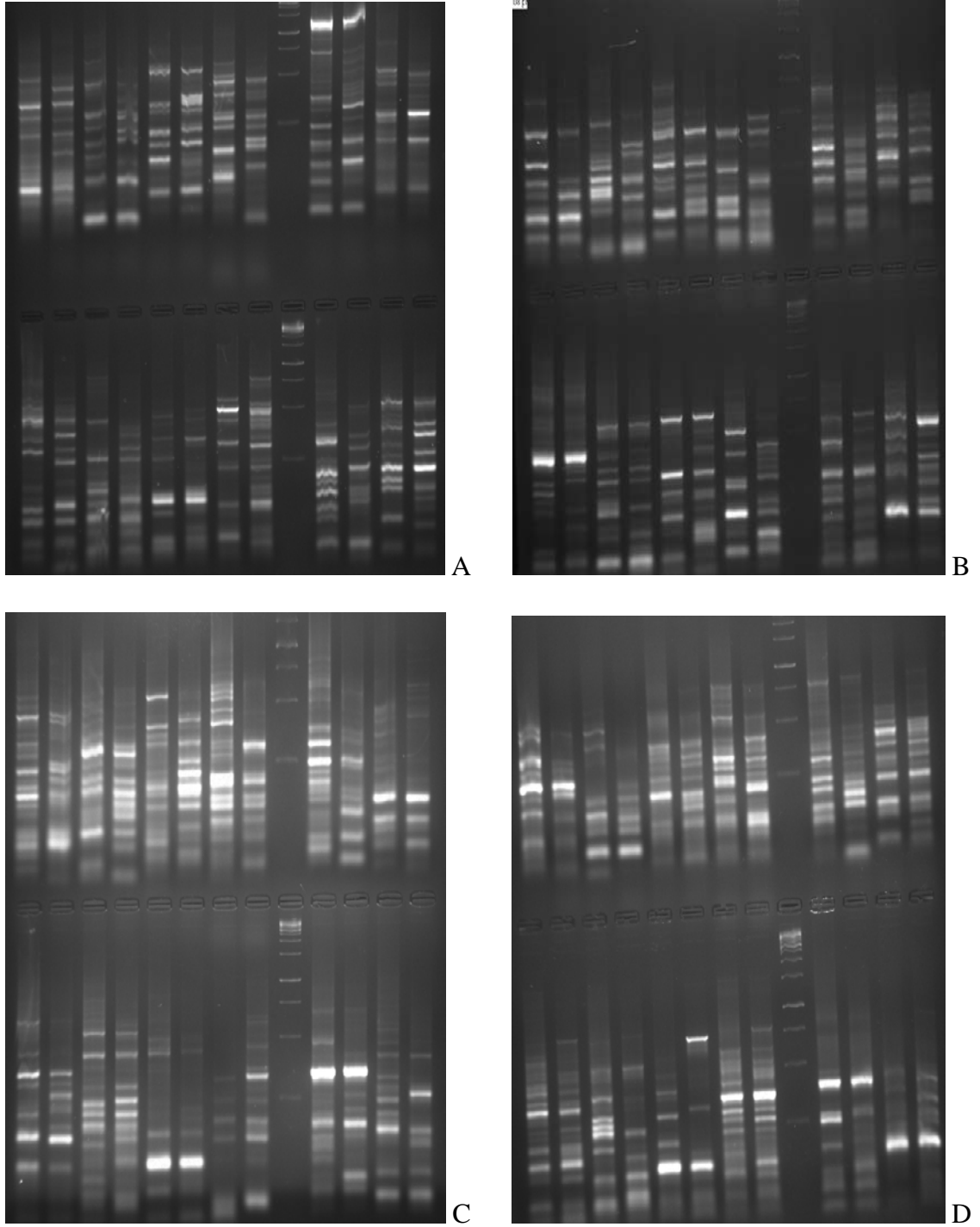
Bu çalışmada bilinen SSR markırları, bağlantı haritası oluşturulurken gen ve/veya QTL'leri barındıran kromozomların hangisi olduğunu belirlemek amacı ile kullanılmıştır. Bu markır grubuna böyle bir özellik göstermesinden dolayı “anchor (kromozom-linkaj grubu)” adı verilmektedir. Anchor markırın yanı sıra SRAP, RAPD ve IPBS markırlarının da kullanılması sayesinde linkaj haritası oluşturulup çinko etkinliğinden sorumlu genlerin ve/veya QTL'lerin yer aldığı kromozomlar belirlenmiştir. Bu bağlamda söz konusu karaktere yakın markırların geliştirilmesi imkanı sağlanmaktadır.

SRAP markır analizine, ebeveynlerin SRAP primer kombinasyonları ile taranmasıyla başlanmıştır. Polimorfik bant sayısının en fazla olduğu 31 adet primer çifti ile belirlenmiştir. SRAP primer kombinasyonları ile elde edilen polimorfik bant sayıları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Alata 21A ve PI 281420 ebeveynlerinde SRAP primer kombinasyonları ile elde edilen polimorfik bant sayıları

	Me1	Me2	Me3	Me4	Me5	Me6	Me7	Me8	Me9	Me10	Me11	Me12	Me13
Em1	2	4	3	3	2	1	1	4	2	2	2	2	3
Em2	0	0	3	2	3	5	3	2	2	1	1	1	2
Em3	2	1	0	1	4	4	0	2	2	4	0	2	4
Em4	1	3	2	3	2	2	1	2	5	1	1	0	5
Em5	4	2	3	4	2	2	4	5	3	2	5	5	5
Em6	5	3	5	5	4	4	2	0	4	4	3	3	6
Em7	4	3	4	3	4	5	0	2	5	2	4	4	5
Em8	2	2	3	3	3	4	4	2	4	1	1	1	1
Em9	5	2	2	3	2	1	3	4	5	2	2	0	3
Em10	5	2	0	2	5	5	1	0	4	4	5	4	3
Em11	0	4	4	4	4	3	2	5	5	4	6	5	4
Em12	2	1	5	4	0	4	4	1	3	4	3	0	2
Em13	4	0	5	3	5	2	0	2	3	2	2	3	3
Em14	6	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	2	2
Em15	2	4	5	1	4	2	3	2	0	1	2	4	4
Em16	2	5	6	5	3	2	3	4	3	3	4	3	5

208 adet SRAP primer kombinasyonu ile toplamda 569 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Bu çizelgeye dayanılarak seçilen polimorfik primer kombinasyonları Çizelge 3.5'te sunulmuştur. Polimorfik olarak seçilen 31 adet primer kombinasyonundan 4 tanesi ile ilk önce farklı PCR bileşenleri miktarlarıyla 8'er örneklik PCR optimizasyon çalışması yapılmıştır. En net polimorfik bantların elde edildiği PCR bileşenlerinin miktarları belirlenince 31 SRAP kombinasyonu ile diğer genotiplerin testlemesi yapılmıştır (Şekil 4.3).



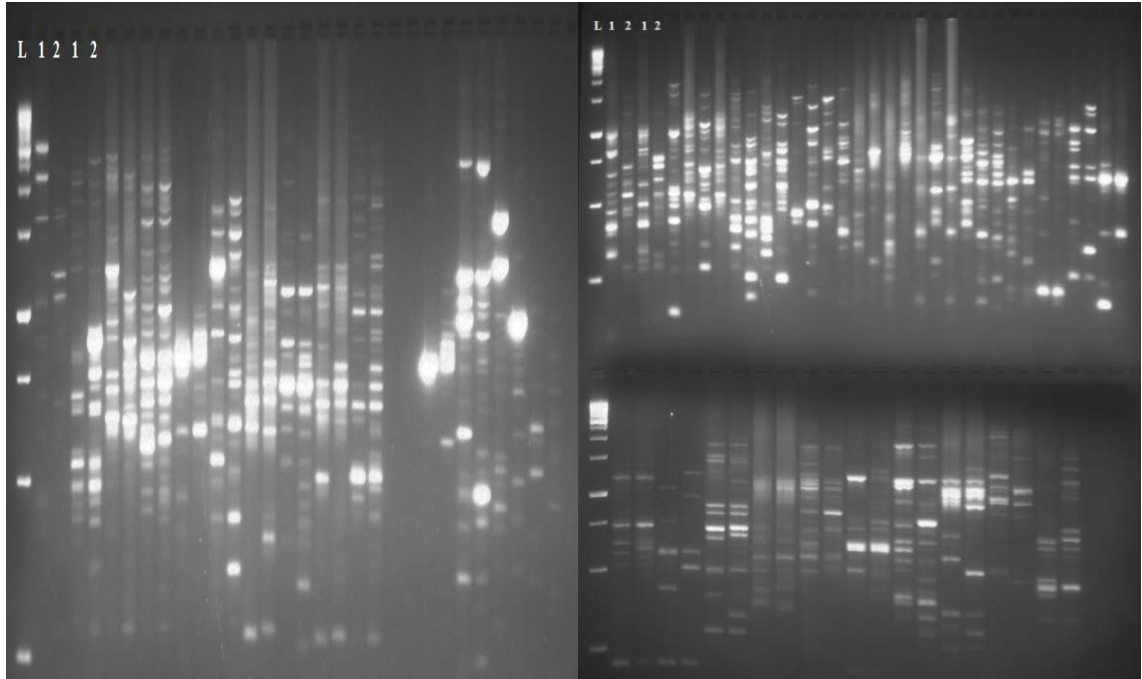
Şekil 4.3. SRAP primer kombinasyonları (A: Em5-(Me1-Me12), B: Em6-(Me1-Me12), C: E8-(Me1-Me12), D: Em9-(Me1-Me12)) ile elde edilen polimorfik PCR ürünlerine ait örnek görüntüleri

SRAP primerlerine ek olarak 12 adet RAPD primeri (Çizelge 4.3) ile de aynı şekilde ebeveyn taraması yapıldıktan sonra 10 adet polimorfik bant elde edilen primerle diğer 93 genotipin markır taraması yapılmıştır.

Çizelge 4.3. %2'lik agaroz jelde 12 RAPD primerinden elde edilen polimorfik bant sayıları

No	Primer Adı	Polimorfik Band Sayısı
1	OP108	6
2	OPAC10	4
3	OPAH2	4
4	OPB01	4
5	OPB20	1
6	OPM19	4
7	OPM10	2
8	OPM11	7
9	OPL04	3
10	OPI03	2
11	TIB17	2
12	TIBMBB04	7
	TOPLAM	46

Son olarak IPBS markır analizleri ile ebeveyn taraması yapılarak en fazla polimorfik bant veren primerler seçilmiştir (Şekil 4.4). Bunun için ilk önce Alata 21A ve PI 281420 ebeveynlerine ait DNA'lar ve 42 IPBS primeri ile PCR'da elde edilen ürünlerdeki polimorfik bant sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.4). PCR amplifikasyonu işleminde her primere ait kendi bağlanma sıcaklığı kullanılarak optimizasyon yapılmıştır. Polimorfik bant sayılarına göre seçilen 20 adet IPBS primeri genetik haritalama amacı ile kullanılmıştır.

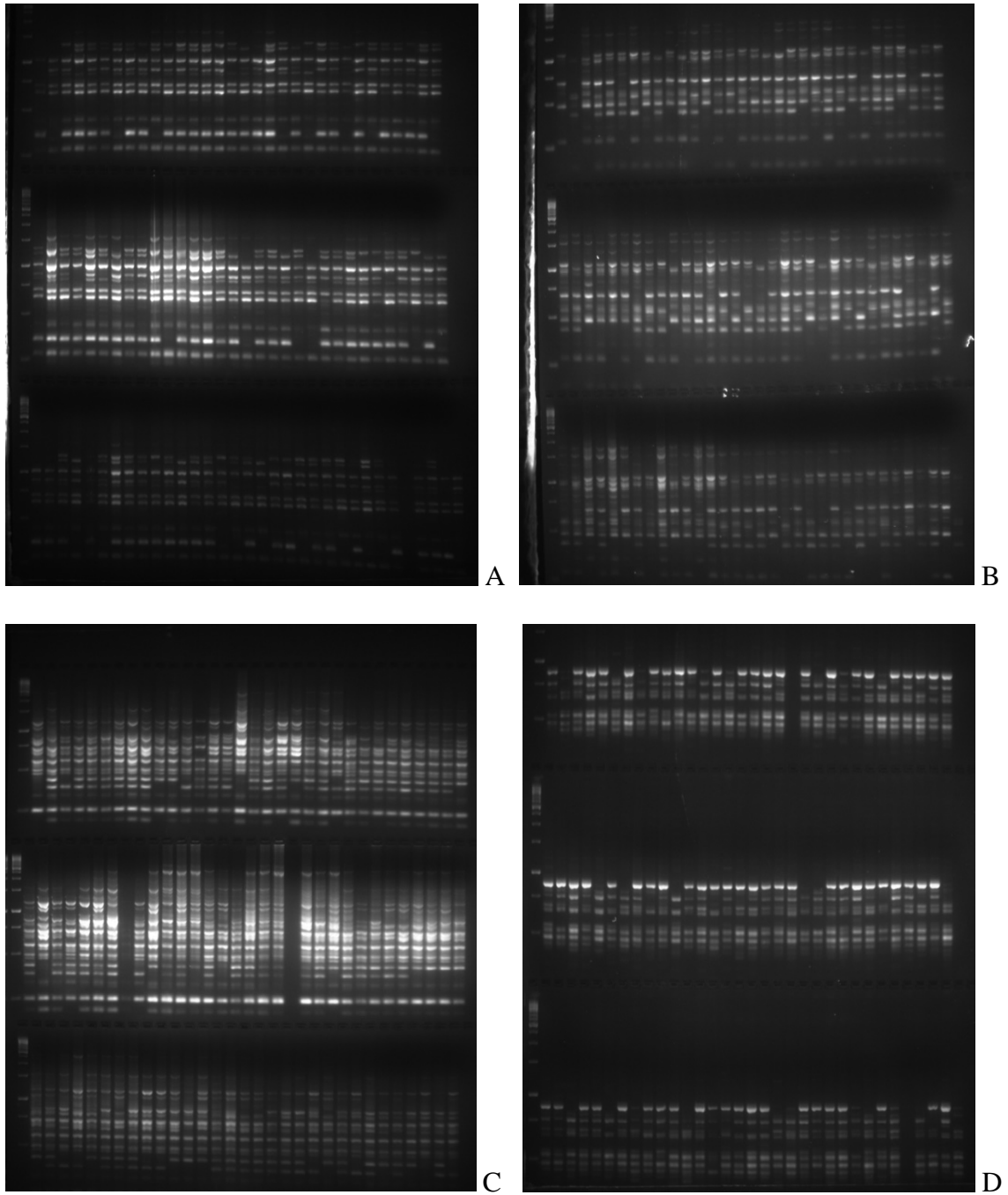


Şekil 4.4. Alata 21A (1) ve PI 281420 (2) ebeveynleri ile yapılan IPBS primerleri tarama görüntüleri

Çizelge 4.4. IPBS primerlerinden elde edilen polimorfik bant sayıları

No	Primer Adı	Polimorfik Bant Sayısı
1	2077	12
2	2379	14
3	2380	16
4	2383	10
5	2384	14
6	2387	14
7	2388	14
8	2389	15
9	2277	-
10	2217	-
11	2237	6
12	2255	7
13	2074	6
14	2375	8
15	2376	-
16	2381	7
17	2391	1
18	2392	-
19	2393	6
20	2394	2
21	2270	-
22	2226	3
23	2075	3
24	2076	6
25	2272	6
26	2220	5
27	2230	7
28	2244	7
29	2246	8
30	2249	10
31	2252	2
32	2219	2
33	2221	6
34	2232	5
35	2243	8
36	2251	4
37	2253	9
38	2218	-
39	2222	5
40	2239	2
41	2228	9
42	2238	4
	TOPLAM	263

Polimorfik bant elde edilen 20 adet IPBS primeri ile 93 genotipin markır taramasına ilişkin görüntüler Şekil 4.5'teki gibidir.



Şekil 4.5. IPBS primerleri (2381 (A), 2380 (B), 2387 (C), 2244 (D)) ile yapılan örnek tarama görüntüleri

4.2.2. Bağlantı gruplarının oluşturulması

Bağlantı grupları JoinMap 4.1 programı kullanılarak oluşturulmuştur. SRAP, RAPD, SSR ve IPBS primerleri olmak üzere toplamda 311 adet polimorfik bant

kullanılarak 16 tane bağlantı grubu oluşturulmuştur. Gruplar oluşturulurken markırlar X^2 testine tabi tutulmuştur. Analiz sonucu beklenen açılımdan istatistiksel olarak önemli sapma gösteren ($p \leq 0.001$) 218 adet markır bağlantı grupları oluşturulmasına dahil edilmemiştir. Onaltı bağlantı grubunun oluşturulmasında kullanılan markırlar ve kromozom uzunlukları Çizelge 4.5'te verilmiştir. 44 IPBS, 5 RAPD, 20 SSR ve 24 SRAP olmak üzere toplam 93 markır, biber bağlantı gurupları üzerinde haritalanmıştır. Bağlantı gruplarının (kromozomların) adlandırılmasında Wu vd (2009) *C. annuum* x *C. frutescens* türler arası melez popülasyonundan elde edilen entegre biber haritasında kullanılan SSR markırlarından yararlanılmıştır. Bu SSR markırlarına ait sekans ve harita bilgileri Solgenomics.net'te mevcuttur.

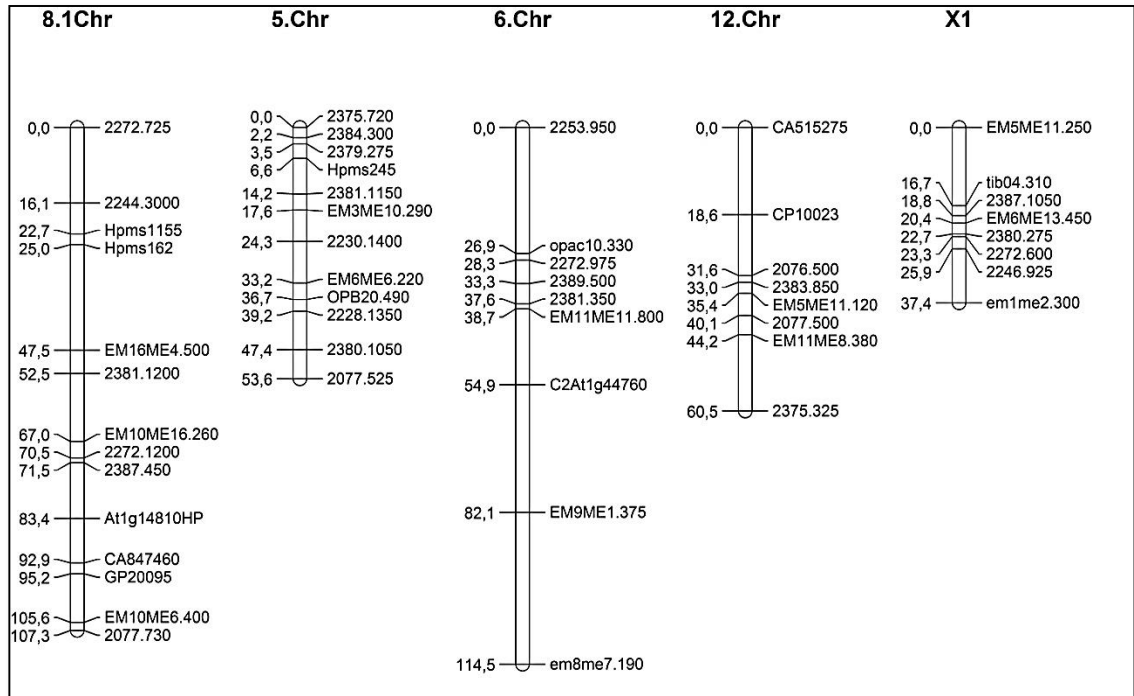
Çizelge 4.5. Genetik haritada kullanılan markırlar ve ait olduğu kromozomlar

Kromozom	Kromozom 2	Kromozom 3	Kromozom 5	Kromozom 6
SSR	2	1	1	1
SRAP	-	-	2	3
RAPD	1	-	1	1
IPBS	-	2	8	4
Toplam Markır Sayısı	3	3	12	9
Uzunluk (cM)	4.7	38.4	53,6	114,5
Kromozom	Kromozom 8.1	Kromozom 8.2	Kromozom 9	Kromozom 10.1
SSR	5	1	3	1
SRAP	3	2	1	1
RAPD	-	-	-	1
IPBS	6	3	-	4
Toplam Markır Sayısı	14	6	4	7
Uzunluk (cM)	107,3	52.1	37.0	61.9
Kromozom	Kromozom 10.2	Kromozom 11	Kromozom 12	Kromozom X1
SSR	1	2	2	-
SRAP	3	1	2	3
RAPD	-	-	-	-
IPBS	-	1	4	5
Toplam Markır Sayısı	4	4	8	8
Uzunluk (cM)	23.4	33.7	60.5	37.4

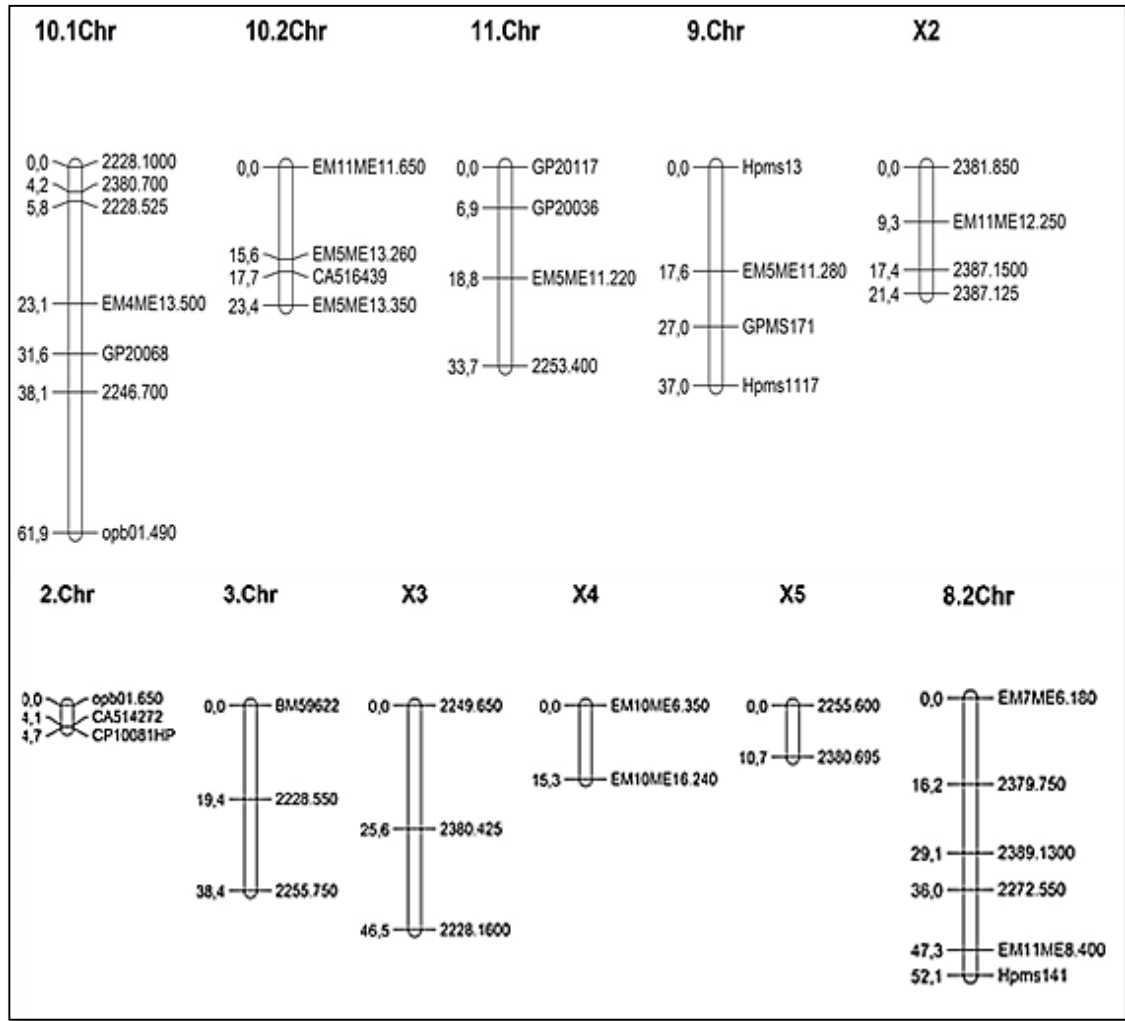
Çizelge 4.5.'in Devamı

Kromozom	Kromozom X2	Kromozom X3	Kromozom X4	Kromozom X5
SSR	-	-	-	-
SRAP	1	-	2	-
RAPD	-	-	-	-
IPBS	3	3	-	2
Toplam Markır Sayısı	4	3	2	2
Uzunluk (cM)	21.4	45.5	15.3	10.7

Bağlantı grupları oluşturulurken biberin 12 kromozomuna ait 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, ve 12. kromozomları bu gruplarda haritalanan SSR markırları yardımı ile belirlenirken SSR bulunmayan 5 gruba da X1, X2, X3, X4 ve X5 isimleri verilmiştir. X grubu olarak adlandırılan bağlantı grupları biberin 1., 4. ve 7. kromozomları yanında diğer bağlantı gruplarının devamı da olabilir. JoinMap 4.1 programında iki markır arası mesafe 30 cM ve LOD (logarithm of odds) skor 4 kabul edilerek analiz yapılmıştır. Burada aynı bağlantı grubunda bile olsa iki markır arası 30 cM dan uzak ve LOD değeri 4.0 dan düşük ise farklı bir bağlantı grubu oluşur. 10^4 markırdan 1 tanesinin bu bağlantı grubunda yer alıp almaması istatistiksel olarak şansa bağlı demektir. Fakat 8.1 ve 8.2 kromozomlarına ait gruplar oluşturulurken LOD skor 5 alınmıştır. Ayrıca 8. ve 10. kromozomlardan da 2 adet bağlantı grubu elde edilmiştir. Aynı kromozomun bir parçası olarak kabul edildiği için 8.1 – 8.2 ve 10.1 – 10.2 olarak adlandırılmışlardır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. SRAP, RAPD, IPBS ve SSR markırları ile oluşturulan bağlantı grupları



Şekil 4.6.'nın Devamı

Yapılan analizler sonucu toplamda 717.4 cM harita uzunluğunda bir genetik bağlantı haritası elde edilmiştir. Biberde yayınlanan ilk tam harita 1613 cM harita uzunluğundadır (Wu vd 2009). Solgenomics.net'te Pepper-COSII, Pepper-FAO3 ve Pepper-AC99 ismiyle yer alan biber haritaları, biberin 12 kromozomu da barındıran en büyük biber entegre haritalarıdır. Bu haritalar SSR, COSII, CAPS, dCAPS ve SCAR markırları kullanılarak oluşturulmuştur.

Livingstone vd (1999) tarafından F2 biber popülasyonu kullanılarak yapılan bir genetik haritalama çalışmasında ise 11 büyük (76.2-192.3 cM) ve 2 küçük (19.1 ve 12.5 cM) toplamda ise 1245.7 cM bağlantı grubu elde edilmiştir. Lee vd (2004) tarafından yürütülen başka bir haritalama çalışmasında ise *C. annuum* "TF68" ve *C. chinense* "Habanero" türlerinin melezlemesi ve 333 markır ile oluşturulan "SNU2" biber haritasında 46 SSR ve 287 RFLP markırı ile toplamda 1.761 cM uzunluğunda bağlantı grubu oluşturulmuştur. Lee vd (2009) tarafından iki türler arası ve iki tür içi biber popülasyonu ile 4 adet genetik haritadan meydana gelen 1858 cM harita uzunluğunda genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Bu harita, 99 adet rRAMP, 51 WRKY, 152 AFLP, 13 RFLP-STs, 23 STs-BAC, 354 RFLP ve 169 SSR markırını barındırmaktadır.

4.2.3. QTL analizleri

Bağlantı haritası JoinMap 4.1 programında oluşturulduktan sonra kantitatif özelliklerin analizi için MapQTL 6 kullanılmıştır. Bu program için JoinMap 4.1 programında kullanılan genotip datası, yine bu programda oluşturulan harita (bağlantı grupları) datası ve F₃ popülasyonunda yapılan analiz ve ölçümler yardımı ile hazırlanan QTL datası kullanılmıştır. Bütün bu veriler kullanılarak MapQTL 6 programında interval mapping (IM), MQM (multiple QTL mapping) ve rMQM (restricted multiple QTL mapping) analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde söz konusu özelliklerin elde edilen bağlantı grupları üzerinde bulunma ihtimalleri LOD skorları ile birlikte yer almaktadır. MapQTL 6 programından 31 adet özelliğin analizi yapılmıştır.

QTL analizine ilk olarak 93 adet F₂ bitkisinin kendilenmesinden elde edilen 93 adet F₃ projenisinin çinko eksikliğine karşı oluşturdukları simptomların gözlemlenmesi ve bu simptomların derecelerine göre 1-5 skalasına ait ortalama değerlerinin kullanılması ile başlanmıştır. Skorlama işlemi çiçeklenme başlangıcından itibaren birer hafta ara ile toplam 6 defa olmak üzere tekrar edilmiştir. 1-5 skalasına göre yapılan ölçümler, F₃ popülasyonunda çinko noksanlığı bakımından geniş bir varyasyonunun var olduğunu göstermiştir. PI 281420 hassas ebeveyni çinko noksanlığına karşı şiddetli simptom gösterirken Alata 21A ebeveyni dayanıklılık göstermiştir. MapQTL 6 programında her F₃ genotipine ait 12 bitkinin ortalama değeri kullanılmıştır. Analiz sonucunda söz konusu özelliklerin 8.1, 10.2, ve 2. kromozomlarda yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. opb01.650, Em5Me13.350, Em10Me16.260 ve CP10081 bu özellik için en önemli markırlar olup 2.04 LOD skoru ile belirlenen QTL'ler F₃ çinko noksanlığı simptomunun %9.6'sını açıklamıştır. 93 F₂ bitkisine ait veriler ile yapılan aynı analizde ise 8.1 ve X1. kromozomlarda bu özelliğin yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. Em1Me2.300, 2272.1200, CA847460, Em10Me16.260, 2387.450 ve GP20095 en önemli markırlar olup LOD skor 2.53 ile özelliğin %11.8'i açıklanmıştır. F₃ popülasyonuna dair elde edilen skorlar ve toplam kuru madde ağırlığına bağlı hesaplanan çinko etkinliği ile aralarında r=-0.76 değerinde negatif fakat yüksek bir korelasyon elde edilmiştir. Buradan; 1-5 skalasına göre yapılan skorlamada 1 değerine yaklaştıkça simptomların azalıp bitki kuru madde oranında artış meydana geldiği sonucuna varılmaktadır.

Toplam kuru madde ağırlığı açısından çinko etkinliğine bakıldığı zaman, çinko destekli ve desteksiz ortamlarda yetiştirilen F₃ bitkilerinin ortalama yaprak, kök ve gövde ağırlıkları hesaplanmıştır. Çinko noksan koşullarda simptom gözlenmesi bile kuru madde miktarında ciddi oranlarda azalmalar meydana gelmiştir. F₃ popülasyonuna ait verilerin analizi sonucunda bu özelliğin LOD skor 1.80 ile 12. kromozomda yer aldığı bulunmuştur ve toplam varyasyonun %8.5'ini açıklamıştır. Fakat bitki boyu açısından çinko etkinliğine ait QTL ise 8.1 ve 12. kromozomlarda LOD skor 2.33 ile özelliğin %10.9'unu açıklamıştır. Her iki özellik için de öne çıkanların SSR markırı CA515275 ve At1g14810 olduğu tespit edilmiştir. Toplam kuru madde açısından çinko etkinliği ve bitki boyu açısından çinko etkinliği için r=0.89 değerinde bir korelasyon elde edilmiştir. Bu sonuca bakıldığında iki özellik açısından pozitif yönlü doğrusal bir ilişki var demektir. Gövde kuru madde ağırlığı açısından çinko etkinliği özelliği ise 2.07 LOD skoru ile meydana gelen varyasyonun %9.8'ini açıklamıştır. Bu QTL'in de 8.1 ve 12. Kromozomda olma ihtimali oldukça yüksektir. 2387.450, At1g14810 ve CA515275

yine en önemli markırlar olarak bu özellikte karşımıza çıkmaktadır. Toplam kuru madde ağırlığı açısından çinko etkinliği ve gövde kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği arasında pozitif ve oldukça yüksek bir korelasyon bulunmaktadır ($r=0.97$). Bu durum bitkideki kuru madde ağırlığının artması ile gövdedeki kuru madde içeriğinin artması ve buna bağlı olarak da çinko etkinliğinin artması, gövde ve toplam kuru madde içeriğini etkileyen genlerin ortak olabileceği anlamına gelmektedir.

Toplam kuru maddedeki çinko konsantrasyonu bakımından çinko etkinliğinin belirlenmesinde ise daha önceki çalışmaların sonucuna istinaden bitkinin yaprakları kullanılmıştır. Çünkü bitki besin durumunun analizi için alınan en uygun örneğin yaprak olduğu belirlenmiştir (Dang vd 1993). Fakat yaprak dahil diğer dokularda bulunan bitki besin elementi konsantrasyonu bitkinin türü, çeşidi, yaşı ve çevre faktörlerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Yapılan analizler sonucu toplam kuru maddedeki çinko içeriği ppm cinsinden hesaplanmıştır. Alata 21A ebeveyni orta-yüksek, PI 281420 ebeveyni orta-düşük çinko konsantrasyonuna sahip iken, iki türün melezlenmesi ile elde edilen F_1 bireylerinde iki ebeveyne göre daha yüksek çinko konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bu durumun heterosise veya epistatik gen etkisine işaret ettiği düşünülmektedir. F_2 popülasyonu ile yapılan hesaplamalar neticesinde bu özellik bakımından geniş bir varyasyon olduğu belirlenmiştir. Toplam kuru madde açısından çinko etkinliği ve toplam çinko içeriği bakımından etkinlik arasında $r=0.84$ değerinde bir korelasyon hesaplanmıştır. Bitkideki kuru madde oranı arttıkça çinko etkinliği açısından da bir artış meydana gelmektedir. Duruma toplam kuru madde ağırlığı ile toplam çinko konsantrasyonu açısından bakacak olursak düşük ve negatif bir korelasyon elde edilmiştir ($r=-0,06$). Yani bitkideki kuru madde oranı arttıkça çinko konsantrasyonunda azalma meydana gelmiştir. Bunun nedeninin ise bitki gelişimi ve boyundaki artış nedeni ile meydana gelen bir seyrelme etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. F_3 popülasyonu içerisinde, F_1 bireyleri ve ebeveyn bitkilerdeki çinko konsantrasyonlarına göre daha yüksek çinko içeriğine sahip bitkiler de elde edilmiştir. Toplam kuru madde çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği özelliğinin 2.91 LOD skoru ile 8.1 ve 12. kromozomlarda olduğu belirlenmiştir ve varyasyonun %13.4'ü açıklanmıştır. CA515275, 2387.450, 2272.1200 ve Hpms162 bu QTL ile ilgili en önemli markırlardır.

Bütün bitkilerden aynı zamanda yaprak, gövde ve kök olmak üzere ayrı ayrı toplam kuru madde ve çinko içeriği analizleri yapılmıştır. F_1 bitkileri genel olarak dayanıklı ebeveyn olan Alata 21A'ya yakın bir değer almıştır. Yaprak kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği ile toplam kuru madde ağırlığı bakımından çinko etkinliğine ait değerler arasında pozitif ve yüksek bir korelasyon elde edilmiştir ($r=0.95$). Aynı zamanda yaprak kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği ve yaprak çinko içeriği arasında da sıkı bir ilişki saptanmıştır ($r=0.63$). Yapraklarda bulunan çinko genel olarak bitki gelişimine katkı sağladığı için toplam kuru madde miktarını da arttırmıştır. Yaprak çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği özelliği 2.42 LOD skoru ile 12, X3 ve X4. kromozomlarda yer almaktadır. 2249.650, Em10Me6.350 ve CA515275 önemli markırlar olup varyasyonun %11.3'ü açıklanmıştır. Aynı şekilde kök 2.23 çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği özelliği 2.42 LOD skoru ile 8.1, 11 ve 12. kromozomlarda yer almaktadır. 2253.400, CA515275 ve At1g14810 önemli markırlar olup varyasyonun %10.4'ü açıklanmıştır. Haritalanan önemli özelliklere ait diğer bilgiler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Biberde çinko etkinliğine ilişkin önemli QTL'lere ait diğer özellikler

No	Karakter İsmi	Kromozom	En Önemli Markır	QTL pozisyonu (cM)	% Eksp.	Özellik Kaynağı
Q2	<i>F₃ Skor (F₃ popülasyonunda çinko noksanlığı simptomu)</i>	10.2	Em5Me13.350	23.419	9.6	PI281420
		8.1	Em10Me16.260	67.011	9.4	PI281420
		2	CP10081	4.662	9.4	-
		2	opb01.650	0.000	9.2	PI281420
Q4	<i>Toplam Kuru Ağırlığa Bağlı Çinko Etkinliği</i>	12	CA515275	0.000	8.5	-
Q5	<i>Bitki Boyuna Bağlı Çinko Etkinliği</i>	12	CA515275	0.000	10.9	-
		8.1	At1g14810	83.384	9.2	-
Q10	<i>Gövde Kuru Ağırlığına Bağlı Çinko Etkinliği</i>	8.1	2387.450	71.503	8.7	PI281420
		12	CA515275	0.000	8.6	-
		8.1	At1g14810	83.384	8.2	-
Q12	<i>F₂ Skor (F₂ popülasyonunda çinko noksanlığı simptomu)</i>	8.1	GP20095	95.220	11.8	-
		8.1	2387.450	71.503	11.0	-
		8.1	Em10Me16.260	67.011	10.3	PI281420
		8.1	CA847460	92.938	10.3	-
		8.1	2272.1200	70.501	10.2	Alata 21A
		X1	Em1Me2.300	37.406	10.2	PI281420
Q13	<i>Yaprak Çinko İçeriğine Bağlı Çinko Etkinliği</i>	X3	2249.650	0.000	11.2	PI281420
		X4	Em10Me6.350	0.000	6.3	PI281420
		12	CA515275	0.000	5.8	-

Çizelge 4.6.'nın Devamı

Q15	<i>Kök Çinko</i>	11	2253.400	33.725	10.4	PI281420
	<i>İçeriğine Bağlı</i>	12	CA515275	0.000	9.9	-
	<i>Çinko Etkinliği</i>	8.1	At1g14810	83.384	9.3	-
Q16	<i>Toplam Çinko</i>	12	CA515275	0.000	13.4	-
	<i>İçeriğine Bağlı</i>	8.1	2387.450	71.503	9.6	PI281420
	<i>Çinko Etkinliği</i>	8.1	2272.1200	70.501	9.2	Alata 21A
		8.1	Hpms162	24.996	8.2	-

Biberde çinko etkinliği ile ilgili belirlenen QTL'ler değişik LOD skorlar ile açıklanmıştır. Fakat 2.0 LOD skorun altında bulunan özelliklere sahip oldukları için ayrı ayrı değinilmemiştir. Bu QTL'lere ait özellikler Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Biberde çinko etkinliği ile ilgili belirlenen diğer QTL'ler

No	Karakter İsmi	Kromozom	Önemli Markırlar	% Exp.	Maksimum LOD Skoru
QTL30	Yaprak/Toplam Çinko İçeriği	2 ve 3	CA514272, CP10081, opb01.650 ve 2255.750	9.0	1.91
QTL31	Gövde+Yaprak/Toplam Çinko İçeriği	5 ve 11	GP20117 ve Em3Me10.290	8.8	1.85

Ayrıca yaprak fosfor içeriğine bağlı çinko etkinliği ve fosfor/çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği özelliklerine ait QTL'ler sırası ile LOD skoru 1.96 ve 2.06 ile açıklanmıştır. Yaprak fosfor içeriğine bağlı çinko etkinliği QTL'i için en önemli markırlar Hpms141 ve Em11Me8.400 olup 8.2 ve 11. kromozomlarda yer almıştır. Varyasyonun ise %9.2'si açıklanmıştır. Fosfor/çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği QTL'i için en önemli markırlar ise CA515275 ve CP10081 olup 2 ve 12. kromozomlarda yer almıştır. Varyasyonun %9.7'si açıklanmıştır.

Buğdayda çinko etkinliği ve dane çinko konsantrasyonunun ile ilgili yapılan bir QTL analizinde 2A, 4A, 7B ve 7D kromozomlarında çinko noksanlığı skoru ile bağlantılı 4 adet QTL bulunmuştur. 4B ve 4D kromozomlarında yer alan sürgün biyoması ile ilişkili QTL'ler de tespit edilmiştir. Bitki boyu ve bitki çinko ve demir konsantrasyonları arasında sıkı bir ilişki tespit edilmiştir. Ayrıca her QTL'in bireysel

olarak değil de bir araya geldikleri zaman dane çinko içeriğine etki ettikleri belirlenmiştir (Genç vd 2009). Double haploid *Triticum aestivum* L. popülasyonunda çinko ve fosfor yoğunluğunun belirlenmesi amacı ile yapılan analizlerde bu özelliğin çoklu gen tarafından kontrol edildiği gözlemlenmiştir. Dört QTL çinko konsantrasyonu, 7 QTL çinko içeriği için belirlenmiştir. Tohum çinko konsantrasyonu için iki QTL 4A ve 4D kromozomlarında fosfor konsantrasyonu QTL'i ile birlikte yer alırken, tohum çinko içeriği ile ilgili QTL fosfor içeriği QTL'i ile birlikte 2D, 3A ve 4A kromozomlarında yer aldığı tespit edilmiştir (Shi vd 2008). Diploid buğday türü olan *Triticum boeoticum* RIL popülasyonunda (recombinant inbred lines) yapılan tohum çinko ve demir içeriği ile ilgili çalışmada tohum çinko içeriği QTL'i 7A, tohum demir içeriği QTL'i ise 2 adet olmak üzere 2A ve 7A kromozomlarında bulunduğu belirlenmiştir (Tiwari vd 2009).

Arabidopsis halleri × *Arabidopsis lyrata petraea* melezlemesi ile oluşturulan F2 popülasyonunda aşırı çinko birikimi ve çevre (bölge) arasındaki ilişkiyi belirlemek için QTL analizi yapılmıştır. Sonuç olarak 1. ve 4. Kromozomlarda az çinko muamelesi ve 3, 6 ve 7. Kromozomlarda ise çok çinko muamelesine bağlı olarak toplam 5 QTL belirlenmiştir. Bu QTL'ler fenotipik varyansı sırası ile %50.1 ve %36.5 oranında açıklamışlardır (Roosens vd 2008).

Phaseolus vulgaris L. ile yapılan çalışmada ise tohum çinko ve demir içeriğine ilişkin QTL'ler RIL popülasyonunda belirlenmiştir. Toplamda 9 QTL, b02, b06, b08 ve b07 lokuslarında yer almıştır. Ayrıca tohum ağırlığı ile ilgili QTL yine b02 ve b08 lokuslarında bulunduğu belirlenmiştir (Blair vd 2011). Cichy vd (2008) tarafından fasulyede yapılan başka bir çalışmada ise tohum çinko, demir ve fosfor içeriklerine ilişkin QTL'ler yine RIL popülasyonu ile yapılan çalışma ile belirlenmiştir. $r=0.53$ korelasyon değeri ile demir ve çinko içeriklerinin birbiri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Demir ve çinko içerikleri açısından bulunan özellikler birlikte 3 bağlantı grubunda yer almışlardır.

Pirinçte (*Oryza sativa* L.) çinko toksisitesine karşı tolerans ile ilgili yapılan bir çalışmada RIL popülasyonunda 289 RFLP markırının taranması sonucu 1, 3 ve 10. kromozomlarda yer alan 3 adet QTL keşfedilmiştir. Bu özellik sırası ile 21.9, 8.9 ve 7.6 yüzdeleri ile açıklanmıştır (Dong vd 2005). Çinko noksanlığı ve bitki gelişimi ilişkisinin belirlendiği bir başka çalışmada ise IR74 (tolerant olmayan) ve Jalmagna (tolerant) türlerinin melezlenmesi ile elde edilen popülasyon kullanılmıştır. Bitki ölümü ile ilişkili 4 adet QTL belirlenmiştir. Bu QTL'ler 2 ve 12. kromozomlarda yoğunlaşmıştır. Bu varyasyonun sırası ile %16.6 ve %24.2'si açıklanmıştır (Wissuwa vd 2006).

Double haploid arpa (*Hordeum vulgare*) popülasyonunda mikro besin maddeleri birikimi özelliğinin belirlendiği bir haritalama çalışmasında, toplamda 9 adet lokus bu özellik ile ilgili ilişkili bulunmuştur. Bu 9 lokusun 5 tanesinin ise dane çinko kapsamına katkı sağladığı belirlenmiştir (Lonergan vd 2009).

Brassica oleracea L.'de sürgün çinko konsantrasyonu ile ilgili yürütülen çalışmada çevre etkisinin bu özellik üzerindeki etkisinin fazla olduğu gözlemlenmiştir. 90 adet double haploid hat ile yapılan analizler sonucunda C2, C3, C5, C7 ve C9 kromozomlarında sürgün çinko içeriği ile ilgili QTL'lerin bulunmasına rağmen büyüme

koşullarından kolayca etkilendiği ve bu nedenle de ıslah programında kullanılamayacağı belirlenmiştir (Broadley vd 2010).

Bütün bu yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman, bu çalışma ile elde edilen bulgular neticesinde F_2 ve F_3 popülasyonundaki çinko noksanlık simptomsu, toplam kuru madde ağırlığı, yaprak kuru madde ağırlığı, yaprak ve toplam kuru madde çinko içeriği konsantrasyonu, bitki boyu gibi özelliklere ilişkin birçok QTL belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmayla (Pınar 2013) bu karakterlerin poligenik olduğu yani birden fazla gen ile kontrol edildiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, biberde yapılan önceki çalışmalar ile tutarlılık göstermektedir. Bazı bağlantı grupları başına düşen markır sayısının az olmasını göz önünde bulunduracak olursak, diğer özelliklerdeki varyasyonu açıklama yüzdelerinin düşük olması muhtemel bir sonuçtur. Fakat bu konu ile ilgili biberde yapılan önceki çalışmalara göre kullanılan markır sayısının göreceli olarak fazla olması nedeni ile sonuçların daha fazla doğruluk payı teşkil ettiği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan bu çalışma ile ilk defa IPBS (retrotranspozon) markırları biber genomunda haritalanmıştır. Polimorfizmi belirlenen 20 adet IPBS markırı ile yapılan genetik haritalama çalışmasında 3, 8.1, 11 ve X3. Kromozomlarda, F_2 popülasyonunda çinko noksanlığı simptomsu, gövde kuru ağırlığına bağlı çinko etkinliği, yaprak çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği, kök çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği, toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği ve yaprak/toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği özelliklerine ait QTL'lerin yerleri tespit edilmiştir.

Dünyada çinko etkinliği ile ilgili yapılan araştırmaların büyük bir kısmı daha çok tahıllar gibi monokotil (tek çenekliler) bitkiler üzerine yapılmış olsa da, ülkemizde özellikle sebze tarımının yoğun bir şekilde yapıldığı Akdeniz Bölgesi için biber gibi dikotil (çift çenekli) bitkilerde de yapılması stratejik bir önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışmanın amacına daha geniş bir perspektiften bakacak olursak, çinko alımının güç olduğu, üzerinde çinko etkinliği açısından fizyolojik ve metabolik problemler yaşayan bitkilerin yetiştiği bu topraklar ile aynı özellikleri taşıyan diğer tarım alanlarında faaliyet gösteren üreticiler için elde edilen sonuçlar, alternatif bir çözüm olma niteliğinde olacaktır. Bu gibi ilerleyen biyoteknolojik teknikler sayesinde, mevcut toprak şartlarına uygun bitki seçmek yerine, bitki için optimum olmayan şartlarda da maksimum seviyede verim ve etkinlik gösteren çeşitlerin yetiştirilmesi mümkün kılınabilmiştir.

5. SONUÇ

F₂, F₃ popülasyonları ve ebeveynler için 1-5 skalasına göre noksanlık simptomları ile bitki boyları, toplam yaş ve kuru ağırlıkları, kök yaş ve kuru ağırlıkları, gövde yaş ve kuru ağırlıklarının arasındaki korelasyonlar hesaplanmıştır. Buna göre en fazla korelasyon değeri toplam kuru ağırlık ($r=-0.76$) ile elde edilmiştir. Çinko destekli ve çinko noksan ortamlar arasındaki gerçek farkın belirlenebilmesi için F₃ popülasyonu ile toplam kök, gövde, yaprak ve toplam çinko içeriği ve kuru madde ile yapılan hesaplamalara başvurulmuştur. Yapılan bu çalışmada en yüksek korelasyon yaprak kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği ile toplam kuru madde ağırlığı bakımından çinko etkinliğine ait değerler arasında elde edilmiştir ($r=0.95$). Bu sonuç ise çinko etkinliğinin hesaplanmasında yalnızca yaprakların değerlendirmeye alınması ile istenen sonuca ulaşılabilceğini göstermektedir.

Genetik bağlantı gruplarının belirlenmesi için JoinMap 4.1 programı kullanılmış olup LOD skor 4 ile (8. kromozom için LOD skor 5 alındı) 16 adet bağlantı grubu elde edilmiştir. Bu 16 bağlantı grubunun elde edilmesinde 311 adet polimorfik markır kullanılmıştır. Bu 311 adet markırdan X^2 testinde önemli sapma gösterenler (segregation distortion gösterenler) elimine edilmiş ve geriye kalan 44 IPBS, 24 SRAP, 20 SSR ve 5 RAPD markırı ile genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Toplamda 93 polimorfik bant ile 717.4 cM harita uzunluğunda bir harita elde edilmiştir. Bu haritada iki markır arasındaki ortalama mesafe 7.7 cM olarak belirlenmiştir. Oluşturulan genetik bağlantı haritasındaki grupların belirlenmesi için Solgenomics.net'te sekans ve harita bilgileri yer alan *C. annuum* ve *C. frutescens* türlerinin melezlenmesi ile oluşturulan entegre biber haritasındaki 24 adet SSR markırı dikkate alınmıştır. SSR taşımayan, hangi kromozoma ait olduğu bilinmeyen gruplar ise X1, X2, X3, X4 ve X5 şeklinde adlandırılmışlardır. Bu grupların 1, 4 ve 7. kromozomlar ya da herhangi bir kromozomun parçası olması olasıdır. Bağlantı grupları oluşturulduktan sonra kantitatif özelliklerin yerlerinin belirlenmesi amacı ile ilgili QTL analizleri MapQTL 6 programında yapılmıştır. Bu analiz için çeşitli analizler sonucu hesaplanan F₃ popülasyonunda çinko etkinliğini belirlemeye yarayan verilerden yararlanılmıştır. MapQTL 6 programı ile interval mapping, MQM ve rMQM analizleri yapılmıştır. QTL'lerin bağlantı gruplarının üzerlerinde bulunma ihtimalleri LOD değerleri ile verilmiştir.

MapQTL 6 programı ile 12 özelliğe bağlı 36 adet QTL belirlenmiştir. Bu özellikler; F₃ popülasyonunda çinko noksanlık simptomu için 8.1, 10.2, ve 2. kromozomlarda 3 QTL, F₂ popülasyonunda çinko noksanlık simptomu için 8.1 ve X1. kromozomlarda 2 QTL, toplam kuru ağırlığa bağlı çinko etkinliği için 12. kromozomda 1 QTL, bitki boyuna bağlı çinko etkinliği için 8.1 ve 12. kromozomlarda 2 QTL, gövde kuru ağırlığına bağlı çinko etkinliği için 8.1 ve 12. kromozomlarda 2 QTL, yaprak çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği için X3, X4 ve 12. kromozomlarda 3 QTL, kök çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği için 8.1, 11 ve 12. kromozomlarda 3 QTL, toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği için 8.1 ve 12. kromozomlarda 2 QTL, yaprak/toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği için 2 ve 3. kromozomlarda 2 QTL, gövde+yaprak/toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği için 5 ve 11. kromozomlarda 2 QTL haritalanmıştır.

F3 popülasyonuna dair elde edilen skorlar ve toplam kuru madde ağırlığına bağlı hesaplanan çinko etkinliği ile aralarında $r=-0.76$ değerinde negatif fakat yüksek bir korelasyon elde edilirken toplam kuru madde açısından çinko etkinliği ve bitki boyu açısından çinko etkinliği için $r=0.89$ değerinde bir korelasyon elde edilmiştir. Toplam kuru madde ağırlığı açısından çinko etkinliği ve gövde kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği arasında pozitif ve oldukça yüksek bir korelasyon bulunmaktadır ($r=0.97$). Toplam kuru madde açısından çinko etkinliği ve toplam çinko içeriği bakımından etkinlik arasında $r=0.84$ değerinde bir korelasyon hesaplanmıştır. Toplam kuru madde ağırlığı ile toplam çinko konsantrasyonu açısından bakacak olursak düşük ve negatif bir korelasyon elde edilmiştir ($r=-0,06$). Yaprak kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği ile toplam kuru madde ağırlığı bakımından çinko etkinliğine ait değerler arasında pozitif ve yüksek bir korelasyon elde edilmiştir ($r=0.95$). Aynı zamanda yaprak kuru madde ağırlığına bağlı çinko etkinliği ve yaprak çinko içeriği arasında da sıkı bir ilişki saptanmıştır ($r=0.63$).

Polimorfizmi belirlenen 20 adet IPBS markırı ile yapılan genetik haritalama çalışmasında 3, 8.1, 11 ve X3. kromozomlarda, F₂ popülasyonunda çinko noksanlığı simptomsu, gövde kuru ağırlığına bağlı çinko etkinliği, yaprak çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği, kök çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği, toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği ve yaprak/toplam çinko içeriğine bağlı çinko etkinliği özelliklerine ait QTL'lerin yerleri tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile ilk defa IPBS (retrotranspozon) markırları biber genomunda haritalanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A. and CREGAN, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132 (4): 1131-1139.
- AKTAS, H., ABAK, K., OZTURK, L. and CAKMAK, I. 2006. The Effect of Zinc on Growth and Shoot Concentrations of Sodium and Potassium in Pepper Plants under Salinity Stress. *Turk J. Agric. For.*, 30: 407-412.
- ALLOWAY, B. J. 1990. Heavy metals in soils. Blackie & Son Ltd., London, pp 38-57.
- ALLOWAY, B.J. 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ Geochem. Health*, 31: 537–548.
- ANDEDEN, E.E., BALOCH, F.S., DERYA, M., KILIAN, B. and OZKAN, H. 2013. IPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual Cicer species. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22 (4): 453-466.
- ANURADHA, K., AGARWAL, S., RAO, Y.V., RAO, K.V., VIRAKTAMATH, B.C. and SARLA, N. 2012. Mapping QTLs and candidate genes for iron and zinc concentrations in unpolished rice of Madhukar× Swarna RILs. *Gene*, 508 (2): 233-240.
- ARCASOY, A. 2002. Çinko Eksikliği. *Ankara Talasemi Derneği Yayınları*, 2: 1-23.
- ARUMUGANATHAN, K. and EARLE, E.D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9: 208–218.
- BALOCH, F.S., ALSALEH, A., DE MIERA, L.E.S., HATIPOGLU, R., CIFTCI, V., KARAKOY, T. And OZKAN, H. 2015. DNA based iPBS-retrotransposon markers for investigating the population structure of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61: 244-252.
- BARAK, P. and HELMKE, P.A. 1993. The chemistry of zinc. In: Robson, A.D. (Ed) Zinc in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, pp. 1-14, Dordrecht, The Netherlands.
- BARBER, S.A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley and Sons, pp 62-75. New York City.
- BARBER, S.A. and SILBERBUSH, M. 1984. Plant root morphology and nutrient uptake. In: Barber, S.A. and Bouldin, R. Roots, Nutrients and Water Influx and Plant Growth. *American Society of Agronomy Special Publication*, 49: 65-88.
- BARCHI, L., BONNET, J., BOUDET, C., SIGNORET, P., NAGY, I., LANTERI, S., PALLOIX, P. and LEFEBVRE, V. 2007. A high-resolution, intraspecific

- linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping. *Genome*, 50 (1): 51-60.
- BARNETTE, R. M. and WARNER, J. D. 1935. A Response Of Chlorotic Corn Plants To The Application Of Zinc Sulfate To The Soil. *Soil Science*, 39 (2): 145-160.
- BAYRAKTAR, K. 1970. Sebze Yetiştiriciliği. Cilt II. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 112 s.
- BELGEMEN, T. ve AKAR, N. 2004. Çinkonun Yaşamsal Fonksiyonları ve Çinko Metabolizması ile İlişkili Genler. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 57 (03): 52-53.
- BELLETTI, P., MARZACHI, C. and LANTERI, S. 1998. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Plant Syst. Evol.*, 209: 85–91.
- BEN CHAIM, A., PARAN, I., GRUBE, R.C., JAHN, M., WIJK, V.R., PELEMAN, J. 2001. QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 102 (6-7): 1016-1028.
- BLAIR, M.W., MEDINA, J. I., CAROLINA, A., RENGIFO, J., BEEBE, S.E., MACHADO, G. and GRAHAM, R. 2010. QTL for seed iron and zinc concentration and content in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1059–1070.
- BLAIR, M.W., ASTUDILLO, C., RENGIFO, J., BEEBE, S.E. and GRAHAM, R. 2011. QTL analyses for seed iron and zinc concentrations in an intra-genepool population of Andean common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 122 (3): 511-521.
- BROADLEY, M.R., LOCHLAINN, S.O., HAMMOND, J.P., BOWEN, H.C., ÇAKMAK, I., EKER, S., ERDEM, H., KING, G. J. and WHITE, P.J. 2010. Shoot zinc (Zn) concentration varies widely within Brassica oleracea L. and is affected by soil Zn and phosphorus (P) levels. *Journal Of Horticultural Science and Biotechnology*, 85 (5): 375-380.
- BURNELL, J.N., GIBBS, M.J. and MASON, J.G. 1990. Spinach chloroplastic carbonic anhydrase nucleotide sequence analysis of cDNA. *Plant Physiology*, 92 (1): 37-40.
- ÇAKMAK, I., GULUT, K.Y., MARSCHNER, H. and GRAHAM, R.D. 1994. Effect of zinc and iron deficiency on phytosiderophore release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 17: 1-17.
- ÇAKMAK I, YILMAZ A, KALAYCI M, EKİZ H, TORUN B, ERENOĞLU B, BRAUN H.J. 1996. Zinc deficiency as a critical problem in wheat production in Central Anatolia. *Plant and Soil*, 180: 165-172.

- CAKMAK, I., SARY, N., MARSCHNER, H., EKIZ, H., KALAYCY, M., YILMAZ, A. and BRAUN, H.J. 1996. Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant and Soil*, 180: 183-189.
- CAKMAK, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *The New Phytologist*, 146: 185-205.
- CAKMAK, I. 2004. Identification and correction of widespread zinc deficiency in Turkey a success story (a NATO-Science for Stability Project). *Proceedings of the International Fertiliser Society*, 552: 1-26.
- CAKMAK, I. and MARSCHNER, H. 1988. Increase in membrane permeability and exudation in roots of zinc deficient plants. *Journal of Plant Physiology*, 132: 356-361.
- CAKMAK, I., EKIZ, H., YILMAZ, A., TORUN, B., KOLELI, N., GULTEKIN, I., ALKAN, A. and EKER, S. 1997. Differential response of rye, triticale, bread and durum wheats to zinc deficiency in calcareous soils. *Plant and Soil*, 188: 1-10.
- CAKMAK, I., TORUN, B., ERENOGLU, B., OZTURK, L., MARSCHNER, H., KALAYCI, M., EKIZ, H. and YILMAZ, A. 1998. Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytica*, 100: 349-357.
- CARROLL, M.D. and LONERAGAN, J.F. 1969. Response of plant species to concentrations of zinc in solution. II. Rates of zinc absorption and their relation to growth. *Crop and Pasture Science*, 20 (3): 457-463.
- CICHY, K.A., FORSTER, S., GRAFTON, K.F. and HOSFIELD, G.L. 2005. Inheritance of seed zinc accumulation in navy bean. *Crop Science*, 45: 864-870.
- CICHY, K.A., CALDAS, G.V., SNAPP, S.S. and BLAIR, M.W. 2009. QTL analysis of seed iron, zinc, and phosphorus levels in an Andean bean population. *Crop Science*, 49 (5): 1742-1750.
- COLEMAN, E.J. 1992. Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 897-946.
- COSTA, F., R., PEREIRA, T.N. S., VITÓRIA, A.P., DE CAMPOS, K.P., RODRIGUES, R., DA SILVA, D.H., and PEREIRA, M.G. 2005. Genetic diversity among Capsicum accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6: 18-23.
- COURTNEY, M. 2007. Genotypic Variability and Inheritance of Iron and Zinc in Sweetpotato. MS Thesis, Louisiana State Univ., Baton Rouge, 58 p.

- DHALIWAL, M.S., JINDAL, S.K., GAIKWAD, A.K. and SINGH, K. 2013. Genetic Diversity Analysis and DNA Fingerprinting of Elite Chilli Pepper Lines Using SSR Markers. *International Journal of Vegetable Science*, 19 (3): 207-216.
- DONG, Y., OGAWA, T., LIN, D., KOH, H.J., KAMIUNTEN, H., MATSUO, M. and CHENG, S. 2006. Molecular mapping of quantitative trait loci for zinc toxicity tolerance in rice seedling (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research*, 95 (2): 420-425.
- EKEN, M. 2007. Farklı Biber (*Capsicum Annuum* L.) Tiplerinde Çinko (Zn) Etkinliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 61 s.
- ENG, B.H., GUERINOT, M.L., EIDE, D. and SAIER JR, M.H. 1998. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *The Journal of Membrane Biology*, 166 (1): 1-7.
- ERDAL, İ. ve KOCAKAYA, Z. 2003. Bazı Buğday Çeşitlerinin Farklı Gelişim Dönemlerindeki Çinko-Fosfor Etkileşimi. Süleyman Demirel Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (1): 9-14.
- ERENOGLU, B., ÇAKMAK, I., ROMHELD, V., DERICI, R. and RENGEL, Z. 1999. Uptake of zinc by rye, bread wheat and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. *Plant and Soil*, 209: 245-252.
- EYUPOGLU, G., KURUCU, N., TALAZ, S. and CANISAG, U. 1994. Status of plant available micronutrients in Turkish soils (in Turkish). In: Annual Report of Soil and Fertilizer Research Institute, No: 118 (unpublished), Ankara.
- EYÜPOĞLU, F., KURUCU, N. ve TALAZ, S. 1998. Türkiye Topraklarının Yarayışlı Bazı Mikro Elementler (Fe, Cu, Zn, Mn) Bakımından Genel Durumu, Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, Ankara, 72 s.
- FAGERIA, N.K. and STONE, L. F. 2006. Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1327-1356.
- FAO. Agricultural Statistics. <http://faostat3.fao.org>. [Son erişim tarihi: 15.11.2015]
- GELIN, J.P., FORSTER, S., GRAFTON, K.F., MCCLEAN, P.E. and KOOAS-CIFUENTES, G.A. 2007. Analysis of seed zinc and other minerals in a recombinant inbred population of navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Science*, 47 (4): 1361-1366.
- GENC, Y., VERBYLA, A.P., TORUN, A.A., ÇAKMAK, I., WILLSMORE, K., WALLWORK, H. and MCDONALD, G.K. 2009. Quantitative trait loci analysis of zinc efficiency and grain zinc concentration in wheat using whole genome average interval mapping. *Plant Soil*, 314: 49-66.

- GHISLAIN, M., ZHANG, D., FAJARDO, D., HUAMÁN, Z. and HIJMANS, R.J. 1999. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46 (6): 547-555.
- GRAHAM, R.D., ASCHER, J.S. and HYNES, S.C. 1992. Selecting zinc-efficient cereal genotypes for soils of low zinc status. *Plant and Soil*, 146: 241-250.
- GROTZ, N., FOX, T., CONNOLLY, E., PARK, W., GUERINOT, M.L. and EID, D. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Plant Biology*, 95 (12): 7220-7224.
- GÜLŞEN, O. and MUTLU, N. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alatarım*, 4 (2): 27-37.
- GÜNAY, A. 1981. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt II., Çağ Matbaası, Ankara, 182 s.
- GÜNEŞ, A., ALPASLAN, M. ve İNAL, A. 2000. Bitki besleme ve gübreleme. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, ss. 579-1514, Ankara.
- HACISALİHOĞLU, G. and KOCHIAN, L.V. 2003. How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants. *New Phytologist*, 159: 341-350.
- HE, F., YANG, Z., ZHANG, Z., WANG, G. and WANG, J. 2007. Genetic diversity analysis of potato germplasm by SRAP makers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6: 017.
- HODGSON, J.F., LINDSAY, W.L. and TRIERWEILER, J.F. 1966. Micronutrient cation complexing in soil solution: II. Complexing of zinc and copper in displaced solution from calcareous soils. *Soil Science Society of America Journal*, 30 (6): 723-726.
- JOHNSON, A.D. and SIMONS, J.G. 1979. Diagnostic indices of zinc deficiency in tropical legumes. *Journal of Plant Nutrition*, 1 (2): 123-149.
- KAÇAR, B. ve KATKAT, A.V. 1998. Bitki Besleme. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları: 127, Ders Kitabı, Bursa, 312 s.
- KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMÝKAL, P. and SCHULMAN, A.H. 2010. IPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121 (8): 1419-1430.
- KLUG, W.S. and CUMMINGS, M.R. 2005. Essentials of genetics. Pearson Education, pp 112-115, Upper Saddle River, New Jersey.

- KORSHUNOVA, Y.O., EIDE, D., CLARK, W.G., GUERINOT, M.L. and PAKRASI, H.B. 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology*, 40 (1): 37-44.
- KOTHARI, S.K., MARSCHNER, H. and ROMHELD, V. 1991. Contribution of VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown calcareous soil. *Plant and Soil*, 131: 177-185.
- LEE, H-R., BAE, I-H., PARK, S-W, KIM, H-J, MIN, W-K, HAN, J-H, KIM, K-T. and KIM, B-D. 2009. Construction of an Integrated Pepper Map Using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC End Sequences. *Molecules and Cells*, 27 (1): 21-37.
- LEE, J.M., NAHM, S.H., KIM, Y.M. and KIM, B.D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (4): 619-627.
- LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., CARANTA, C. and POCHARD, E. 1995. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome*, 38 (1): 112-121.
- LI, G. and QUIROS, C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (2-3): 455-461.
- LI, H., CHEN, H., ZHUANG, T. and CHEN, J. 2010. Analysis of genetic variation in eggplant and related *Solanum* species using sequence-related amplified polymorphism markers. *Scientia Horticulturae*, 125 (1): 19-24.
- LIVINGSTONE, K. D., LACKNEY, V. K., BLAETH, J. R., VAN, W. R. and JAHN, M. K. 1999. Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of structure in the Solanaceae. *Genetics*, 152: 1183-1202.
- LONERGAN, P. F., PALLOTTA, M.A., LORIMER, M., PAULL, J. G., BARKER, S. J. and GRAHAM, R. D. 2009. Multiple genetic loci for zinc uptake and distribution in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist*, 184: 168–179.
- LUCAS, R.E. and KNEZEK, B.D. 1972. Climatic and soil conditions promoting micronutrient deficiencies in plants. *Micronutrients in Agriculture*, 12: 265-288.
- MAJEAU, N., ARNOLDO, M. and COLEMAN, J.R. 1994. Modification of carbonic anhydrase activity by antisense and over-expression constructs in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 25 (3): 377-385.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, 2nd edition, London, 126 p.

- MARSCHNER, H. and SCHROPP, A. 1977. Comparative studies on the sensitivity of six rootstock varieties of grapevine to phosphate-induced Zn deficiency. *Vitis-Berichte ueber Rebenforschung mit Dokumentation der Weinbauforschung*, 16 (2): 79-88.
- MCGREGOR, C. E., GREYLING, M. M. and WARNICH, L. 2000. The use of simple sequence repeats (SSRs) to identify commercially important potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 17 (4): 177-179.
- MEHMOOD, A., JASKANI, M.J., AHMAD, S. and AHMAD, R. 2013. Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by IPBS primers. *Journal of Agricultural Science*, 50 (4): 591-597.
- MENGEL, K. and KIRKBY, E.A., 1982. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Switzerland, pp 152-168.
- MILES, C. and WAYNE, M. 2008. Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education*, 1 (1): 208.
- ODABASOGLU, F. and KUFREVIOGLU, Ö. 2001. Effects of the treating with pesticides and plant hormones on catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Bulletin Pure and Applied Sciences*, 20 (2): 79-88.
- OPPONG, L.A., QUAIN, M.D., OPPONG, A., DOKU, H.A., AGYEMANG, A. and OFFEI-BONSU, E. 2015. Molecular Characterization of *Solanum* Species Using EST-SSRs and Analysis of Their Zinc and Iron Contents. *American Journal of Experimental Agriculture*, 6 (1): 30.
- ORTAS, I. 2012. Do maize and pepper plants depend on mycorrhizae in terms of phosphorus and zinc uptake?. *Journal of Plant Nutrition*, 35 (11): 1639-1656.
- O'SULLIVAN, M. 1970. Aldolase activity in plants as an indicator of zinc deficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21 (12): 607-609.
- OZTURK, L., YAZICI, M. A., YUCEL, C., TORUN, A., CEKIC, C., BAGCI, A. and CAKMAK, I. 2006. Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Physiologia Plantarum*, 128 (1): 144-152.
- PELEG, Z., CAKMAK, I., OZTURK, L., YAZICI, A., JUN, Y., BUDAK, H., KOROL, A.B., FAHIMA, T. and SARANGA, Y. 2009. Quantitative trait loci conferring grain mineral nutrient concentrations in durum wheat 3 wild emmer wheat RIL population *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 353-369.

- PINAR, H. 2013. Biberde çinko etkinliğini kontrol eden genlerin kalıtımının belirlenmesi ve ilişkili moleküler markırların geliştirilmesi. Doktora Tezi (yayınlanmamış), Çukurova Üniversitesi, Adana, 113 s.
- PORTISA, E., NERVOB, G., CAVALLANTIB, F., BARCHIA, L. and LANTERI, S. 2006. Multivariate Analysis of Genetic Relationships between Italian Pepper *Landraces*. 46 (6): 2517-2525.
- PRENTICE, T., BEAGLEHOLE, R. and IRWIN, A. 2004. The World Health Report 2004: Changing History. <http://www.who.int/>. [Son erişim tarihi: 10.10.2015]
- RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9 (8): 275-280.
- RAMESH, S.A., SHIN, R., EIDE, D.J. and SCHACHTMAN, D.P. 2003. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. *Plant Physiology*, 133 (1): 126-134.
- RAO G.U., BEN CHAIM, A., BOROVSKY, Y. and PARAN, I. 2003. Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (8): 1457-1466.
- REGO, E.R., REGO, M.M. and FARIAS-FILHO, L.P. 2010. Genetic diversity in pepper (*Capsicum* spp.) by RAPD marker. In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): III International Symposium, pp. 341-347, Lisbon.
- RENGEL, Z. and GRAHAM, R.D. 1995. Importance of seed Zn content for wheat growth on Zn-deficient soil. *Plant and Soil*, 173 (2): 259-266.
- ROOSENS, N.H.C.J., WILLEMS, G., GODÉ, C., COURSEAUX, A., LAPRADE, P.S. 2008. The use of comparative genome analysis and syntenic relationships allows extrapolating the position of Zn tolerance QTL regions from *Arabidopsis halleri* into *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, 306: 105–116.
- SADEGHZADEH, B. 2008. Mapping of Chromosome Regions Associated with Seed Zinc Accumulation in Barley. PhD Thesis, The University of Western Australia, 134 p.
- SCHLOTTERER, C. and TAUTZ, D. 1993. Slippage synthesis of microsatellites. *Nucleic Acids Res.*, 20: 211-215.
- SHARMA, C.P., SHARMA, P.N., BISHT, S.S. and NAUTIYAL, B.D. 1982. Zinc deficiency induces changes in cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata). Proceedings of the Ninth international Plant Nutrition Colloquium, Commonwealth Agricultural Bureau, pp. 601-606, Warwick, England.

- SHI, R., LI, H., TONG, Y., JING, R., ZHANG, F. and ZOU, C. 2008. Identification of quantitative trait locus of zinc and phosphorus density in wheat (*Triticum aestivum L.*) grain. *Plant Soil*, 306: 95–104.
- SHUMAN, L.M. 1977. Adsorption of Zn by Fe and Al hydrous oxides as influenced by aging and pH. *Soil Science Society of America Journal*, 41 (4): 703-706.
- SILLANPÄÄ, M. 1990. Micronutrient assessment at the country level: an international study. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Soils Bulletin: 63 (unpublished), Rome.
- SOMMER, A.L. AND LIPMAN, C.B. 1926. Evidence on The Indispensable Nature of Zinc and Boron For Higher Green Plants. *Plant Physiol.*, 1 (3): 231–249.
- SPEHAR, C.R. 1995. Diallel Analysis for Mineral Element Absorption in Tropical Adapted Soybeans (*Glycine-Max (L) Merrill*). *Theoretical and Applied Genetics*, 90 (5): 707-713.
- SUGITA, T., SEMI, Y., SAWADA, H., UTOYAMA, Y., HOSOMI, Y., YOSHIMOTO, E. and OHYAMA, A. 2013. Development of simple sequence repeat markers and construction of a high-density linkage map of *Capsicum annum*. *Molecular Breeding*, 31 (4): 909-920.
- STUKENHOLTZ, D.D., OLSEN, R.J., GOGAN, G. and OLSON, R.A. 1966. On the mechanism of phosphorus-zinc interaction in corn nutrition. *Soil Science Society of America Journal*, 30 (6): 759-763.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17 (16): 6463-6471.
- TIWARI, V.K., RAWAT, N., CHHUNEJA, P., NEELAM, K., AGGARWAL, R., RANDHAWA, G.S. and SINGH, K. 2009. Mapping of quantitative trait loci for grain iron and zinc concentration in diploid A genome wheat. *Journal of Heredity*, 100 (6): 771–776.
- TREHAN, S.P. and SEKHON, G.S. 1977. Effect of clay, organic matter and CaCO₃ content on zinc adsorption by soils. *Plant and Soil*, 46 (2): 329-336.
- TORUN, B., ÇAKMAK, I., EKER, S., YAZICI, A., ÖZKUTLU, F., ERDEM, H., TOLAY, I., ALKAN TORUN, A., ÖZTÜRK, L., KARANLIK DURAN, S., TOZ, S. ve TEK, A. 2005. Çukurova Bölgesi'ndeki Turunçgil Bahçelerinin Potasyum ve Diğer Mineral Elementler Bakımından Beslenme Durumu. Tarımda Potasyumun Yeri ve Önemi Çalıştayı, ss. 62-73, 3-4 Ekim 2005, Eskişehir.
- TREEBY, M., MARSCHNER, H. and RÖMHELD, V. 1989. Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant and Soil*, 114(2): 217-226.

- VAKLINOVA, S.G., GOUSHTINA, L.M. and LAZOVA, G.N. 1984. The Role of Carbonic-Anhydrase in The Electron-Transport During Photosynthesis. *Dokladi Na Bolgarskata Akademiya Na Naukite*, 37 (5): 677-680.
- VALLEE, B.L. and AULD, D.S. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29 (24): 5647-5659.
- VALLEE, B.L. and FALCHUK, K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73: 79-118.
- VALLEE, B.L. and GALDES, A. 1984. The metallobiochemistry of zinc enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 56: 283-430.
- VILLORDON, A.Q. and LABONTE, D.R. 1995. Variation in Randomly Amplified DNA Markers and Storage Root Yield in Jewel'Sweetpotato Clones. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120 (5): 734-740.
- WANG, J., KAUR S., COGAN, N., DOBROWOLSKI, M.P., SALISBURY, P.A., BURTON, W.A., BAILLIE, R., HAND, M., HOPKINS, C., FORSTER, J.W., SMITH, K.F. and SPANGENBERG, G. 2009. Assessment of genetic diversity in Australian canola (*Brassica napus L.*) cultivars using SSR markers. *Crop Pasture Sci.*, 60: 1193-1201.
- WELCH, R.M., WEBB, M.J. and LONERAGAN, J.F. 1982. Zinc in membrane function and its role in phosphorus toxicity. In Plant nutrition 1982: proceedings of the ninth International Plant Nutrition Colloquium, pp 19-20, August 22-27, Warwick University, England.
- WHITE, J.G. and ZASOSKI, R.J. 1999. Mapping soil micronutrients. *Field Crops Research*, 60 (1): 11-26.
- WILLEMS, G., DRAGER, D.B., COURBOT, M., GODE, C., VERBRUGGEN, N. and SAUMITOU-LAPRADE, P. 2007. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri ssp. halleri* (*Brassicaceae*): an analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, 176: 659-674.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- WISSUWA, M., ISMAIL, A.M. and YANAGIHARA, S. 2006. Effects of Zinc Deficiency on Rice Growth and Genetic Factors Contributing to Tolerance. *Plant Physiology*, 142: 731-741.
- WRIGHT, S. 1968. Evolution and the genetics of populations. *Genetic and Biométrie Foundations*. 1: 469.

- WU, F., EANNETTA, N.T., XU, Y., DURRETT, R., MAZOUREK, M., JAHN, M.M. and TANKSLEY, S.D. 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. <https://solgenomics.net/Maps>. [Son erişim tarihi: 09.11.20015]
- XU, X.S., LIU, Z.Q., LIN, X.D., MOU, S.L., GUAN, D.Y. and HE, S.L. 2011. Genetic diversity and relationship analysis of pepper germplasm resources based on phenotype traits and SRAP molecular markers. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 1: 009.
- YI, G., LEE, M.J., LEE, S., CHOI, D. and KIM, B.D. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (1): 113-130.
- YU, K., PARK, S.J. and POYSA, V. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breeding*, 119 (5): 411-415.
- ZHANG, F.S., ROMHELD, V. and MARSCHNER, H. 1989. Effect of zinc deficiency in wheat on the release of zinc and iron mobilizing root exudates. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 152 (2): 205-210.
- ZHANG, F.S., ROMHELD, V. and MARSCHNER, H. 1991. Diurnal rhythm of release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron-deficient wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*, 37: 671-678.
- ZHAO, H. and EIDE, D. 1996. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (6): 2454-2458.

ÖZGEÇMİŞ



Cansu ŞİMŞEK 1991 yılında Antalya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2009 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü'nden 2013 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Şubat 2014-Aralık 2015 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.