T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

MAS (MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMIYLA SELEKSİYON) VE ANTER KÜLTÜRÜ KULLANILARAK CIRGALAN BİBERİNE *PHYTOPHTHORA CAPSİCİ* DAYANIMININ AKTARILMASI

Hazırlayan
Nur Selin ÇABUK

Danışman
Doç. Dr. Hasan PINAR

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2020
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

MAS (MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMIYLA SELEKSİYON) VE ANTER KÜLTÜRÜ KULLANILARAK CIRGALAN BİBERİNE *PHYTOPHTHORA CAPSİCİ* DAYANIMIN AKTARILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Nur Selin ÇABUK

Danışman
Doç. Dr. Hasan PINAR

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından FYL-2018-7952 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Nur Selin ÇABUK

İmza

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"MAS (Moleküler Markör Yardımıyla Seleksiyon) ve Anter Kültürü Kullanılarak Cırgalan Biberine *Phytophthora capsici* Dayanımın Aktarılması" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan	Danışman
Nur Selin ÇABUK	Doç. Dr. Hasan PINAR

Bahçe Bitkileri ABD Başkanı

Prof. Dr. Aydın UZUN

Doç. Dr. Hasan PINAR danışmanlığında **Nur Selin ÇABUK** tarafından hazırlanan **"MAS (Moleküler Markör Yardımıyla Seleksiyon) ve Anter Kültürü Kullanılarak Cırgalan Biberine *Phytophthora capsici* Dayanımının Aktarılması"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bahçe Bitkileri** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../2020

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Hasan PINAR .....

Üye : Prof. Dr. Nedim MUTLU .....

Üye : Dr. Öğr. Üy. Fatih HANCI .....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...…tarih ve ……..…sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın her aşamasında her türlü desteğiyle yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hasan PINAR'a en içten teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar ve sera çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Engin KAYMAZ, Merve YİĞİT, Feyza Nur DERYA, Pembe SABAN ve Hasan KEKEÇ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimimin her döneminde hep yanımda olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ÇABUK ailesine de teşekkürü bir borç bilirim.

Nur Selin ÇABUK

Haziran 2020, KAYSERİ

MAS (MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMIYLA SELEKSİYON) VE ANTER KÜLTÜRÜ KULLANILARAK CIRGALAN BİBERİNE *PHYTOPHTHORA CAPSİCİ* DAYANIMIN AKTARILMASI

Nur Selin ÇABUK

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2020
Danışman: Doç. Dr. Hasan PINAR

ÖZET

Türkiye, üretim alanı ve kaliteli biber üretimi açısından büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen, bitki hastalıkları nedeniyle biberde verim düşüktür. Biberde *Phytophthora capsici*'ye karşı direnç, major ve minor QTL tarafından kontrol edilir. Bu çalışmada özellikle Kayseri bölgesine adapte olmuş Cırgalan biberine *Phytophthora capsici* Leon. dayanımın aktarılması amaçlanmıştır. Çalışmada ana ebeveyn olarak Cırgalan biber genotipi kullanılmıştır. Baba ebeveyn olarak ise fitoftoraya dayanıklı olan P1 genotipi kullanılmıştır. Öncelikle Cırgalan biberi ve P1 genotipi melezlenerek heterozigot F1 bireyler elde eldilmiştir. Ardından Cırgalan biberi x F1 melezlemesi yapılarak GM1F1 bireyleri elde edilmiştir. Fitoftoraya dayanım bakımından majör QTL için moleküler markör ile testleme yapılmış ve dayanıklı olarak belirlenenler seraya aktarılıp tekrar Cırgalan biberine geri melezleme yapılmıştır ve GM2F1 bitkileri elde edilmiştir. GM2F1 bitkilerinden dayanıklı olarak belirilenen bitkiler kendilenerek GM2F2 elde edilmiştir. Elde edilen bitkilerde tekrar fitoftoraya dayanıklılık analizi yapılıp dayanıklı olarak belirlenenler seraya aktarılmıştır ve anter kültürü tekniği kullanılarak saf biber hatları elde edilmiştir. Ardından elde edilen saf biber hatlarında verimlilik, toz biber sanayisi açısından önemli meyve özellikleri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre fitoftoraya dayanımı moleküler markörlerle belirlenen 25 adet Cırgalan saf biber hattı elde edilmiştir. Söz konusu biber hatları standart tohumla Cırgalan biberi üretiminde ve hibrit çeşit ıslahında kullanılabilecek niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Biber, Fitoftora, Islah

TRANSFER OF *PHYTOPHTHORA CAPSICI* RESISTANCE TO CIRGALAN PEPPER BY USING MAS (MARKOR ASSISTED SELECTION) AND ANTHER CULTURE

Nur Selin CABUK

University of Erciyes, Science Institute
Master Thesis, June 2020
Advisor: Assoc. Prof. Hasan PINAR

ABSTRACT

Although Turkey has big potential with regard to production area and quality pepper production, equated yield is low because of plant diseases. The resistance against *Phytophthora capsici* is control by one major and minor QTLs. In this study, we aimed to transfer disease resistance to pepper genotypes which are grown in Central Anatolia region. Crossing was carried out between Cırgalan pepper and P1 (resistant *to Phytophthora capsici* Leon) and backcrossed to Cırgalan pepper genotype to obtain BC1F1. The BC1F1 population was screened with the molecular marker linked to the major QTL. Resistance plants were backcrossed to Cırgalan pepper genotype to obtain BC2F1 plants that were tested again using the molecular markers and resistant plants selfed to obtain BC2F2 generation. After testing, anthers of resistant plants were has wasted to again doublehaploid plants. As a result, 25 DH industrial pepper lines with resistance against *Phytophthora capsici* were obtained. These lines will be usefull for breeding against *Phytophthora capsici* Leon.

Key Words: Breeding, Phytophthora, Pepper

İÇİNDEKİLER

MAS (MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMIYLA SELEKSİYON) VE ANTER KÜLTÜRÜ KULLANILARAK CIRGALAN BİBERİNE *PHYTOPHTHORA CAPSİCİ* DAYANIMIN AKTARILMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
KABUL ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ix
ÇİZELGELER LİSTESİ xi
ŞEKİLLER LİSTESİ xii

GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

1.1. Biber ile İlgili Genel Bilgiler 7
1.2. Biberde *Phytophthora capsici* L. Hastalığı ve Bazı Önemli Hastalık ve Zararlılar ile İlgili Çalışmalar 10
1.3. Biberde *Phytophthora capsici* L. Hastalığına Dayanımın Kazandırılmasında MAS (Moleküler Yardımıyla Seleksiyon) Yöntemiyle İlgili Çalışmalar 15
1.4. MAS'ın Islahta Kullanımı 12
1.5. Biberde Anter Kültürü ile İlgili Çalışmalar 20
1.6. Anter Kültürünün Islahta Kullanımı 23

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal 25

2.2. Yöntem 26

2.2.1. Fitoftoraya dayanıklı biber geotiplerinin geliştirilmesi 26

2.2.2. DNA İzolasyonu ve Markör Analizi 29

2.2.3. Anter Kültürü çalışmaları 32

2.2.4. Uygun Anterlerin Seçimi 32

2.2.5. Besin Ortamları 33

2.2.6. Elde edilen saf biber hatlarının bitki gelişimi, verim ve toz biber olarak kullanım bakımından bazı meyve kalite özelliklerinin belirlenmesi 34

3. BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Geriye Melezleme ve MAS (Moleküler Yardımıyla Seleksiyon) Yoluyla Cırgalan Biberine *Phytphthora capsici* Leon. Hastalığına Dayanım Aktarılması 35

3.2. Anter Kültürü Kullanılarak *Phytphthora capsici* Leon. Hastalığına Dayanım Cırgalan Biberi Saf Hatlarının Geliştirilmesi 39

3.3. Elde Edilen Saf Biber Hatlarının Bitki Gelişimi, Verim ve Toz Biber Olarak Kullanım Bakımından Bazı Meyve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi 41

4. BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER 46

KAYNAKÇA 48

ÖZGEÇMİŞ 57

KISALTMALAR

2,4D : Diklorofenoksi Asetik Asit

AFLP :Amplified Fragment Length Polimorphisms

$AGNO_3$:Gümüş nitrat

BAP :Benzil Amino Pürin

BSA : Bulked segregant analysis

CAPS :Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

cm :Santimetre

cm^2 :Santimetre kare

DH :Double Habloid

dk :Dakika

FAO :Food and Agriculture Organization

h :Saat

HCl :Hidrojen klorür

HSK :Homoserin kinaz

kg :Kilogram

KOH :Potasyum hidroksit

l :Litre

MAS : Marker asisted selection

mg :Miligram

ml :Mililitre

mM :Milimolar

NAA :Naftalin Asetik Asit

^oC :Santigrat Derece

PCR :Polymerase Chain Reaction

QTL :Quantitative trait locus

RAPD :Random Amplified Polimorphic DNAs

RIL :Rekombinant inbred line

rpm :Revolutions per Minute

SCAR: :Sequence Characterized Amplified Region

SLAF-seg :Specify Larged Trailer lineup

SNP :Single Nucleotid Polymorphism

SRAP :Sequence Related Amplified Polymorphism

SSR :Simple Sequense Repeats

µl :Mikrolitre

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında *Phytphthora capsici* Leon. hastalığına dayanım belirlenmesi amacıyla OpD04 markörü kullanılarak yapılan testleme sonucu elde edilen veriler 37

Çizelge 3.2. Ebeveyn ve melez biber genotiplerinin fitoftora dayanımları 38

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan genotiplere ait anter kültürü bulguları..... 40

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan saf biber hatlarının meyve yapısı ile ilgili bulgular 42

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan saf biber hatlarının meyve kalite özellikleri ile ilgili bulgular 43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kayseri bölgesine ait Cırgalan biberi.....25
Şekil 2.2. *Phytophthora capsici* hastalığına dayanıklılık gösteren olan P1 genotipi.....25
Şekil 2.3. Çalışma planı 26
Şekil 2.4. Cırgalan biberlerine uygulanan melezleme işlemi.....27
Şekil 2.5. Melezlemelerle elde edilen biberler (GM1F1) 27
Şekil 2.6. Dayanıklılık gösteren GM1F1 biberlerinin tekrar yetiştirilmesi 28
Şekil 2.7. Dayanıklılık gösteren Cırgalan biber genotipleri.....28
Şekil 2.8. GM1F1 x P1 melezlemeleri yapılarak elde edilen GM2F1 biberleri 29
Şekil 2.9. DNA izolasyonu 31
Şekil 2.10. PCR görüntüleme cihazı 31
Şekil 2.11. Biber anterlerinin kültüre alınması 32
Şekil 2.12. Uygun anter büyüklüğü 32
Şekil 2.13. Besi ortamlarının hazırlanışı.....33
Şekil 3.1. Ebeveynlerin ve GM2F2 populasyonuna ait genotiplerin jel görüntüsü 36
Şekil 3.2. Ebeveyn ve melez biber hatlarının dayanıklılık jel görüntüsü.....38
Şekil 3.3. Söz konusu genotiplerin GM2F1 jel görüntüsü.....38
Şekil 3.4. Söz konusu genotiplerin GM2F1 jel görüntüsü.....39
Şekil 3.5. Anterlerin embriyoya dönüşümü ve haploid bitkilerin aklimatizasyonu 41
Şekil 3.6. Biber genotiplerine ait meyveler ……44

GİRİŞ

Türkiye dünyada önemli gen merkezlerinden biri olup genetik çeşitlilik ve bitki gen kaynakları bakımından en önemli ülkelerden birisidir. *Capsicum annuum L*. türü için Anadolu'nun mikro gen merkezi olduğu belirtilmiştir (Küçük, 2001). Genetik kaynaklar ise bitki ıslah çalışmalarında yeni çeşitlerin geliştirilebilmesi ve genetik varyasyonun oluşturulabilmesi için önemli gen havuzlarıdır (Bliss, 1981). Islah programlarının ana materyallerini oluşturan ve geniş oranda varyasyon gösteren yerel çeşitler yetiştirildikleri farklı ekolojilere olan adaptasyon yetenekleri, hastalık ve zararlılara dayanıklılıkları ve birçok istenen kalite özelliğine sahip olmaları nedeniyle bitki genetik kaynakları koleksiyonları içerisinde önemli bir yer tutmaktadır ve ıslah çalışmalarının da eşsiz kaynaklarıdır (Küçük vd., 2003). Günümüzde birçok yerel çeşidin yerini hibrit ve transgenik çeşitler almaya başlamıştır (Morico vd., 1998). Bu durum, zamanla genetik erozyonun oluşumuna neden olmaya başlamıştır (Tan, 1998). Bu nedenle, ülkemizin mevcut zengin biyolojik çeşitliliğini korumak için mevcut biber gen kaynaklarımızın toplanması, morfolojik özelliklerinin belirlenmesi, ıslah programlarına alınarak yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve toplanan materyalin gen bankalarında muhafaza edilmesi büyük önem taşımaktadır (Anonymous, 2004; Balkaya ve Yanmaz, 2001). Ülkemizde bu amaca yönelik olarak değişik araştırıcılar tarafından farklı lokasyonlarda biber gen kaynakları toplama ve değerlendirmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Sürmeli ve Erdoğan, 1985; İnan, 1988; Ekiz ve Kemer, 1995; Akıncı ve Akıncı, 2004). Ayrıca Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesindeki Genetik Kaynaklar bölümü tarafından da, ülkemizin birçok bölgesinde *Capsicum* cinsine bağlı tür ve alt türlere ait gen kaynakları toplanmıştır (Küçük, 2001).

Türkiye'de kırmızı biber üretimi yapan iller ve bu illerin biber üretim değerleri incelendiğinde en fazla üretim alanı ve üretim miktarının Gaziantep ilinde bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu ili Şanlıurfa ve Kahramanmaraş izlemektedir. Kayseri ise söz

konusu illeri takip etmektedir. Kırmızı biber ihracat değerleri 2012–2016 yılları arasında 69,722 ton ile 97,312 ton arasında değişim göstermiştir. Türkiye 2012 yılında 69,722 ton kırmızı biber ihraç etmiş, buna karşılık döviz girdisi 74,914 $ olmuştur. 2016 yılında ise 97,312 ton kırmızı bibere karşılık 90,021 $ gelir elde etmiştir (Trademap, 2016). Ülkemiz 2017 yılında 6388 ton olan kırmızı biber ithalat miktarını 2015 yılında 3127 ton iken 2010 yılında 3541 ton kırmızı biber ithal etmiştir (FAO, 2017) .

Biber yetiştiriciliğinde ana sınırlayıcı faktörler olan virüs, bakteri, nematod mantar v.b. biyotik etmenlerin sebep olduğu verim kayıplarının olduğu bilinmektedir. Bu kayıpları önlemek için kültürel uygulamaların yanında dayanıklı çeşitler geliştirilmekte ve üretimde yer almaktadır. Hatta söz konusu hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşit geliştirmede moleküler markörler kullanılmakta ve kısa sürede dayanıklı çeşitler geliştirlerek sorunların üstesinden gelinmektedir. Örneğin biber için çeşitli araştırıcılar tarafından Kök Ur Nematodu (***M. incognita,M.arenaria, M.javanica),*** Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV), Kök Boğazı Yanıklığı (*Phytophthora capsici)* gibi bazı hastalık ve zararlılara dayanınıklığa bağlı olarak SCAR ve CAPS markörleri geliştirilmiş ve ıslah programlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Minamiyama et al. 2007; Moury et al. 2000; Regional 1976).

Özellikle baharat sanayisinin çok aktif olduğu Orta Anadolu illerinde baharat sanayisinin gereksinimini karşılayacak yerel üretim yapılamamakta ve baharatın temini başka iller hatta başka ülkelerden sağlanma yoluna gidilmektedir. Bu durumda sucuk ve pastırma gibi ürünler başta olmak üzere sanayi ürünlerinde kalite sürdürülebilir olamamaktadır. Bu sorunun çözümü ise yerel genotiplerin ıslah edilmesi, verim ve kalitenin arttırılarak, kolay hasat edilebilen çeşitlerin geliştirilerek bölgede üretime kazandırılması olarak öngörülebilir.

Son yıllarda ülkemizde biberde standart çeşitlerle üretimden F1 hibrit çeşitlerle hızlı bir geçiş olmuş ve standart tohumla yerli biber üretimi lokal alanlarda kalmıştır. Ancak biberde diğer sebzelerde olduğu gibi yerel çeşitlerin dışında F1 hibrit çeşitlerle üretim yapıldığında verimde artış sağlanmasına rağmen her zaman istenen kaliteye ulaşılamamaktadır. Bu iş için önce bulunduğu bölgeye iyi uyum sağlamış olan yerel genetik kaynakların bazı olumsuzlukların giderilmesi ve standart çeşit olarak ıslah edilmesi gerekmektedir. Bu genetik kaynaklardan bir tanesi Kayseri ili ve çevresinde

yetiştiriciliği yapılan Cırgalan biberidir. Cırgalan biberi Kayseri ve civarı bölgelerde yetiştirilmekte ve kurutulduktan sonra toz biber olarak tüketilmektedir. Üretim miktarı az olduğundan dolayı baharatçılar tarafından Cırgalan biberinin yerine başka bölgelerden biber getirilerek toz biber olarak satıldığı beyan edilmektedir. Cırgalan biberi kaliteli olmasına rağmen zamanla verimlilik oldukça düşmüş aynı zamanda bölgede olmayan hastalık ve zararlıların bölgeye girmesiyle üretim oldukça sınırlı alana sıkışmıştır. Ayrıca kalite ve verimdeki bu düşüş yerel Cırgalan biberinin zamanla üretilmez hale geleceğine işaret etmektedir. Rutin ıslah metodları ile söz konusu çeşidin ıslah edilerek üretime kazandırılması çok uzun yıllar aldığından bu ıslah sürecine moleküler markör ve doku kültürü gibi teknolojik yöntemleri dahil edildiğinde ve yerinde ıslah yapıldığında süreç hızlı olacak ve ekonomiye kısa sürede kazandırabilecektir.

Sofralık biber üretimi özellikle Akdeniz bölgesinde örtü altı üretimin çoğunluğunu oluşturmakta ve ihracat açısından önemli bir paya sahip olmaktadır. Ancak yıllara bağlı olarak ihracat yapılan ülkelerle yaşanan problemler biber ihracatında önemli sıkıntılar oluşturmakta ve üretildiği bölgelerde önemli ekonomik zararlara neden olmaktadır. Taze biber uzun süre depolanamadığından dolayı hasatla birlikte tüketilmez veya ihracat yapılamaz ise çoğunlukla çöpe atılmaktadır. Ancak sanayide kullanılan biberler uygun şekilde işlenip pazara bağlı olarak belirli zaman zarfında arz edilebilmekte ve taze bibere göre işlem gördükten sonra katma değeri artmaktadır. Özellikle toz biber için üretim ülkemizin pek çok bölgesinde zaman zaman hobi amaçlı olsa da son yıllarda büyük alanlarda üretilmeye başlanmıştır. Üretimde genellikle diğer bir çok sebzede olduğu gibi adaptasyon sıkıntısı yaşadığı için yerel popülasyonlar kullanılmakta ve bu popülasyonların zaman içesinde gerek kendileme depresyonuna, gerekse yabancı tozlaşmaya bağlı olarak verim ve kalite kayıpları meydana gelmeye başlanmış ve bölgeye uygun biber ıslahı yapılmadığından dolayı ya yabancı menşeli tohumlara sahip biber çeşitleri ya da bölgeye adapte olamayan çeşitlerin üretime dahil olmasıyla verim ve kalitede önemli kayıplar meydana gelmeye başlamıştır. Özellikle baharat sanayisinin çok aktif olduğu Orta Anadolu illerinde baharat sanayisinin gereksinimini karşılayacak yerel üretim yapılamamakta ve baharatın temini başka iller hatta başka ülkelerden sağlanma yoluna gidilmektedir. Bu durumda sucuk ve pastırma gibi ürünler başta olmak üzere sanayi ürünlerinde kalite sürdürülebilir olamamaktadır. Bu sorunun çözümü ise

yerel genotiplerin ıslah edilmesi, verim ve kalitenin arttırılarak, kolay hasat edilebilen çeşitlerin geliştirilerek bölgede üretime kazandırılması olarak öngörülebilir.

Phytophthora capsici fungal bir hastalık olup, biber bitkilerinin en önemli hastalık etmenlerinden biridir. Fungus toprakta doğal olarak bulunmakta ve aşırı toprak nemi, sıcaklık, nemli hava koşulları olduğu zamanlarda ve bitki gelişiminin her devresinde bitkilere infekte olabilmektedir. Fungus için elverişli koşullar 18°C' nın üzerindeki nemli topraklar ve yüksek hava nemi ve hava sıcaklığın 24-29°C olduğu zamanlardır. Bitkilerde bu gibi hastalıklarla mücadele etmek ve yüksek verim sağlamak için hastalıklara dayanıklılık gösteren çeşitlerin geliştirilmesi ve aynı zamanda fizyolojik özelliklerden kaynaklanan yüksek verimli olan çeşitler elde etmek mümkündür. Birçok bitkide dışarıdan gelecek zararlara ve hastalıklara karşı en bilinen koruma şekli bu gibi durumlara dayanıklı çeşitleri üretmektir. Özellikle de topraktan kaynaklanan patojenlere etki edebilecek en etkili yöntem dayanıklılık ıslahıdır. Bitki ıslahı; klasik ıslah ve moleküler yöntemler yardımıyla ıslah şeklinde yapılmaktadır. Bitki ıslahının en iyi bilinen başarısı böceklere ve hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi olmuştur.

Biberlerde haploid bitki üretimi için anter kültürü tekniği ilk olarak Wang ve arkadaşları (1973) tarafından kullanılmıştır. Haploid bitki üretimi için çalışmalar George ve Narayanswamy (1973), Novak (1974), Saccardo ve Devreux (1974), Harn ve ark. (1975) gibi araştırmacılar tarafından devam ettirilmiştir. In vitro androgenesis için mikrosporun tek çekirdekli evresinin en uygun olunan evre Sibi ve ark. (1979) tarafından belirtilmiştir. Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1980) ve Dumas de Vaulx ve ark. (1981) tarafından androgenesis uyartımı için sıcak uygulaması denemişler ve daha fazla başarı elde etmişlerdir. Sonraki araştırmacılar bu tekniği geliştirerek uygulamalara devam etmiştir (Bajaj, 1990; Mityko ve ark., 1995; Kim ve ark., 2008; Nowaczyk ve ark., 2009). Ülkemizde de yerli biber genotipleri üzerinde ilk in vitro androgenesis çalışmaları Abak (1983) tarafından gerçekleştirilmiştir. Erkek gamet hücrelerinden haploid embriyo eldesi için farklı ön uygulamalar, büyüme düzenleyiciler, aktif kömür ve gümüş nitrat kullanımı önerilmiştir (Kristiansen ve Andersen, 1993; Ercan ve ark., 2001; Çiner ve Tıpırdamaz, 2002). Çömlekçioğlu ve ark. (1999), bazı yerli biber populasyonlarında yaptığı anter kültürü çalışmalarında, bitki gelişimini düzenleyicilerden NAA ve BAP'ın besin ortamlarında birlikte kullanılmasının ve

kültürün ilk haftasında 35°C sıcaklık uygulamasının olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de çok sayıda biber genotipi olduğu bilinmektedir. Fakat ekonomik öneme sahip biber genotipi sayısı çok az miktardadır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde değişik ekolojik koşullarda ve tüketim tercihlerine göre üretimi yapılan ama yüksek oranda genotipik ve fenotipik varyasyon gösteren yüzlerce çeşitten bazılarının genetik saflaştırma ve pedigri seleksiyon ıslahı ile çeşit olarak geliştirilebilmesi mümkündür. Dihaploidi (DH) yöntemiyle elde edilen saf hatlar çeşit olarak kullanılabilecekleri gibi, pedigri seleksiyon ıslahında ve hibrit F1'lerin üretiminde ebeveyn olarakta kullanılabildikleri için çok değerli ıslah materyalleridir. Bu nedenle ülkemizde başlatılacak olan biber ıslah programlarında ıslahçıların kullanabileceği dihaploid hatların elde edilmesinde kullanılacak olan haploid indüklemesi ve dihaploidizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir

Özellikle Kayseri ve civarı illerin biber üretimini Cırgalan biberi oluşturmaktadır. Cırgalan biberi kendine özgü şekil yapısı, sert meyve eti gibi özellikleri ile ön plana çıkmakta özellikle yetiştirildiği bölgedeki insanlar tarafından kurutmalık, taze tüketim ve bunun yanında toz biber yapımında kullanılmaktadır. Ancak üretim, üreticilerin kendi tohumlarını kendilerinin elde etmesiyle yapıldığından verimlilik gitgide azalırken, hastalıklara hassasiyet, üretim bölgelerine yeni hastalık ve zararlıların girmesiyle üretimi kısıtlamaya başlamıştır. Aynı zamanda pazar ve marketlerde üniform olmayan meyve boyu ve rengine sıkça rastlanmaktadır. Bu çeşitte verimlilik ve kalite artırılmadığı zaman üretimi yapılan bölgelerde üretilemez olacaktır. Bunu önlemenin yolu söz konusu çeşidin ıslah edilmesidir. Ardından da hastalık ve zararlılara dayanımın arttırılmasıdır. Islahın birinci adımı seleksiyondur. Yani üretimin yapıldığı bölgelerde verim, kalite ve bitki gücü bakımından en uygun bitkilerin teksel seleksiyonu, ardından kendileme yapılarak saflaştırılması, en verimli ve meyve kalitesi en yüksek olan genotiplerin belirlenerek mikro-makro verim denemeleri ile potansiyelinin ortaya konulmasıdır. Açık tozlanan bitkilerde saflaştırma (homozigotlaştırma) bireysel kendileme yolu ile yapılırken son yıllarda saflaştırma işine bir çok bitkide doublehaploid yöntemi dahil edilmiştir. Bunlardan birisi biber ve patlıcanda başarıyla uygulanan anter kültürüdür. Klasik ıslah yöntemlerini kısaltmak için doku kültürü teknikleri arasında haploidi tekniği sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur.

Haploidlerin en uygun kullanım alanı kendine uyuşmaz türlerde dahi tamamen homozigot katlanmış haploid hatların hızla üretimidir. Geleneksel yöntemler ile saf hatlar elde edilebilse de bu işlem zaman alıcıdır ve yabancı tozlanan bitkilerde 10-12, kendine döllenen bitkilerde 6-7 yıl gereklidir. Anter kültürü ile birkaç ay içinde haploid bitkiler ve bunların kromzomlarının katlanmasıyla tek bir generasyonda homozigot double haploid bitkiler elde edilebilir. Bu fertil homozigot bitkiler hibrit çeşitlerinin geliştirilmesi için gerekli saf hatların elde edilmesinde çok önemlidir.

Bu çalışmayla toz biber sanayisinde yoğun olarak kullanılan yerel Cırgalan biberinin üretiminde en büyük sorunlardan birisi olan fitoftora hastalığına dayanıklı biber genotiplerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Birçok bitki türünde olduğu gibi bir çeşidin ıslahı, yeni özelliklerin kazandırılması ve verim denemelerinin ardından üretime kazandırılması oldukça uzun zaman almaktadır. Fakat ıslah konusunda elde edilen bilgi ve bulgular ile biyoteknolojik yöntemler bu süreyi kısaltabilmektedir. Cırgalan biberine fitoftora hastalığına dayanımın kazandırılması ile tüketici açısından kaliteli toz bibere sahip olma, sucuk ve pastırma sanayisi bakımından sürekli aynı kalitede toz biberin tedarik edilmesi dolayısıyla özellikle Kayseri ilinde Kahramanmaraş iline benzer bir sektörün gelişerek istihdamın artırılması hedeflenmektedir.

1. BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

1.1. Biber ile İlgili Genel Bilgiler

İnsan yaşamında bitkilerin sağlık için beslenme ve tıbbi amaçlı kullanımı süregelmektedir. Çeşitli bitkiler ve özellikle bunların meyvelerinin içerikleri; vücut için gerekli vitamin ve mineraller bakımından büyük öneme sahip olmuşlardır. Sanayi alanındaki gelişmelerle çeşitli şekilde değerlendirilerek tüketime sunulmaktadır.

Biber (*Capsicum); Solanaceae* ailesinde yer almaktadır. *Capsicum* türlerinin doğal yayılım alanları Orta ve Güney Amerika'dır. Orta Amerika'da özellikle *Capsicum* cinsinin beş kültür türü ve bu türlere ait yüzlerce çeşidi bulunmaktadır. Bütün doğal biber populasyonları diploid yapıda olup aynı kromozom sayısına (2n = 2x = 24) sahiptirler. Kültüre alınmış türler arasında *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. *ve C. pubescens* yer almaktadır (Pickersgill, 1997).

C. annuum dünyanın her yerinde yaygın olarak yetiştirilen ve sıkça tüketilen bir türdür. Tatlı dolmalık biber tipi çeşitleri kadar çok sayıda acı ve tatlı sivri biber tipleri de bulunmaktadır. Biber bitkisi; çiçekleri beyaz renkli olup küçük, dallı, otsu ve tek yıllık bir bitkidir. Meyve rengi, şekli ve büyüklük bakımından oldukça farklı bir floraya sahiptir. Meyve şekilleri sivri, dar ve yuvarlak olarak birçok farklılık gösterir (IBPGR, 1983). *C. frutescens* tropik ve ılıman iklime sahip alanlarda esas olarak kültüre alınmış ve genellikle çok acı bir tada sahiptir. *C. chinense* bilimsel isminin tersine, Güney Amerika orijinlidir. Bilinen en acı biberler arasında gösterilen habanero tip biber çeşitleri bu tür içerisinde yer almaktadır. *C. baccatum* çoğunlukla Orta ve Güney Amerika yüksek kesimlerinde yetiştirilen bir türdür ve aji olarak isimlendirilmektedir. *C. pubescens* kültüre alınmış biberler arasında en az bilinen türdür (Greenleaf, 1986).

Uzun yıllar boyunca kültürü yapılan biber dünyada ve Türkiye'de en fazla tüketilen, içerdiği besinler sayesinde insan sağlığı açısından birçok katkısı bilinen bir sebzedir. Ekonomik değeri yüksek olan biber taze, salça, kurutmalık, pul ve toz biber, turşu, sos, közlenmiş konserve, çeşni gibi ürün formlarına dönüştürülerek kullanıma sunulmaktadır. Biber yapısında bulunan kapsaisin (capsaicin) maddesi acılığı bakımından iştah arttırıcı ve sindirimi kolaylaştırıcı etkiye sahiptir.

2017 yılı FAO verilerine göre üretimin %74.2'lik kısmı Asya'da, %12.2'lik kısmı Amerika'da, %9.6'lık kısmı Avrupa'da, %4'lük kısmı ise Afrika'da yapılmaktadır.

Tablo 1.1. Kıtalara göre dünya biber üretimi (FAO 2017)

Kıtalar	**Üretim Miktarı (Ton)**	**Üretimdeki Payı (%)**
Asya	515.534	74.2
Afrika	25.975	4
Avrupa	54.820	9.6
Amerika	93.984	12.2

Dünyada biber üretimi 2016 yılında 34.497.462 tona ulaşmıştır. Biber üretiminde Çin yaklaşık 14 milyon ton ile ilk sırada yer alırken, Türkiye (2018) 2.554.974 ton ile ikinci sırada yer almaktadır.

Biberin Türkiye üretimi yaklaşık 2.3 milyon ton/yıl olup ülkemiz sebze üretiminde domates, karpuz, soğan, kavun ve hıyardan sonra 3. sırada yer almaktadır. Türkiye dünya biber üretiminde bazı Meksika'dan sonra ikinci sırada, bazı yıllarda ise Endonezya ile yer değiştirerek dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2018).

Tablo 1.2. Dünya biber üretiminin ülkelere göre dağılımı (FAO 2018)

Ülkeler	**Üretim Miktarı (ton)**
Çin	16397097
Meksika	2436794
Türkiye	2195872
Endonezya	1846929
İspanya	1057089
Amerika	891778

Biber dünyada domatesten sonra en fazla üretilen sebze türlerinden birisidir. Dünyada olduğu gibi Türkiye içinde biber önemli ürünler arasında yer almaktadır. Biber üretimi genellikle taze tüketim ve sanayilik olarak iki farklı şekilde yapılmaktadır. Sanayilik üretime salçalık, közlemelik ve konservenin yanında kurutulduktan sonra toz veya pul biber şeklinde değerlendirme yer almaktadır. Bunlar içerisinde en büyük öneme kurutmalık biberler sahiptir. Türkiye yaklaşık % 76.5'i Güneydoğu, % 17.5'i Akdeniz, % 6'sı Ege Bölgesinde olmak üzere toplam 70.000 dekarlık alanda 15.900 ton kırmızı biber üretimi ile Bosna Hersek'in ardından 18. sırada gelmektedir (FAO, 2013; Özcan and Akbay 2013). Orta Anadolu Bölgesinin sivri biber üretimi 5.950 da alanda 6.058 ton ve Kayseri ilinin sivri biber üretimi ise 598 da alanda 353 tondur (TUİK, 2014).

Tablo 1.3. Türkiye biber üretimi (ton/yıl)

Yıllar	**Üretim Miktarı (ton)**
2015	2191888
2016	2342931
2017	2473978
2018	2195872

Kırmızı biberlerin; kurutulmuş, toz ve pul biber halinde kullanımı daha fazla önem taşımaktadır. Toz ve pul halde çeşitli yemeklerde hoş lezzeti, aroması, acılıkları ve renkleri ile çeşni oluşturan kırmızı biberi, dünyadaki insanların büyük çoğunluğu gıdalarında kullanmaktadır. Ülkemiz de kırmızı biber içerisinde en büyük potansiyele sahip olanı pul biber olarak arz edilen Kahramanmaraş biberi olarak adlandırılan biber tipidir. Kahramanmaraş'ın eşsiz toprak ve mikroklima gibi ekolojik özellikleri; çok iyi bir renk yanında, mükemmel bir lezzet, aroma, acılık ve iyi bir baharat kalitesini ortaya çıkarmaktadır (Zorlugenç ve Evliya, 2002). Diğer taraftan toz biber amacıyla üretilen Cırgalan biberi ise sucuk ve pastırma sanayisi için önemli bir çeşittir.

1.2. Biberde *Phytophthora capsici* L. Hastalığı ve Bazı Önemli Hastalık ve Zararlılar ile İlgili Çalışmalar

Phytophthora capsici L. fungal bir hastalık etmeni olup, biber bitkilerinin en önemli hastalıklarından biridir. Hastalık etmeni ayrıca çökerten, kök çürüklüğü, gövde ve meyve çürüklüğüne de neden olmaktadır. Etmen biberden başka patlıcan, domates, kabak, hıyar, kavun gibi birçok sebze ve yabani bitkileri hastalandırmaktadır. Fungus toprakta doğal olarak bulunur ve aşırı toprak nemi, sıcaklık ve nemli hava koşulları olduğu zamanlarda bitki gelişiminin her devresinde bitkilere infekte olabilir. Fungus eşeyli üreme organı olan oosporlar (üreme organı) yardımı ile çoğalmaktadır. Fungal etmen infektelenmiş tohumların içerisinde ya da üzerinde de bulunabilir. Son yıllarda dünyada ve ülkemizde önemli verim kayıplarına neden olduğu için biberde kimyasal mücadele sonuçsuz kalmakta ve en etkin çözümün dayanıklı çeşit kullanımı olduğu beyan edilmektedir. Söz konusu hastalığa dayanım birden çok genle kontrol edilen bir karakterdir. Fakat önemli QTL'ler hastalıkla mücadeleyi sürdürülebilir hale getirebilmede etkili olabilmektedir. *Phytophthora capsici*'ye dayanım sağlayan QTL'lerden birisi haritalanmış ve PCR temelli marköre çevrilerek ıslah programlarında kullanılmaktadır.

Abak ve ark. (1982), kök boğazı yanıklığı etmenine dayanıklı PM 217 genotipi ile hassas Yolo Wonder çeşidini melezlemiş ve 27 adet dihaploid hat geliştirmişlerdir. Dayanıklılığın kökten ve gövdeden farklı genler tarafından kontrol edilip edilmediklerini araştırdıkları çalışmalarında, dayanıklılığın kısmen farklı organlara özel olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Pochard ve Daubeze (1982), PM 217 ve Phyto 636 genotiplerini Meksika orijinli iki genotiple (L29 ve SCM) karşılaştırmışlardır. Oldukça saldırgan izolatlar kullandıkları çalışmalarında PM 217 genotipinin hastalığı kabul etmeme konusunda direndiğini, ilerleyen günlerde stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Sotirova ve Daskalov (1983), yabani biber formlarında kök boğazı yanıklığı etmenine dayanıklılığın bulunduğunu ancak dayanıklılığın kültür çeşitlerine aktarılmasının zaman aldığını bildirmişlerdir. Bu amaçla mutasyon ıslahından yararlanmışlar ve 10 adet dayanıklı hat geliştirmeyi başarmışlardır.

Milkova ve ark. (1988), türler arası melezleme yoluyla elde ettikleri 151-1 hattını, dayanıklı P-51 hattı ile melezlemişler ve geriye melezleme metodunu kullanarak kapya tipinde ‘’Phytostop’’ çeşidini geliştirmişlerdir. Bu çeşidin hastalık etmenine dayanıklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Quirin ve ark. (2005), söz konusu fitoftora hastalığına dayanımın birden çok genle kontrol edilen bir karakter olduğu belirtmişlerdir. Fakat önemli QTL’ler hastalıkla mücadeleyi sürdürülebilir hale getirebilmede etkili olabilmektedir. Quirin ve ark. (2005), *Phytophthora capsici*’ye dayanım sağlayan QTL’lerden birisi haritalamış ve PCR temelli marköre çevrilerek ıslah programlarında kullanmıtır.

Serada yetiştirilen sebzelerin en önemli zararlılarından birisi kök-ur nematodları *(Meloidogyne* spp) dır. Kök-ur nematodları bitkilerin köklerinde beslenir ve köklerde urlanmaya neden olarak su ve besin elementlerinin alınmasını engeller. Dünya genelinde Kök-ur nematodlarından 4 tür; (*Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; M. hapla Chitwood, 1949; *M. incognita* (Kofoid ve White, 1919) Chitwood, 1949 ve *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949) yaygın olarak bulunmaktadır. Kök-ur nematodlanın sebzelerde çok önemli verim kayıplarına neden oldukları ve bu kayıpların domateslerde % 42-54, patlıcanlarda % 30-60 oranlarında olduğu belirtilmektedir (Netscher and Sikora, 1990). Söğüt ve Elekçioğlu (2000a), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde *Meloidogyne* türlerinin ırklarını belirlemiş, incelemeye alınan 38 adet Kök-ur nematodu populasyonundan *M. javanica* ırk-I ve *M. incognita* ırk-Z'nin yaygın ırklar olduğunu tespit etmişlerdir.

Sebze alanlarında kök-ur nematodları ile mücadelede genellikle fumigant etkili nematisitler kullanılmaktadır (Tzortzakakis ve ark. (2000). Wesemael ve ark. (2011) bu kimyasalların insan sağlığına ve çevreye zararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, ürün rotasyonu ile konukçusu olmayan ürünlerin ve dayanıklı çeşitlerin kök ur nematodu infeksiyonunu azaltmada etkili olduğunu, fakat bunun başarılı olması için birçok ürünün konukçuluk durumlarının bilinmesinin önemli olduğunu da bildirmişlerdir. Dayanıklı biber hatları *M. incognita*’nın üremesini sınırlayarak kontrol etmektedir. Bu yüzden dayanıklı hat ve çeşitler, solarizasyon, ürün rotasyonu gibi diğer kontrol önlemleri ile beraber entegre mücadele programlarında kullanılmaktadır.

Biber üretimini sınırlayan pek çok virüs bulunmaktadır. Bunlardan birisi Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) olup kültür bitkilerinde en fazla zarar oluşturan ilk 10 virüs arasında yer almaktadır (Goldbach ve Peters, 1994; Griep ve ark.,2000). TSWV, ekonomik öneminden dolayı günümüzde en yoğun üzerinde çalışma yapılan bitki virüslerinden birisi durumundadır (Parrella ve ark., 2003).

Söz konusu virüs biber dahil ekonomik öneme sahip 35 bitki familyasına zarar vermektedir. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü, *Bunyaviridae* familyasına bağlı *Tospovirus* grubuna dahil bir virüs olup, *Thripidiae* familyası içinde 9 trips türü ile etkin olarak taşınabilmektedirler. Bitkinin tümünde genel bir bodurluk, solgunlukla birlikte sararma en tipik belirtisidir. Yapraklarda, klorotik düzensiz lekeler, nekrotik noktalı mozaik şekiller ve sürgün ucunda kurumaya başlayan nekrotik çizgiler dikkat çekmektedir. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)' nün Dünya' da tarımsal ürünlerde her yıl bir milyar dolardan fazla kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (Uhrig ve ark., 1999; Griep ve ark., 2000). Dünyanın farklı bölgelerinde özellikle kültür bitkileri ve süs bitkilerinde sık sık salgın hale geçmekte ve oldukça büyük oranda verim kayıplarına yol açabilmektedir. TSWV enfeksiyonundan kaynaklanan verim kayıp oranları % 30’ dan %100’ e kadar değişebilmektedir (Cho ve ark., 1986; German ve ark., 1992; Rosello ve ark. 1999). TSWV’ nin önemli kayıplara yol açtığı ürünler arasında domates, biber, patlıcan, marul, fasulye, enginar, kereviz, tütün sayılmaktadır (Rosello ve ark., 1996; Şevik, 2011).

TSWV’nin dayanıklılık kaynağı biber türü içinde mevcuttur. Dayanıklılık genleri ile bağlantılı moleküler markörler üzerinde çalışmalar yapılmış ve CAPS moleküler markörler belirlenmiştir ve ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (Çelik ve ark. 2011).

1.3. MAS (Moleküler Yardımıyla Seleksiyon)'ın Islahta Kullanımı

Bitki ıslahı, klasik ıslah ve moleküler ıslah olmak üzere iki ana yöntem ile gerçekleştirilir. Klasik bitki ıslahında arzu edilen özelliklere sahip yeni çeşitler geliştirmek için bireyler belirli bir amaç için melezlenir. İstenilen genotipleri seçmek ve değerlendirmek klasik yöntemle uzun zaman alacağı için bu seçime yardımcı olarak moleküler destekli ıslah yöntemi kullanılmaktadır (Tester ve ark. (2010).

Moleküler markörler 1980 yılından beri birçok bitkide yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle domateste ve biberde hastalıklara dayanıklılık genleriyle bağlantılı markörler geliştirilmiş ve ıslah programlarında kullanılmıştır. Şimdiye kadar çok sayıda gen (tek gen ve QTL) haritalanmıştır. Haritalanan bu özellikler moleküler markör yardımıyla seleksiyon yaklaşımı ile ıslah programlarında kullanılmaktadır.

1990 yılından bu yana moleküler markör yardımıyla seleksiyon (MAS) klasik ıslah metodunun yanında destekleyici olarak ıslah programlarında kullanılmaktadır. MAS'ın kullanılmasının nedenleri; bazı önemli dayanıklılık kaynaklarının yabani türlerde olması, erken seleksiyonla ıslah süresinin kısaltılabilmesi, geriye melezleme ile dayanıklılığın aktarılmasında kolaylık sağlaması, genler arasındaki bağlantının (linkage) kırılmasında kolaylık sağlaması, taranması zor olan özelliklerin belirlenmesinde kolaylık sağlaması, karantina kapsamındaki bazı hastalık ve zararlıya dayanıklılık için testlemeye gereksinimin olmaması, dolayısıyla daha az sayıda bitki ile çalışmaya imkân sağlayarak iş gücü ve maliyet bakımından avantaj sağlaması olarak sıralanabilir.

Moleküler markörlerin ıslahta kullanılmasında markör tipi çok önemlidir. Bu yüzden özellikle MAS'ta co-dominant markörler kullanılmaktadır. Co-dominant markörler heterozigot ve homozigot bireyleri ayırabilmektedir. MAS programları genellikle co-dominant SCAR ve CAPS markörleri üzerine yoğunlaşılmıştır (Bertrand, 2007). Bu markör sistemlerinin çok fazla alet ve ekipmana, işgücü ve maliyete gereksiniminin olmaması diğer sistemlere göre avantaj sağlamaktadır (Kumar, 2009).

MAS, birçok bitki türünde çeşitli bitki dayanımlarını, kalite özelliklerini ve bir dizi abiyotik stres dayanımını arttırmak için kullanılır. Ayrıca markörler yabani türlerden elit çeşitlere verim ve kaliteyi arttırmak için QTL allellerini aktarma amaçlı kullanımı giderek artmıştır. Pirinç, mısır, buğday, arpa, darı ve fasülye gibi bitkilerde MAS kullanımı oldukça artmıştır. QTL haritalamaların yapılması, genlerin klonlanması ve piramitlenmesi; gen ekspirasyon analizi ve gen fonksiyonlarının açıklanması; yeni alleller belirlemek ve genetik olarak sınıflandırılması yapılmış olan çekirdek koleksiyonlarını geliştirmek için germplazma koleksiyonlarının genetik yapısının belirlenmesi için büyük önem taşımaktadır. Bütün bu bilgileri bitki yetiştirme programları için uygun araç ve metodlarla entegre ederek kullanıldığı takdirde dünya

gıda üretiminin 2050 yılına kadar iki katına çıkarma hedefine ulaşılacağı belirtilmiştir (Sangam ve ark. 2007).

Gen temelli moleküler markör gelişimindeki gelişmelerle kantitatif özellik lokusu olan (QTL) haritalama prosedürleri ve düşük maliyeti nedeniyle başarı oranının artmasının muhtemel olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte markör destekli seçim ıslah programında kullanılmadan önce bazı temel sorunların çözülmesi gerektiğini öne sürülmüştür. Bunlar arasında QTL haritalaması için yüksek verimli/dayanıklı ve hassas/düşük verimli genotiplerin geliştirilmesi ve çevresel etkilerin en aza indirilmesi ön plana çıkmaktadır (Xu ve ark. 2007).

MAS ile küçük popülasyonlar kullanılarak ıslah programları yürütülebilecek ve saha denemelerinin kapasitesinin daha verimli kullanılmasına yol açacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak moleküler destekli seleksiyon fenotipik seçime yardımcı bir çalışma olarak değerlendirilmelidir (Heselmans ve ark. 2009).

Bitki seçimini daha etkili hale getirmek için markör destekli seleksiyonu bitki yetiştirme programlarında yararlı bir ek araç olarak görülmektedir. Ancak yetiştiricilik sektörü için moleküler markörün uygunluğu kendiliğinden belirgin olmamakla birlikte tartışmalı bir konudur. Organik tarımda moleküler markörlerin uygulanmasına yönelik olumlu ve olumsuz yanlarının olduğu yapılan diğer çalışmalarda değerlendirilmiştir. Bunun yanında organik ve moleküler bazlı çalışmalarda yetiştiriciler arasında daha fazla bilgi paylaşımı ve karşılıklı anlayışın gerekli olduğu ve buna istinaden araştırmaların topluma daha faydalı olacağı kanaatine varılmıştır (Bueren ve ark. (2010).

Bitki ıslahında etkin bir şekilde tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gibi çeşitli moleküler markörler tanımlanmıştır. Yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojilerinin uygulanması bitki ıslahında yüksek verim alımlarına sebep olmuştur. NGS kullanımlarını mısır ve buğday gibi önemli bitki genomlarını daha da genişletmek için, sekanslama yoluyla genotipleme (GBS) geliştirilmiş ve moleküler markör keşfini ve genotiplemeyi birleştiren dizilerin sekanslanmasında uygulanmıştır. Nihai bir MAS aracı olan ve uygun maliyetli bir teknik olaran GBS, geniş bir bitki yetiştirme programı kapsamında genom çapında ilişki çalışması (GWAS), genomik çeşitlilik çalışması, genetik bağlantı analizi, moleküler markör keşfi ve genomik seçimin uygulanmasında başarıyla kullanılmaktadır (Jiangfeng ve ark. 2014).

1.4. Biberde *Phytophthora capsici* L. Hastalığına Dayanımın Kazandırılmasında MAS (Moleküler Yardımıyla Seleksiyon) Yöntemiyle İlgili Çalışmalar

Thabuis ve ark. (2003), dayanıklılık bakımından birbirinden farklı genetik temele sahip bireyler üzerinde çalışarak, dayanıklılığın kalıtımını araştırdıkları çalışmalarında, 5. kromozom üzerinde bulunan genin üç genotipte de dayanıklılığı önemli ölçüde açıkladığını, 10. kromozom üzerindeki genin ise iki genotipe özel olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, tek bir genin kalıtımda önemli paya sahip olduğunu, orta düzeyde dayanıklılık sağlayan birçok genin bu gene eşlik ettiğini bildirmişlerdir.

Biberde etkili olan *Phytophtora capsici*'ye karşı dayanıklı olduğu söylenen kaynakların başında CM334 gelmektedir Thabuis ve ark. (2004). Meksika kökenli olan gen kaynağı olup, dayanımı kompleks bir kalıtım göstermektedir. *P.capsici*'ye dayanıklılığı kapsayan QTL analizleri önceden haritalanmıştır. Dayanıklılık/tolerant geninin CM334'den kültür çeşidine aktarımı için güncelleştirilmiş melezleme programı başlatılmış ve melezleme popülasyonları belirgin fenotipik testlerle taranarak 3 alt popülasyon grubuna ayrılmıştır. İlk alt gruptaki bitkiler düşük şiddette test edilerek taranmış ve hassas dolmalık biber ile geriye melezlenmiştir. İkinci ve üçüncü alt gruplardaki bitkiler daha sıkı dayanıklılık testleri ile taranarak ilk ve ikinci alt gruplardaki bitkilerle sırasıyla melezlenmiştir. Bu çalışmada, 5 tarama programı boyunca 3 alt grup için analizler yapılmıştır. Paralel olarak, dayanıklılık QTLs'e ilişkilenmiş moleküler markörlerdeki allellik sıklıklarındaki değişim saptanmıştır. Dayanıklılık fenotipi ve allellik sıklığı alt grup popülasyonuna ve tarama şiddetine sıkı bir şekilde bağlı olduğu görülmüştür. İlgili allellik sıklığı seleksiyon döngüsünce değişmektedir. Dayanıklılık QTL allellerinin yokluğu ilk alt popülasyon grubunda gözlenmiştir. İkinci ve üçüncü alt gruplarda ise dayanıklılık geninin aktarıldığı belirlenmiştir. Tüm alt gruplarda fenotipik verilerde aynı durum gözlemlenmiştir. Lokusda allellik sıklığındaki değişim ile dayanıklılık QTLs'i arasında bağlantı kurulamamıştır.

Minamiyama ve ark. (2007), *Phytophthora capsici*'ye hassas (Manganji) ve dayanıklı ('Criollo de Morelos 334') hatlar arasındaki yaptıkları melezleme sonucu oluşan F1 hibritin anter kültürü ile elde ettikleri bir doublehaploid (n=96) popülasyonunu kök boğazı yanıklığına karşı geliştirmişlerdir. QTL analizi gerçekleştirmek için, toplam

uzunluğu 878 cM olan yüksek yoğunluklu SSR oluşturulmuştur. Daha önceden geliştirilmiş 626 SSR markörleri kullanılarak 16 bağlantılı grup (LGs) ve 118 SSR markörler yerleştirilmiştir. Dayanıklılık, iki kök inokulasyonuyla değerlendirilmiştir. *P. capsici*'ye dayanıklılık için iki kez tekrarlanan testte önemli ve önemli sayılabilecek QTL, ilk testte, özel ve daha az önemli bir QTL belirlenmiştir. Önemli QTL SSR markör (CAMS420) ile desteklenmiştir. Bunlara ilave olarak 7 SSR markörü, bu QTL'in ucundan 21 cM uzunluk arasında yerleştirilmiştir. Zıt olarak, LG3'deki QTL'in ilk testte az etki ettiği ve bu QTL'in 10 cM mesafe içinde 8 SSR markörü tarafından kuşatıldığını belirtmişlerdir.

Quirin ve ark. (2005), OpD04 primerini kullanarak hastalık etmenine dayanıklılık gösteren *C. annuum* ve *C. chinense* türlerinde tek bir bant elde etmişlerdir. Bu bandı klonlayarak sekansını belirlemişler ve markör oluşturmuşlardır. Elde ettikleri markörün dayanıklılığı sağlayan altı QTL'den biri olan ve 5. kromozomda yer alan Phyto 5.2. ile çok yakın olduğunu saptamışlar ve dayanıklı bireylerin ayrımında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Quirin ve ark. (2009), biberdeki (*Capsicum annum*) dayanım/tolerant geni genetik ve fizyolojik olarak oldukça kompleks olduğunu belirtmiştir. *C. annuum* ve *C. chinense* türlerine ait dayanıklı, hassas, orta düzeyde dayanıklı ya da tolerant genotipler söz konusu patojene tepkisi bakımından hangi bölgenin yüksek seviyede dayanıklılığa katkısı olduğunu belirlemek için çok sayıda RAPD markörü test edilmiştir. Bir adet (OpD04) RAPD markörü yüksek seviyede dayanım gösteren *C. annuum* ve *C. chinense* türlerine ait dayanıklı genotiplerde tek bant göstermiştir. Söz konusu markörle elde edilen banda ait PCR ürünü klonlanmış ve SCAR markörüne çevrilmiştir. Bu markör biberin 5. kromozomunda Phyto.5.2 lokusu ile ilişkili altı QTL'den birisi olarak belirlenmiştir.

Son zamanlarda, *Phytophthora* kök boğazı yanıklılığına karşı dayanıklı F1 biber çeşitlerini Kore'de ticari olarak üretilmeye başlanmıştır (Lee ve ark. 2012). Lee ve ark. (2012) tarafından yürütülen çalışmanın amacı, 'CM334' (dirençli erkek ebeveyn) ve Kore'nin yerel çeşitlerinden olan 'Subicho' 'Daehwacho' ve 'Chilsungcho' (duyarlı dişi ebeveynler) üç biber çeşidi arasındaki melezlemelerden türetilen üç farklı F2 popülasyonu kullanarak *Phytophthora* kök çürüklüğü direncinin kalıtımını

belirlemektir. Bu çeşitler üç farklı patojen yoğunluğu (1 - 104, 1 - 105 ve 1 - 106 zoospor / ml) ile aşılanmıştır ve yayılma örnekleri inokulum yoğunluğunun yanı sıra, dişi ebeveyn duyarlılığına bağlı olarak da değişkenlik göstermiştir. Örneğin, inokulum yoğunluğu arttıkça, biberde hayatta kalma oranları azalmıştır. Tüm kalıtım analizlerinde ortak olan baskın dirençli bir gen olan *Phytophthora* kök çürümesine karşı dirence katılmıştır. Bu çalışma *Phytophthora* kök çürümesine dirençli genlere bağlı olarak moleküler markörlerin geliştirilmesinde yardımcı olmuştur.

Dayanıklı bitkilerin doğru seçilmesi ve verimliliğin arttırılması için dayanıma bağlı moleküler markörlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Şimdiye kadar, *Phytophthora* kök çürümesine dirençli ana baskın gen ile ilişkili birkaç markör bildirilmiştir ancak bu markörlerin kullanımları için ciddi kısıtlamalar ortaya çıkarılmıştır. Lee ve ark. (2012), tarafından yürütülen bir çalışmada, *Phytophthora* kök çürüklüğüne dayanıklı/tölerant hemen hemen tüm genetik kaynaklarda kullanılabilecek başlıca dominant gen ile bağlantılı moleküler markör geliştirmek amaçlanmıştır. Bir 'Subicho' × 'CM334' kombinasyonundan ve ticari bir 'Dokyacheong' kombinasyonundan geliştirilen iki ayrı F2 popülasyonu, dayanımla ilişkili moleküler markörleri geliştirmek için kullanılmıştır. 1.024 AFLP primer kombinasyonunun taranmasından sonra, üç AFLP (AFLP1, AFLP2 ve AFLP3) markörü tanımlanmış ve sırasıyla üç CAPS markörüne (M1-CAPS, M2-CAPS ve M3-CAPS) dönüştürülmüştür. Bunlar arasında M3-CAPS markör on adet dayanıklı, on dört adet duyarlı, beş hibrit ve 53 ticari çeşitte çalışılmıştır. Sonuç olarak, M3-CAPS markörü, daha önce bildirilen P5-SNAP ve Phyto5.2-SCAR markörlerine göre fitoftora direncini tanımlamak için daha güvenilir sonuç vermiştir. Sonuç olarak ise M3-CAPS markörünün acı biberde kök boğazı yanıklığına karşı dayanıklı çeşit geliştirmede kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Xiaowan Xu ve ark. (2014), yapılan çalışmada, geleneksel genetik analiz yöntemi kullanılarak, Amerika'dan gelen 'Criollo de Morelos 334' (CM334) biberdeki *Phytophthora capsici*'ye karşı en umut verici direnç kaynaklarından biri olduğu bilinen; CM334 ile çok hassas bir biber hattı olan 949 arasındaki çaprazdan altı kuşak (P1, P2, F1, F2, BC1 ve BC2) ile analiz yapılmıştır. Her popülasyonda bitkilerinin direnci, sulama yöntemi ile değerlendirilmiştir. F2 popülasyonu SRAP moleküler markörleri ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, tek bir çekirdeksel ve dominant gen çiftinin CM334'teki direnci kontrol ettiğini göstermektedir.

William ve ark. (2014), yüksek dayanıma sahip olan Criollo de Morelos-334 ve Early Jalapeño'dan geliştirilmiş bir dizi rekombinant hatta (RIL) 3887 markörle yüksek çözünürlüklü bir harita oluşturulmuşlardır. Bu hatlar, Meksika, New Mexico, New Jersey, Kaliforniya, Michigan ve Tennessee'den toplanan izolatlar *Phytophthora capsici* Dayanmı için sistematik olarak taranmıştır. İzolatlar arasında etkili dayanımla ilişkili niceliksel özellik lokusları (QTL) tanımlanmış ve ilave açılım popülasyonlarında SNP markörleri doğrulanmıştır. Transkriptomik ve genomik bilgiyi kullanarak, bir homoserin kinaz (HSK) olan CaDMR1'i Pc. dayanımla ilişkili allel için SNP markörleri belirlenmiş ve bu markörlerin gen pramitlemesinde kullanılabileceği beyan edilmiştir.

Naegele ve ark. (2014), bir F6 rekombinant hat popülasyonunu meyve çürüklüğüne duyarlılık açısından değerlendirilmiştir ve hatlar arasında farklılık ve özel bir izolat direnci tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Phytophthora* meyve çürüklüğü direnci aynı F6 popülasyonunda, Meksika'da bulunan Criollo del Morelos 334 (CM334) ile yüksek yoğunluklu genetik haritada kullanan "Early Jalapeno" arasında eşlendiği görülmüştür. Değerlendirme sonucu 63 ebeveynin ikisinde bağımsız olarak haritalama yapılmıştır. İnokülasyondan 3 ve 5 gün sonra (dpi) her izolat için dayanımın kalıtım derecesi (sırasıyla h^2 = 0.63 ila 0.68 ve 0.74 ila 0.83) tespit edilmiştir. OP97 ve 13709 (3 ve 5 dpi) ve 12889 (sadece 3 dpi) izolatlarına dayanım için önemli nicelik özellik lokusları (QTL) belirlenmiştir. Meyve özelliklerinin haritalanması, hastalık dayanımı ile potansiyel bir bağ olduğunu göstermiştir. CM334'ten gelen kısmi meyve çürümesi dayanımı, bunun biberde meyve çürümesi dayanımı için ideal bir kaynak olamayacağını göstermiştir.

Kimyasal kontrolün etkinliği; patojenin toprak kaynaklı olması ve yağmurlu mevsimde zoosporlar tarafından hızla yayıldığı için genellikle düşüktür. Böylece dayanıklı çeşitlere olan talebe dayanarak, çeşitli dayanıklılık kaynakları (CM334, AC2258 ve PI201234) yapılan çalışmalarda bildirilmiş ve kalıtım derecesi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Ancak, kalıtım şekli ile ilgili belirsizlik devam etmektedir. Söz konusu hastalılığın kalıtımı 1 veya 2 bağımsız dominant gen, 3 gen veya çoklu genden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Son zamanlarda, dayanım için QTL haritalamaları ve ıslah programlarında kullanılan dayanım için moleküler markörler bildirilmiştir. Pek çok dayanıklı/tolerant ticari hibrit çeşidinin geliştirilip üretimde kullanılmaya başlamasıyla, yetiştiriciler ve bitki patologları arasında ilgi gittikçe artmaya devam

etmektedir. Araştırmacılar, patojen suşlarını, CM334 ve PI201234 gibi direnç kaynağı ve dirençli ticari çeşitler ve *P. capsici* izolatları dahil olmak üzere, dayanıklı/tolerant konukçu bitkiler arasındaki etkileşime göre farklı ırklara sınıflandırmıştır. Bununla birlikte, standart olabilecek farklı olan konuk seti henüz oluşturulmamıştır. Bu nedenle sonuçlar yalnızca deneylerde kullanılan patojen suşları için geçerliliğini korumaktadır. Bu nedenle, dayanıklılık ıslahında kullanılacak hatlar için farklı kaynaklardan dayanım getirmek ve bir ıslah programında kullanmak önemlidir (Kim ve ark. (2014).

Fitoftora dayanınıklığın kalıtımı, niceliksel özellik lokusu (QTL) olarak bilinen kompleks bir kalıtımdır. 5. kromozom üzerinde büyük bir QTL bulunmaktadır. Yürütülen bir çalışmada, yüksek dayanıma sahip olan Criollo de Morelos 334 ve duyarlı genotip olan Jindu'nun melezlenmesi sonucunda geliştirilmiş double haploid popülasyonda polimorfik SNP markörlerinin belirlenmei için bulked segregant analizi (BSA) yapılmıştır. Bağlantı haritaları oluşturulmuş ve QTL analizleri yapılmıştır. 5. kromozomda tespit edilen en yüksek LOD skoruna(11) sahip QTL, fenotipik varyansın % 31'ini açıklamıştır. Küçük bir QTL olarak belirtilen 8. kromozomda bulunan ikinci QTL (LOD skoru 3.36) fenotipinin % 11.9'unu olarak açıklanmıştır. Ana QTL ve minör QTL'de bulunan en yakın markör sırasıyla SNP_421 ve SNP_694 markörleri olarak rapor edilmiştir. Bu nedenle, iki SNP markörü, *Phytophthora* dayanımı ile bağlantılı en iyi aday markörler olarak beyan edilmiştir (Chomkaeo ve ark. 2014).

Başka bir çalışmada Criollo de Morelos 334 (CM334), PI 201232, PI 201234 ve AC 2258 gibi biber çeşitleri ile yapılan testlemede *Phytophthora capsici* 'ye karşı çeşitli dayanım kaynakları tespit edilmiştir ve bunlar arasında CM334 iyi yüksek dayanıma sahip olduğu beyan edilmiştir (Bartual et al., 1994; Thabuis et al., 2003; Glosier et al., 2008; Truong et al., 2012; Rehrig et al., 2014). İlk araştırmalar, F1'de bulunan tam dayanım ve F2 popülasyonunun (Smith et al., 1967; Sy et al., 2005; Barbosa and Bosland, 2008) açılım oranlarına göre iki veya üç gen modeline uyan tek bir dominant allel modelini göstermiştir (Ortega et al., 1991; Reifschneider et al., 1992; Walker and Bosland, 1999). Fitoftora dayanımı için iki/üç gen modelinin (Thabuis et al., 2003; Ogundiwin et al., 2005; Bonnet et al., 2007; Kim et al., 2008, Truong et al., 2012; Liu et al., 2014; Rehrig et al., 2014) yanı sıra poligenik kalıtımın (Bartual et al., 1991; Bartual et al., 1993; Lefebvre and Palloix, 1996; Thabuis et al., 2003; Bonnet et al., 2007;

Minamiyama et al., 2007) ve niceliksel özellik lokuslarını (QTLs) varlığından söz edilmiştir.

Phytophthora kök boğazı yanıklığı, Güney Çin'de biber üretimi için ciddi bir sorun oluşturmaktadır. PRR direnç genlerinin haritalandırılması ile moleküler markör destekli seçim (MAS) ile PRR dirençli çeşitlerin üremesi için bağlantılı DNA belirteçleri oluşturulmuştur. Criollo de Morelos 334 (CM334) ve *Phytophthora capsici*'ye duyarlı (10399 (NMCA10399)) biber genotipi kullanılarak geliştirilen iki geriye melez (GM1) popülasyonu ve F2 popülasyonu, PRR dayanımının kalıtımın belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Byl4 (ırk 3) izolatına dayanımın, tek bir dominant gen olan PhR10 tarafından kontrol edildiği ve bu bölgenin 16.39Mb'lik uzunluğa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bulked segregant analysis (BSA) ve Spesifik Uzunlukta Büyütülmüş Fragman diziliminin (SLAF-seq) entegrasyonu verimli bir genetik haritalama stratejisi sağlamaktadır. Bu bölgede on polimorfik basit sıra tekrarı (SSR) markörü bulunmaktadır. PhR10 geni P52-11-21 (1.5 cM uzakta) ve P52-11-41 markörleri arasında 2.57 Mb aralığında sınırlanmaktadır. Bu bölge içinde toplam 163 gen bulunmakta olup bunlardan 31'inin hastalık direnci ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu makalede PhR10 geninin PRR için spesifik bir gen olduğu ifade edilmiş ve SSR markörleri ile klonlanabileceği belirtilmiştir (Xiaomei ve ark. 2016).

1.5. Biberde Anter Kültürü ile İlgili Çalışmalar

Açık tozlanan bitkilerde saflaştırma (homozigotlaştırma) bireysel kendileme yolu ile yapılırken son yıllarda saflaştırma işine bir çok bitkide doublehaploid yöntemi dahil edilmiştir. Bunlardan birisi biber ve patlıcanda başarıyla uygulanan anter kültürüdür. Klasik ıslah yöntemlerini kısaltmak için doku kültürü teknikleri arasında haploidi tekniği sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Haploidlerin en uygun kullanım alanı kendine uyuşmaz türlerde dahi tamamen homozigot katlanmış haploid hatların hızla üretimidir. Geleneksel yöntemler ile saf hatlar elde edilebilse de bu işlem zaman alıcıdır ve yabancı tozlanan bitkilerde 10-12, kendine döllenen bitkilerde 6-7 yıl gereklidir. Anter kültürü ile birkaç ay içinde haploid bitkiler ve bunların kromzomlarının katlanmasıyla tek bir generasyonda homozigot double haploid bitkiler elde edilebilir. Bu fertil homozigot bitkiler hibrit çeşitlerinin geliştirilmesi için gerekli saf hatların elde edilmesinde çok önemlidir.

Mityko ve ark. (1995), genç ana bitkilere bir anter kültür yöntemi geliştirilmiş. Onbeş genotipten oluşan bir biber çeşidi kullanılmıştır. Standart çeşitlere göre 2 genotip, “Fehérözön” (% 75.8) ve “Szechuan 90716” (% 21.0) anter kültürü yöntemine daha iyi bir yanıt vermiştir. Araştırmalarda, zayıf / cevap vermeyen ve cevap veren genotipler arasındaki çaprazlardan üretilen F1 melezleri, donör ebeveynde kötü bir cevap olsa bile, makul düzeyde bir tepki göstermiştir.

Qin ve ark. (1995), serada dört adet F1 melezi ve 13 çeşit (tatlı ve acı biber) Dumas de Vaulx ve arkadaşları tarafından tarif edilen metodu takip ederek bitkilere anter kültürü uygulaması yapmıştır. Büyüme düzenleyicileri ile ilgili modifikasyonlar 0.5 mg / 1 2,4D ve 0.5 mg / 1 KIN veya 0.5 mg / 1 2.4D ve 0.5 mg / 1 6-BAP şeklindedir. Sonuçlar bazı durumlarda embriyoların sadece 6-BAP içeren ortamda elde edildiğini göstermiştir.

Büyükalaca ve ark (2004), biber anterlerine farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat uygulaması ile anter kültürü yoluyla haploid embriyo üretimi için inceleme yapmıştır. Yerel olan iki adet kırmızı biber popülasyonundan seçilen genotipleri bitki materyali olarak kullanmıştır. Dört farklı gümüş nitrat konsantrasyonu (5, 10, 15 ve 20 mg 1 - 1) uygulaması yapılmıştır. Haploid embriyolar, test edilen tüm konsantrasyonlardan elde edilmiş, fakat farklı gelişim oranları test edilmiştir. En yüksek embriyo oluşumu (100 anter başına 45.7 embriyo), 15 mg gümüş nitrat içeren konsantrasyonun daha uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir.

Supena ve ark (2005), Endonezya acı biberi (*Capsicum annuum* L.) için verimli bir double haploid üretim yöntemi oluşturmak üzere çeşitli anter ve mikrospor kültür sistemleri çalışmıştır. Protokolün kritik faktörü çiçek tomurcuklarının seçimidir. tomurcuklar 1 gün 4 ° C’de ön muamele ardından 9 °C 'de 1 hafta boyunca anterlerin kültürü ve daha sonra 28 ° C'de sürekli karanlıkta bırakılmıştır. Ortam, Nitsch bileşenlerinden ve % 2 maltoz, % 1 aktif kömür ve 2,5 µM zeatin ve 5 µM indol-3-asetik asit içermektedir. Test edilen acı biberin on genotipinin tamamı bu protokole cevap vermiştir.

Teodora ve ark. (2011), biber anter kültüründe karşılaştırma yaparak, bu alanda çalışma ile ilgili problemleri, başarılı embriyo oluşumunu ve bitki gelişimi için kritik faktörlerin etkisini özetlemiştir. Haploid bitki üretimi, resesif mutasyonların ve benzersiz genetik

rekombinasyonların geri kazanılmasını kolaylaştırmak için etkili bir ıslah programıdır. Anter kültüründe polenden haploid bitki oluşumu bilimsel olarak gelişmiştir fakat tartışmalı bir sistem olduğu bilinmektedir. Etkili bir double haploid üretim yöntemi oluşturmak için haploid bitki rejenerasyonu için çeşitli teknikler kullanılmaktadır.

Hail ve ark. (2017), bitki soğuk toleransının fizyolojik ve genetik doğasının işlevinin daha iyi anlaşılması için bu çalışmada önemli sayıda araştırma incelenmiş ve tartışmışlardır. Donma toleransında rol alan genlerin mekanizmasının belirlenmesinde düşük sıcaklık gen regülasyonu ve sinyal transdüksiyonunda yer alan sistemleri açıklamışlardır. Arabidopsis transkripsiyon faktörleri ailesinin, CBF / DREB1 proteinlerinin rolleri açıklanmış ve bitki donma toleransını artıran soğuk kaynaklı genlerin (COR) bir regülasyonunun ekspresyonunun kontrolündeki rolünü açıklamışlardır. Ayrıca bu çalışmada, molibden gibi bitkilerin soğuk toleransını artırmak için uygulanan son uygulama da gözden geçirilmiştir. Düşük sıcaklıktan kaynaklanan bitki yaralanmalarını incelemek için kızılötesi kamera kullanımı da incelenmiştir.

Öcal ve ark. (2017), çalışma sonucunda; genotiplere göre farklı parametrelerin değiştiği gözlenmiştir. En yüksek embriyo verimi, Z-tad 87 (nematod direnci × çan hibrid) sayılı genotipten elde edilmiştir. Dolmalık biber türü en yüksek embriyo verimini vermiş ve bunu kapya, çarliston ve yeşil biber tipleri izlemiştir. Yeşil biber türünde embriyo oluşumunun en fazla olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek haploid bitki yüzdesi kapya biber tipinde gözlenmiş ve bunu çarliston izlemiştir. Sonuç olarak, test edilen tüm genotipler anter kültüründe reaksiyona girmiş ve elde edilen embriyo ve haploid bitkilerinin sayısı değişiklik göstermiştir.

Çömlekçioğlu ve ark. (2018), başından beri 167 farklı genotip ile yapılan tüm deneylerin ortak bir sonucu olarak (1983; Abak1), genotipin androjenik yanıt üzerinde en önemli ve sınırlayıcı faktör olduğunu bulmuştur. Genotiplere ek olarak, ortam ve katkı maddelerinin bileşiminin, büyüme düzenleyicilerinin, donör bitkinin yetiştirme koşullarının, tomurcukların veya anterlerin ön işleminin, mikrosporların gelişim evresinin, donör bitkinin yaşının ve inkübasyon koşullarının biberde androjenez yanıtını etkileyen faktörler olduğu gösterilmiştir.

Flavien ve ark. (2019), bu çalışmada iki adet nematoda dirençli biber genotipinin anter kültürüne yanıtı ve soğuk ön yetiştirme işleminin çiçek tomurcuklarına etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada iki ön yetiştirme kullanılmıştır. Soğuk ön yetiştirme işleminde çiçek tomurcukları, anter kültüründen önce 24 saat boyunca 4°C 'de buzdolabında tutulmuştur. Murashige ve Skoog ortamına % 0.25 aktif kömür, 6.5 g L-1 agar, 0.5 mg L-1.6-benzil-aminopurin (BAP), 4 mg L-1 naftalen-asetik asit (NAA), 15 mg L-1 gümüş nitrat (AgN03) ve 30 g L-1 sükroz kullanılmış ve değerlendirme sonucundan soğuk ön yetiştirmenin çeşitlere bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da istatiksel analizlerle değerlendirilerek genotipler arasında anlamlı bir etkileşim olduğunu doğrulamıştır.

1.6. Anter Kültürünün Islahta Kullanımı

Mityko ve ark. (1995), farklı biber genotiplerinin ve F1 hibrit çeşitlerinin anter kültürüne yanıtını çalışmışlardır. Araştırılan genotipler arasında mükemmel, iyi ve makul kabul edilebilen sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol çeşit ile karşılaştırıldığında iki genotipin daha iyi yanıt verdiğini belirlemişlerdir ('Eeherozon' ve 'Szechuan 90716'). Çalışmada anter kültürüne yanıt veren ya da zayıf yanıt veren genotipler arasındaki çaprazlamalardan elde edilen melezler ise zayıf olsa bile uygun bir yanıt düzeyi gösterdiği görülmüştür. Daha sonra elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri flow-stometri analiziyle belirlenmiştir.

Supena ve ark. (2005), Endonezya acı biberine karşı etkili olabilecek bir kültür sistemini incelemişlerdir. Protololün kritik faktörlerinin açık tomurcuk seçimi, tomurcukların 1 gün boyunca 4°C' de ön işleme tabii tutulması daha sonra 9°C 'de, 1 hafta sonrasında ise 28°C 'de sürekli karanlıkta kalarak kültürler takibe alınmıştır. Kültür ortamı ise Nitsch'in bileşenleri olan şeker, aktif kömür, zeatin ve indolasetik asit içermektedir. Test edilen biber genotiplerin uygulanan protokole yanıt verdiği belirlenmiştir. Bu protokol acı biber yetiştiriciliğinde double haploid bitki elde etmek için önemli bir çalışma olmuştur.

Mtyko ve ark. (2006), Macaristan'da tatlı ve baharat sanayisinde kullanmak için haploid tekniği ile biber yetiştirme çalışması yapmışlardır. Kolhisin ile uyarılmış bitkilerde rejenerasyon sıklığı baharatlık biber türlerinde düşük (< % 0.1), taze tüketim için kullanılan biberlerde daha yüksektir (%5-10). Daha az iş gücü gerektiren

tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olan kolhisin uygulaması biberde haploid bitki üretimi için kullanılmaktadır.

Pawel ve ark. (2006), androgenez uyartımı için kırmızı ve sarı meyve türlerini kullanmıştır. Araştırmacılar Dumas ve ark. (1981) geliştirmiş olduğu yöntem ile anter kültürü tekniğini uygulamışlardır. Kültürler 8 gün boyunca 35°C 'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra bitkiler 25°C 'ye transfer edilmiştir. 14 gün sonra anterler ikinci bir (R1) ortamına aktarılmıştır. Elde edilen embriyolar hormon free ortamlara aktarılarak sonrasında büyüyen bitkiler seralara dikilmiştir. Sonuç olarak her iki formda da anrogenez etkinliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bitkilerin flow stometri analizi sonucu haploid ve diploid olduğu görülmüştür. Ek olarak sarı meyve formundaki bitkilerde mixoploidi gözlemlenmiştir.

Pawel ve ark. (2006), iki ayrı biber hattının (ATZ1 ve PO) ve bu hatlardan elde edilmiş F1 (ATZ1xPO) melez çeşidinin anter kültürüne tepkisini incelemiştir. Araştırmacılar Dumas de Vaulx ve ark. (1981) geliştirmiş olduğu anter kültürü tekniğini kullanmıştır. Androgenez etkinliği ATZ1 hattı için %4 F1 melezleri için %1.5 arasında olduğu görülmüştür. Androjenik embriyoların gelişimi eşit çanak yapraklara sahip ve uzun yaprakları olan çiçek tomurcuklarından alınan anterlerde daha başarılı olunduğu görülmüştür.

Liljana ve ark. (2007), biber anter kültüründeki androjenik potansiyelini üç inkübasyon tedavisinin MS, N, LS, NN ve CP ortamı üzerindeki etkileri incelenmiştir. İlk uygulama soğuk koşullarda (7°C 'de) 7 gün boyunca karanlıkta muhafaza ederek daha sonra eksplantları 4 hafta boyunca ışıklı koşullarına (25°C 'de 12 saatlik fotoperiyot) alınarak LS ve NN ortamlarında anterler kallus üretmiştir. İkinci uygulamada sıcak koşullarda (25°C 'de) karanlıkta 7 gün inkübe edilerek daha sonra eksplantlar 4 hafta boyunca ışıklı koşullarına (25°C 'de 12 saatlik fotoperiyot) alınarak MS ve N ortamlarında anterler oluştuğu görülmüştür. Son olarak sıcak koşullarda (35°C 'de) karanlıkta 8 gün, sonraki 4 gün boyunca ışık koşullarına (25°C 'de 12 saatlik fotoperiyot) CP ortamında inkübe edilmiştir. Daha sonra eksplantlar 4 hafta boyunca R1 ortamına transfer edilerek anterlerden embriyo oluşumu görülmüştür.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu tez çalışmasında bitkisel materyal olarak fitoftoraya hassaslığı klasik ve moleküler yöntemle belirlenmiş olan ERÜ-934 nolu Cırgalan biberi ve *Phytophthora capsici* hastalığına dayanıklı/tolerant olan P1 genotipi kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Kayseri bölgesine ait Cırgalan biberi

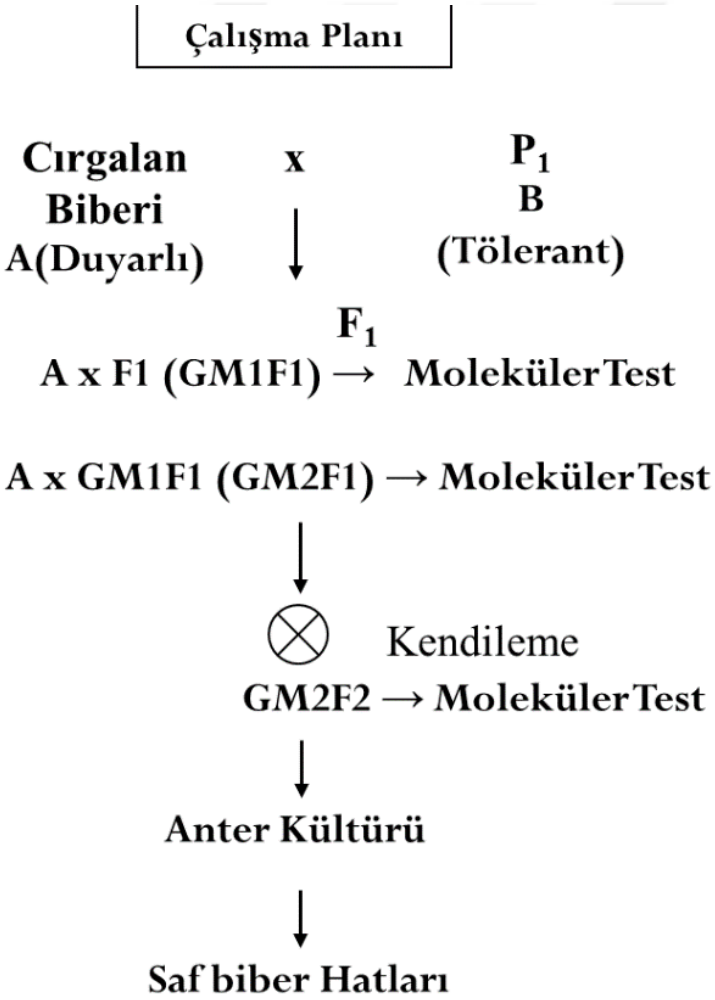


Şekil 2.2. Phytophthora capsici hastalığına dayanıklılık gösteren olan P1 genotipi

2.2. Yöntem

2.2.1. Fitoftoraya Dayanıklı/Tolerant Biber Genotiplerinin Geliştirilmesi

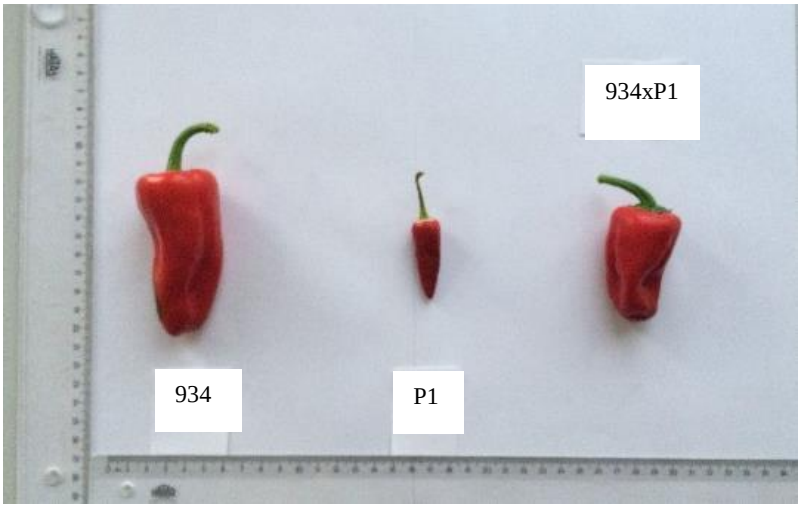
Şimdiye kadar fitoftora hastalığına dayanım için fitoftoraya dayanımı tarafımızdan yapılan hem moleküler testlemede hem de klasik testlemede dayanıklı olduğu belirlenen P1 biber genotipi baba olarak kullanılmış ve Cırgalan biberi (anter kültürü tekniğiyle saflaştırılmıştır) x P1(sivri biber) melezinden sonra moleküler testleme yapılmış ve moleküler olarak dayanıklılık bandı görüldükten sonra GM1F1 elde etmek üzere geriye melezlenmiştir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Çalışma planı



Şekil 2.4. Cırgalan biberlerine uygulanan melezleme işlemi



Şekil 2.5. Melezlemelerle elde edilen biberler (GM1F1)

PCR görüntüsünden alınan (şekil 3.2.) sonuçlara göre dayanıklılık gösteren melez biber hatları sonrasında tohumları alınarak tekrar viyollere ekimi yapılmıştır.



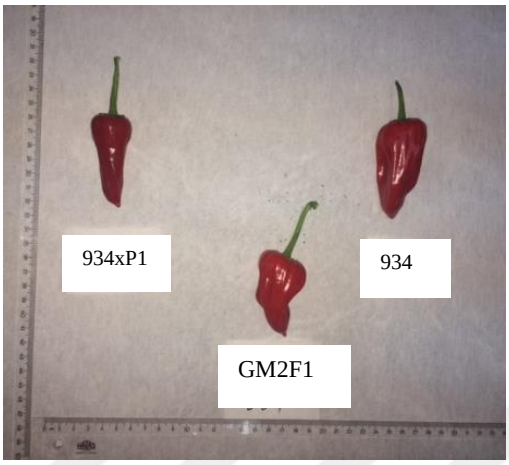
Şekil 2.6. Dayanıklılık gösteren GM1F1 biberlerinin tekrar yetiştirilmesi



Şekil 2.7. Dayanıklılık gösteren Cırgalan biber genotipleri

Bu aşamadan sonra fitoftoraya dayanım bakımından fide aşamasında 28 adet GM1F1 bitkisi **Phyto.5.2 SCAR markörü** kullanılarak dayanıklılık durumları belirlenerek dayanıklı olanlar saksıya aktarılmıştır. Cırgalan biberi x GM1F1 melezlemesi yapılarak GM2F1 bitkileri elde edilmiştir. Bir sonraki dönemde ise GM2F1 populasyonuna ait tohumlar ekilip fide aşamasında **Phyto.5.2 SCAR markörü** (Qurin ve ark., 2009) ile tekrar tarama yapılıp dayanıklı olarak belirlenen bitkiler seraya aktarılarak çiçek başlangıcından itibaren kendileme yapılmıştır. Dayanıklı/töleranslı olarak belirlenen bitkilerin kendilenmesi ile GM2F2 tohumları elde edilmiştir. Bir sonraki sezon GM2F2

populasyonu testlenmiş ve dayanıklı olarak belirlenen bitkiler seraya aktarılmış ve hem kendilenerek hemde anter kültürü yapılarak bitki elde edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.8. GM1F1 x P1 melezlemeleri yapılarak elde edilen GM2F1 biberi

2.2.2. DNA İzolasyonu ve Markör Analizi

Her melezlemeden elde edilen tohumlar 2:1 torf:perlit ortamında çimlendirilip ilk gerçek yaprak aşamasından hemen sonra DNA izolasyonu yapılmıştır ve DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1990) tarafından bildirilen CTAB yöntemi kullanılmıştır. PCR çalışmaları için 10ng/µl olacak şekilde DNA konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Ardından Quirin ve ark. (2009) tarafından geliştirilen Phyto.5.2 SCAR markörü kullanılarak 714 bp'de bant veren genotipler seçilmiştir.

Doyle ve Doyle (1990) tarafından bildirilen CTAB yöntemine göre;

- 62^{o}C sıcaklığa su banyosu önceden hazırlanmıştır.
- 2 ml'lik tüplerde 30 mg genç bitki dokusu doku parçalayıcıda parçalanmış ve üzerine 1,2 ml ektraksiyonbufferı eklenmiştir.
- 62^{o}C'de 30-60 dk boyunca inkubasyon yapılmış, arasıra ters-düz edilmiştir.
- 300 ulcloroform: octanol (24: 1 volume) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yaparak karıştırılmıştır (100 defa).
- 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Sulu kısmı pipetle çekerek başka temiz 2 ml'lik bir tüpe aktarılmıştır.

- 500 ulcloroform: octanol (24:1volume) çözeltisi ilave edilmiş ve yavaşça ters-düz yaparak karıştırılmıştır (100 defa).
- 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 2. kez 500 ulcloroform: octanol (24: 1 volume) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yaparak karıştırılmıştır (100 defa).
- 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Sulu kısmı pipetle çekerek başka temiz 2 ml'lik bir tüpe aktarılmıştır.
- Üzerine toplam hacmin 2/3'ü kadar (550 ul) soğuk isopropanol ilave edilmiştir. 30 dk veya daha fazla –20^{o}C'de bekletilmiştir.
- 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve sıvı kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Kalan beyaz çökeltinin üzerine 500 ul yıkama çözeltisi (%76 EtOH, 10 mM amonyum asetat) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- 14000 rpm'de 3 dksantrifüj yapılmış ve sıvı kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Beyaz çökelek tamamen kuruyuncaya kadar çeker ocakta bekletilmiştir.
- Beyaz çökelti üzerine 300 ul TE (10 mMTris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) ilave edilmiştir.
- Çökelti tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında gece boyunca veya 65^{0}C'de 60 dk boyunca bekletilmiştir.
- 10 ug/ml son konsantrasyonda olacak şekilde RNAse ilave edilmiş ve 37^{o}C'de 30 dk. inkube edilmiştir.
- 200 ul TE ve 15 ul amonyum asetat (10 mM, pH 7,7) ilave edilmiştir. Son olarak çözelti üzerine 2 hacim kadar soğuk etanol ilave ettikten sonra 20 dk veya gece boyunca –20^{o}C'de bekletilmiştir.
- 14000 rpm'de 3 dksantrifüj yapılmış ve sulu kısım dikkatlice döktükten sonra havada çökelek iyice kurutulmuştur.
- Uygun miktarda TE (10 mMTris, 0.1mM EDTA, pH 7.4) ilave edilmiştir (100-200ul).



Şekil 2.9. DNA izolasyonu



Şekil 2.10. PCR görüntüleme cihazı

2.2.3. Anter Kültürü çalışmaları

Bitkilerden tomurcuklar anter kültürü amacıyla iklimin ılıman olduğu ay olan Haziran ayında alınmıştır.



Şekil 2.11. Biber anterlerinin kültüre alınması

2.2.4. Uygun Anterlerin Seçimi

Kültüre alınan anterlerin bulunduğu gelişme aşaması haploid embriyo elde edilmesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bunun için en uygun aşama, mikrosporların tek çekirdekli aşamanın sonunda ve/veya iki çekirdekli aşamanın başında olduğu (I. mitoz bölünmesinin başladığı) dönemdir. Daha önce yapılan çalışmalarda biber çiçek tomurcuklarında, çanak yaprak ve taç yaprak boylarının eşit olduğu veya taç yaprakların çanak yapraklardan biraz daha uzun olduğu, anterlerin yaklaşık yarı boyuna kadar antosiyan oluşumunun görüldüğü gelişme aşamasında mikrosporların I. mitoz aşamasında olduğu bildirilmiştir (1988, Chambonnet). Daha önce yapılan ön çalışmamızda 1. mitoz aşaması belirlenmiştir.



Şekil 2.12. Uygun anter büyüklüğü

2.2.5. Besin Ortamları

Anter kültürü için MS ortamına eklenen 4 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP, % 0.25 aktif kömür ve 30 g/l sakkaroz ile 15 mg/l AgNO3 ortamı kullanılmıştır. (Büyükalaca ve ark, 2004) Anterlerde oluşan embriyoların bitkiye dönüşümlerinin sağlanması için BGD içermeyen 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamı kullanılmıştır.

Ortam hazırlanırken bütün kimyasallar eklendikten sonra ortamların pHsı 1 N 'lik HCl ve 1 N 'lik KOH kullanılarak 5.8 olarak ayarlanarak katılaştırıcı olarak 8 g/l agar kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar 121°C sıcaklık ve 1.2 kg/cm2 basınç altındaki otoklavda 15 dk süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizsyon işleminden sonra steril kabin içerisine alınan ortamlar 6 cm çapındaki steril petrilere dökülmüştür.

Her genotip için petri kaplarına 50 anter koyularak toplam 600 anter koyulmuştur. Anterlerden embriyo oluşumu görülmeye başlayınca hormon free ortama aktarılıp (kavanoz) bitkiye dönüşümleri gözlemlenmiştir. Ardından bitkiye dönüşenler yeterli büyüklüğe geldiğinde viyollere oradan da saksıya aktarılmıştır. Bu arada ploidi analizi yapılarak (Erciyes Üniversitesi Gen-kök merkezi) double haploid olanlar direk kendilenmiştir.



Şekil 2.13. Besi ortamlarının hazırlanışı

2.2.6. Elde edilen saf biber hatlarının bitki gelişimi, verim ve toz biber olarak kullanım bakımından bazı meyve kalite özelliklerinin belirlenmesi

Elde edilen saf biber hatları, 2018'in ilkbaharında cam sera ve açık araziye 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 adet bitki olacak şekilde ekilmiş ve morfoloik karakterizasyon, fenolojik gözlem, meyve eni (mm), meyve boyu (mm), yaş meyve ağırlığı (g), meyve et kalınlığı (mm), meyve kuru ağırlığı (g), meyve rengi, toz biber rengi (öğütüldükten sonra) belirlenmiştir.

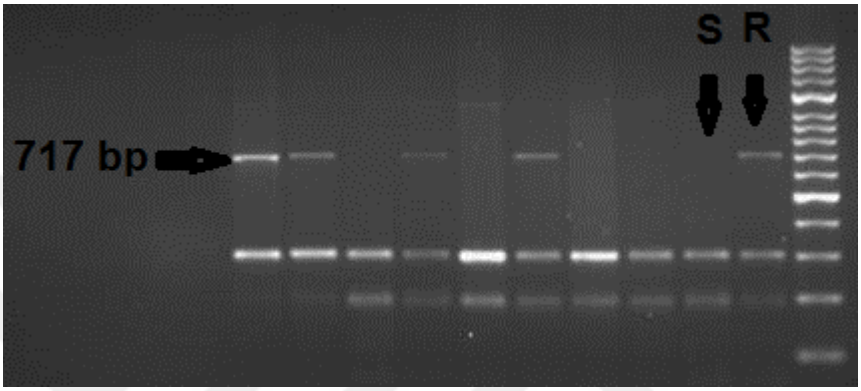
3. BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Geriye Melezleme ve MAS (Moleküler Yardımıyla Seleksiyon) Yoluyla Cırgalan Biberine *Phytphthora capsici* Leon. Hastalığına Dayanım Aktarılması

Bu çalışmada, ilk çiçeklenme sonrasında 934 ve P1 genotipleri melezlenerek, F1 elde edilmiştir. Daha sonra GM1F1 elde etmek için F1 ile geriye melez yapılmıştır. GM1F1 populasyonundan toplam 40 tohum fide elde etmek için ekilmiştir. 40 adet GM1F1 fideleri fitoftora toleransı için OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak tespit edilmiştir. 40 bitkiden 23'ünde *Phytphthora capsici* Leon. toleransı için 717 bç'de bant elde edilmiştir (Şekil 3.2 ve Çizelge 3.1.). Dişi ebeveyne (934) benzeyen bireylerden GM2F1 için GM1F1-6 genotipi seçilmiştir. 934xGM1F1-6, GM2F1 popülasyonunu elde edilmiştir. GM2F1 populasyonundan 20 tohum ekilerek OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak fide aşamasında testleme yapılmıştır. Ekilen 20 bitkiden 9'unda, *Phytphthora capsici* Leon dayanım/tölerans için 717 bç'de band elde edilmiştir (Şekil 3.3. ve Çizelge 3.1). GM2F2 popülasyonu içinden GM2F1-14 aday olarak seçilmiş ve GM2F2'yi elde etmek için GM2F1-14 kendilenmiştir. Kendilenen bireyler tekrar hasat edilerek tohumları çıkarılmış ve 20 tohuma ait fideler tekrar *Phytphthora capsici* leon dayanım belirlenmesi için testlenmiştir. Testleme sonucunda 12 adet *Phytphthora capsici* leon dayanım için 717 bç taşıyan genotip belirlenmiştir (Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1.). GM2F2'den elde edilen 12 genotipin tomurcuğu saf biber hattı elde etmek için anter kültürü kullanılmıştır. Toplam 25 double haploid hat elde edilmiş olup hepsi OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak *Phytphthora capsici* Leon için taranmıştır. Bunlardan 13'ünde *Phyto.5.2* alleli belirlenmiştir (Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1.). 13 saf hattın 4'ü ana ebeveyne yakın olduğu görülmüştür (GM2F2-6, GM2F2-9, GM2F2-14 ve GM2F2-18). Bu yakınlık meyve ve bitki karakterleri dikkate alınarak belirlenmiştir.

Phytphthora capsici Leon. hastalığı çoklu genler tarafından kontrol edilmektedir. *Phyto.4.1, Phyto5.1 ve Phyto.5.2, Phyto.6.1, Phyto.11.1 ve Phyto.12.1*, 4, 5, 6, 11 ve 12. kromozomlarda *Phyphphrara capsici* dayanımı için bölgeler oluşturmuştur. *Phyto.5.2* bölgesi, *Phytphthora capsici* dayanımının % 60'ını açıklamaktadır. Quirin ve arkadaşları (2009), altı lokustan (QTL) biri olan kromozom 5 üzerindeki *Phyto.5.2*'ye sıkıca bağlanmış biber kromozomu için bir lokus tanımlamışlardır.



Şekil 3.1. Ebeveynlerin ve GM2F2 populasyonuna ait genotiplerin jel görüntüsü

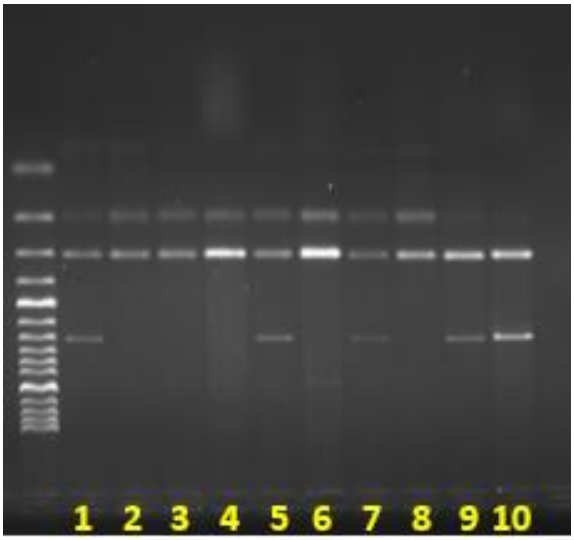
Phytphthora capsici Leon. hastalığı biber için genetik ve fizyolojik dayanımı karmaşık olan bir hastalık etmeni olup biber bitkisinde birçok kayıplara neden olmaktadır. Bir (OpD04) RAPD markörü, *C. annuum* ve *C. chinense* türlerinin dayanıklı/töleranslı genotiplerinde yüksek dayanım gösteren tek bir bant göstermiştir. Elde edilen bandın PCR ürünü klonlanmış ve SCAR markörüne dönüştürülmüştür. Bu markör, biberin 5. kromozomu üzerindeki *Phyto.5.2* lokusu ile ilişkili altı QTL'den biri olarak tanımlanmıştır (Quirin vd., 2009).

CM334 ile yüksek duyarlılığa sahip bir biber hattı olan 949 arasındaki melezlemeden altı generasyon (P1, P2, F1, F2, BC1 ve BC2) elde etmişlerdir. F2 popülasyonunu SRAP moleküler markörleri ile analiz edilmiştir. Tek bir çift nükleer ve dominant genin CM334'teki direnci kontrol ettiği bildirilmiştir. 64 çift SRAP primerinden 21 primerin ebeveynlerde polimorfik bantlar ürettiği görülmüştür. SRAP-Me6 / Em15 olarak adlandırılan fitoftora hastalığına karşı direnç ile bağlantılı bir SRAP işaretleyicisi elde etmişlerdir (Xu vd. 2014).

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında *Phytphthora capsici* Leon. hastalığına dayanım belirlenmesi amacıyla OpD04 markörü kullanılarak yapılan testleme sonucu elde edilen veriler

No	Genotip No	*717 bç*	Genotip No	*717 bç*	Genotip No	*717 bç*	Genotip No	*717 bç*
1	P1	+	GM1F1-21	+	GM2F1-1	+	GM2F2-1	-
2	934	-	GM1F1-22	+	GM2F1-2	+	GM2F2-2	-
3	934xP1	+	GM1F1-23	+	GM2F1-3	-	GM2F2-3	-
4	GM1F1-1	-	GM1F1-24	+	GM2F1-4		GM2F2-4	+
5	GM1F1-2	-	GM1F1-25	-	GM2F1-5	-	GM2F2-5	+
6	GM1F1-3	-	GM1F1-26	+	GM2F1-6	+	**GM2F2-6**	+
7	GM1F1-4	-	GM1F1-27	-	GM2F1-7	+	GM2F2-7	+
8	GM1F1-5	+	GM1F1-28	-	GM2F1-8	+	GM2F2-8	+
9	**GM1F1-6**	+	GM1F1-29	+	GM2F1-9	-	**GM2F2-9**	+
10	GM1F1-7	-	GM1F1-30	+	GM2F1-10	-	GM2F2-10	-
11	GM1F1-8	+	GM1F1-31	-	GM2F1-11	-	GM2F2-11	-
12	GM1F1-9	+	GM1F1-32	+	GM2F1-12	+	GM2F2-12	+
13	GM1F1-10	+	GM1F1-33	+	GM2F1-13	-	GM2F2-13	-
14	GM1F1-11	-	GM1F1-34	-	**GM2F1-14**	+	**GM2F2-14**	+
15	GM1F1-12	-	GM1F1-35	+	GM2F1-15	+	GM2F2-15	+
16	GM1F1-13	+	GM1F1-36	+	GM2F1-16	-	GM2F2-16	-
17	GM1F1-14	+	GM1F1-37	-	GM2F1-17	-	GM2F2-17	+
18	GM1F1-15	+	GM1F1-38	-	GM2F1-18	+	**GM2F2-18**	+
19	GM1F1-16	-	GM1F1-39	-	GM2F1-19	-	GM2F2-19	+
20	GM1F1-17	+	GM1F1-40	+	GM2F1-20	-	GM2F2-20	-
21	GM1F1-18	+						
22	GM1F1-19	+						
23	GM1F1-20	+						

Phyto.5.2 SCAR markörü kullanılarak çalışmada kullanılan Kayseri bölgesine ait Cırgalan biberi ve P1 genotiplerinin markör testleri yapılmıştır. Çeşitlerin jel görüntüsündeki (Şekil.3.1) dayanıklılık durumları (Çizelge 3.1.) belirlenmiştir. Quirin vd., (2009) kullanmış olduğu OPD04 717 primeriyle testleme yapılmıştır. Dayanıklı bireyler (+) ve hassas bireyler (-) tespit edilmiştir (Tablo 3.1.). Bu testleme sonucunda 717 bp üzerinde band gösteren genotiplerin *Phytphthora capsici* Leon. hastalığına dayanıklı olduğu görülmektedir.

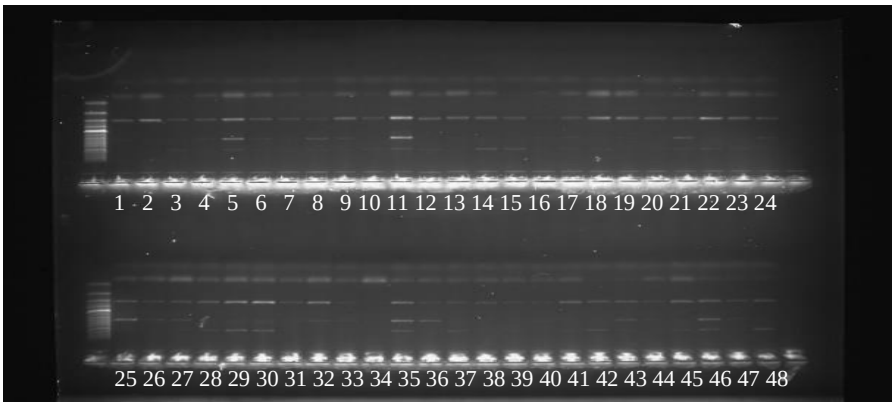


Şekil 3.2. Ebeveyn ve melez biber hatlarının dayanıklılık jel görüntüsü

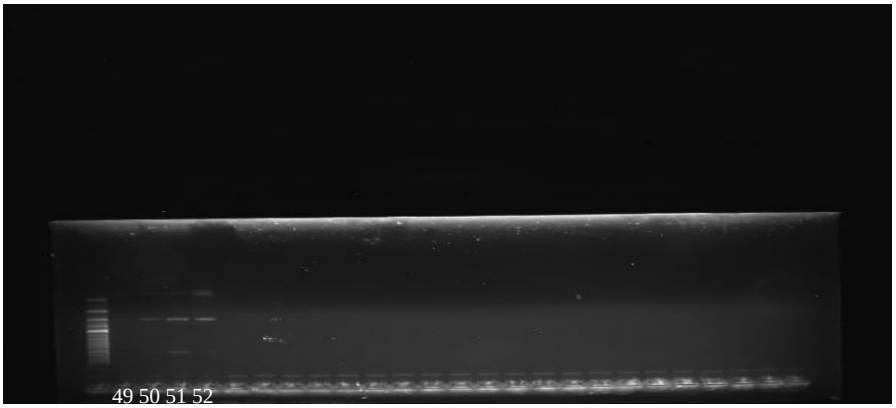
Çizelge 3.2. Ebeveyn ve melez biber genotiplerinin fitoftora dayanımları

Genotipler		*Phytophthora*
1	P1	+
2	934	-
5	934xP1	+

Phyto.5.2 SCAR markörü kullanılarak dayanıklılık durumları belirlenmiş olan melez bireylerin tekrar geriye melezlemeleri yapılarak Quirin vd., (2009) kullanmış olduğu OPD04 717 primeriyle tekrar testlemesi yapılmıştır (Şekil 3.3). Bu testleme sonucunda 714 bp üzerinde band gösteren genotiplerin *Phytphthora capsici* Leon. hastalığına dayanıklı olduğu görülmektedir. Bu aşamadan sonra tespit edilen bireyler seçilerek sera ortamında yetiştirmeye alınmıştır.



Şekil 3.3. Söz konusu genotiplerin GM2F1 jel görüntüsü



Şekil 3.4. Söz konusu genotiplerin GM2F1 jel görüntüsü

Çalışmada kullanılan biber hatları tekrardan moleküler testlemeye tabii tutularak ana, baba, GM1F1 ve GM2F1 biber çeşitlerinin fitoftoroya olan dayanıklılıkları çizelge 3.2.'de verilmiştir. Dayanıklı/tolerant biberler (+), hassas biberler ise (-) ile belirtilmiştir.

3.2. Anter Kültürü Kullanılarak *Phytphthora capsici* Leon. Hastalığına Dayanım Cırgalan Biberi Saf Hatlarının Geliştirilmesi

Çalışmada 20 adet GM2F2' den elde edilen tohuma ait fideler *Phytphthora capsici* Leon. hastalığına dayanım için testlenmiş ve 12 adet genotip 717 bç'inde band taşımıştır. 12 genotipin tomurcuğu saf biber hattı elde etmek için anter kültürü kullanılmıştır (Büyükalaca ve ark, 2004).

Her genotipten 50 adet anter kültüre alınmış ve toplam 156 adet anter gelişimi gözlemlenmiştir. Bu 156 adet anterden 45 adet embriyo elde edilmiş ve bu embriyolardan 25 adedinde bitkiye dönüşüm elde edilmiştir. En yüksek bitkiye dönüşüm GM2F2-5 nolu genotipten (5 adet bitki) elde edilirken GM2F2-4 nolu genotipten hiç bitkiye dönüşüm elde edilememiştir (Çizelge 3.3).

Elde edilen toplam 25 double haploid hattın hepsi OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak *Phytphthora capsici* Leon dayanım için taranmıştır. Bunlardan 13'ünde Phyto.5.2 alleli belirlenmiştir (şekil 3.1. çizelge 3.1). 13 saf hattın 4'ü ana ebeveyne yakın olduğu görülmüştür (GM2F2-6, GM2F2-9, GM2F2-14 ve GM2F2-18). Bu yakınlık meyve ve bitki karakterlerine bakılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan genotiplere ait anter kültürü bulguları

Genotip	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Gelişen Anter Sayısı	Embriyo Sayısı	Bitkiye Dönüşen
GM2F2-1	50	20	5	3
GM2F2-2	50	31	6	2
GM2F2-3	50	18	2	1
GM2F2-4	50	00	0	0
GM2F2-5	50	13	5	4
GM2F2-6	50	14	3	3
GM2F2-7	50	08	3	2
GM2F2-8	50	06	0	0
GM2F2-9	50	14	5	3
GM2F2-10	50	11	7	3
GM2F2-11	50	9	4	2
GM2F2-12	50	12	5	2
Toplam	600	156	45	25



Şekil 3.5. Anterlerin embriyoya dönüşümü ve haploid bitkilerin aklimatizasyonu

Abak ve ark. (1982), kök boğazı yanıklığı etmenine dayanıklı PM 217 genotipi ile hassas Yolo Wonder çeşidini melezlemiş ve 27 adet dihaploid hat geliştirmişlerdir. Dayanıklılığın kökten ve gövdeden farklı genler tarafından kontrol edilip edilmediklerini araştırdıkları çalışmalarında, dayanıklılığın kısmen farklı organlara özel olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Milkova ve ark. (1988), türler arası melezleme yoluyla elde ettikleri 151-1 hattını, dayanıklı P-51 hattı ile melezlemişler ve geriye melezleme metodunu kullanarak kapya tipinde ‘’Phytostop’’ çeşidini geliştirmişlerdir. Bu çeşidin hastalık etmenine dayanıklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Öcal ve ark. (2017), çalışma sonucunda; genotiplere göre farklı parametrelerin değiştiği gözlenmiştir. En yüksek embriyo verimi, Z-tad 87 (nematod direnci × çan hibrid) sayılı genotipten elde edilmiştir. Dolmalık biber tipi en yüksek embriyo verimini vermiş ve bunu kapya, çarliston ve yeşil biber tipleri izlemiştir. Yeşil biber tipinde embriyo oluşumunun en fazla olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek haploid bitki yüzdesi kapya biber tipinde gözlenmiş ve bunu çarliston izlemiştir. Sonuç olarak, test edilen tüm genotipler anter kültürüne reaksiyona girmiş ve elde edilen embriyo ve haploid bitkilerinin sayısı değişiklik göstermiştir.

3.3. Elde Edilen Saf Biber Hatlarının Bitki Gelişimi, Verim ve Toz Biber Olarak Kullanım Bakımından Bazı Meyve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Kullanılan ebeveyn bireyler, GM1, GM2 ve double haploid bireylerin morfoloik karakterizasyon, fenolojik gözlem, meyve eni (mm), meyve boyu (mm), yaş meyve ağırlığı (g), meyve et kalınlığı (mm), meyve kuru ağırlığı (g), meyve rengi, toz biber rengi (öğütüldükten sonra) belirlenmiştir (çizelge 3.4.).

Elde edilen bulgulara göre; meyve boyu ortalama 31,73 mm ile 57,56 mm arasında bulunmuştur. Meyve eni ortalama 11,59 mm ile 28,56 mm arasında bulunmuştur. Meyve et kalınlığı ise ortalama 0,94 mm ile 1,83 mm arasında ölçülmüştür. DH bitkilerde ise; meyve boyu 58,9 mm ile 53,33 mm arasında, meyve eni 27,1 mm ile 31,8 mm arasında, meyve et kalınlığı ise 1,44 mm ile 1,72 mm arasında belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan saf biber hatlarının meyve yapısı ile ilgili bulgular

Genotip No	Tekerrür	Meyve Boyu(mm)	Meyve Eni(mm)	Meyve et Kalınlığı(mm)
934	1	60,28	28,57	1,67
	2	57,23	32,2	1,98
	3	55,18	24,91	1,84
	Ortalama	57,56	28,56	1,83
P1	1	29,35	10,21	1,77
	2	33,39	12,35	1,12
	3	32,46	12,21	1,16
	Ortalama	31,73	11,59	1,09
934X(934XP1)	1	43,12	21,51	1,41
	2	68,06	22,96	1,68
	3	51,19	23,21	1,23
	Ortalama	54,12	22,56	1,44
934XP1	1	52,01	13,89	1,66
	2	55,7	16,03	1,1
	3	61,37	18,96	0,94
	Ortalama	56,36	16,29	1,01
DH-1		58,9	28,1	1,63
DH-2		57,7	31,8	1,72
DH-3		53,33	31,1	1,56
DH-4		56,1	27,1	1,44

Meyve yaş ağırlığı ortalama 15,24 gr ile 2,78 gr olarak değişmiştir. Meyve kuru ağırlığı 2,37 g ile 0,67 g arasında ölçülmüştür. Meyve rengi ve öğütüldükten sonra elde edilen toz renginde değişiklik olduğu gözlemlenmeyerek her iki durumda da kırmızı renk belirlenmiştir. DH bitkilerde ise kuru ağırlık ise 2,22 g ile 2,49 g arasında, meyve yaş ağırlığı 12,4 g ile 16,89 g arasında değişmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan saf biber hatlarının meyve kalite özellikleri ile ilgili bulgular

Genotip No	Tekerrür	Yaş ağırlık	Kuru ağırlık	Meyve rengi	Toz rengi
934	1	16,43	2,42	KIRMIZI	KIRMIZI
	2	16,89	2,49	KIRMIZI	KIRMIZI
	3	12,4	2,22	KIRMIZI	KIRMIZI
	Ortalama	15,24	2,37	KIRMIZI	KIRMIZI
P1	1	2,24	0,77	KIRMIZI	KIRMIZI
	2	2,82	0,73	KIRMIZI	KIRMIZI
	3	3,3	0,52	KIRMIZI	KIRMIZI
	Ortalama	2,78	0,67	KIRMIZI	KIRMIZI
934X(934XP1)	1	18,89	2,5	KIRMIZI	KIRMIZI
	2	12,01	2,04	KIRMIZI	KIRMIZI
	3	9,93	2,21	KIRMIZI	KIRMIZI
	Ortalama	13,61	2,25	KIRMIZI	KIRMIZI
934XP1	1	5,17	2,26	KIRMIZI	KIRMIZI
	2	4,46	2,07	KIRMIZI	KIRMIZI
	3	6	2,19	KIRMIZI	KIRMIZI
	Ortalama	5,21	2,17	KIRMIZI	KIRMIZI
DH-1		16,43	2,42	KIRMIZI	KIRMIZI
DH-2		16,89	2,49	KIRMIZI	KIRMIZI
DH-3		12,4	2,22	KIRMIZI	KIRMIZI
DH-4		15,24	2,37	KIRMIZI	KIRMIZI



Şekil 3.6. Biber genotiplerine ait meyveler

Bu çalışma toz biber sanayisinde yoğun olarak kullanılan yerel Cırgalan biberinin üretiminde en büyük sorunlardan birisi olan fitoftora hastalığına dayanıklı biber genotiplerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Birçok bitki türünde olduğu gibi bir çeşidin ıslahı ve yeni özelliklerin kazandırılması ve verim denemelerinin ardından üretime kazandırılması oldukça uzun zaman almaktadır. Fakat ıslah konusunda elde edilen bilgi ve bulgular ile biyoteknolojik yöntemler bu süreyi kısaltabilmektedir. Bu çalışmada hem klasik ıslah metodları hem de anter kültürü ve moleküler markörler kullanılarak kısa sürede çeşit adayı geliştirmek hedeflenmiştir.

Diğer bitki türlerinde olduğu gibi biber de F1 hibrit çeşitlerinin üretime dahil olmasıyla yerel çeşitler yavaş yavaş üretimden çekilmektedir. Bunun başlıca sebeplerinden birisi de yerel çeşitlerin verimliliğinin düşük olmasıyla birlikte bazı hastalık ve zararlılara dayanımlarının olmaması ya da az olmasıdır. Diğer bir sebep ise üreticiler kendi tohumlarını uygun olmayacak şekilde üreterek üretim yapmaya çalıştığından üniform olmayan meyve renkleri ve meyve şekliyle karşı karşıya kalınmaktadır. Bu durum ise pazarlanabilir ürün miktarını düşürmekte ve aynı zamanda kaliteyi olumsuz etkilemektedir. Özellikle Kayseri ili ve çevresinde yetişme olanağı bulunan ve uzun yıllardan bu yana yetiştirilen yerel adlarla anılan Cırgalan biberi çeşidi diğer birçok biber çeşidinde olduğu gibi fitoftora hastalığına hassas olduğundan dolayı önemli derecede verim kayıpları yaşanmaktadır. Söz konusu hastalık yüzünden verimlilik azalmakta ve üretim alanı daralmaktadır. Bu çalışmayla Orta Anadolu bölgesine ait ilk kez yerel bir biber çeşidine fitoftora dayanıklılık/tolerant melezleme ıslahı yoluyla aktarılmıştır.

Diğer taraftan hem moleküler hem de anter kültürü tekniği kullanılarak süre kısalmıştır. Örneğin klasik ıslah yöntemleriyle yeni çeşitlerin geliştirilmesi uzun yıllar gerekmekte ve çok fazla zamana ve emeğe ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde bu süreyi kısaltmak ve daha kalıcı sonuçlar elde etmek için doku kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır. Bu tekniklerden birisi olan haploid bitki üretimi bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir. Haploidi tekniği ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Anter kültürü tekniği haploid bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden birsidir. Diğer taraftan fitoftoraya dayanıklılık/tolerant ile ilişkili olan moleküler markör kullanılarak zamandan ve klasik testlemede oluşabilecek olumsuzlukların önüne geçilmiştir.

Çalışma sonucunda moleküler markörler ve double haploid gibi biyoteknolojik yöntemlerle seleksiyon ıslahı yöntemleri kullanılarak kısa zamanda saf ve adına doğru verimli çeşitler elde edildiği zaman bu çeşitler tescil ettirilerek kayıt altına alınacak ve söz konusu çeşitler kendi isimleriyle pazarlanabilecektir. Ayrıca tescilli olacağı için ihracata konu olabilecektir. Çeşitlerin kalite ve verimlerinde artış sağlandığı takdirde birim alandan daha kaliteli yüksek verim elde edildiğinden karlılık artabilecek ve söz konusu çeşitlerin üretim alanları genişleyebilecektir. Diğer taraftan söz konusu biber çeşidine, biberin en önemli hastalıklarından birisi olan fitoftoraya dayanıklılık/tolerant aktarıldığı zaman hastalığı oluşturduğu zararın önüne geçebilmek için, hastalık ile mücadele için kullanılan ilaçlar azalacak, çevre ve insan sağlığına olan etkisi azalacaktır.

Bu çalışma sonunda hem hibrit çeşit geliştirmek üzere üstün ebeveynler geliştirmek hem de ilk elde edilecek saf hatların standart çeşit adayı olabilme kabiliyeti belirlemektir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de verimlilik ve kalite açısından biber üretiminde hibrit çeşitlerin kullanımı kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu yüzden bu çalışma sonunda ilk amaç kaliteli ve kolay hasat edilebilen toz biber sanayisine uygun standart biber çeşidi olsada nihai hedef hibrit biber çeşidi elde edip verimliliğin, karlılığın ve kalitenin arttırılarak ülkemizdeki baharat sanayisinin ihtiyacına cevap verdikten sonra ihracatta büyük paya sahip olabilmektir.

4. BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ilk çiçeklenme sonrasında 934 ve P1 genotipleri melezlenerek, F1 bireyler elde edilmiştir. Daha sonra GM1F1 elde etmek için F1 ile geriye melez yapılmıştır. GM1F1 populasyonundan toplam 40 tohum fide elde etmek için ekilmiştir. 40 adet GM1F1 fideleri fitoftora dayanım için OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak tespit edilmiştir. 40 bitkiden 23'ünde *Phytphthora capsici* Leon. dayanımı için 717 bç'de bant elde edilmiştir. Dişi ebeveyne (934) benzeyen bireylerden GM2F1 için GM1F1-6 genotipi seçilmiştir. 934xGM1F1-6, GM2F1 popülasyonunu elde edilmiştir. GM2F1 populasyonundan 20 tohum ekilerek OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak fide aşamasında testleme yapılmıştır. Ekilen 20 bitkiden 9'unda, *Phytphthora capsici* Leon dayanım/tölerans için 717 bç'de band elde edilmiştir. GM2F2 popülasyonu içinden GM2F1-14 aday olarak seçilmiş ve GM2F2'yi elde etmek için GM2F1-14 kendilenmiştir. Kendilenen bireyler tekrar hasat edilerek tohumları çıkarılmış ve 20 tohuma ait fideler tekrar *Phytphthora capsici* leon dayanım belirlenmesi için testlenmiştir. Testleme sonucunda 12 adet *Phytphthora capsici* leon dayanım için 717 bç taşıyan genotip belirlenmiştir. GM2F2'den elde edilen 12 genotipin tomurcuğu saf biber hattı elde etmek için anter kültürü kullanılmıştır. Toplam 25 double haploid hat elde edilmiş olup hepsi OPD04 717 primer çiftleri kullanılarak *Phytphthora capsici* Leon'a dayanım/tölerans için taranmıştır. Bunlardan 13'ünde *Phyto.5.2* alleli belirlenmiştir. 13 saf hattın 4'ü ana ebeveyne yakın olduğu görülmüştür (GM2F2-6, GM2F2-9, GM2F2-14 ve GM2F2-18). Bu yakınlık meyve ve bitki karakterlerine dikkate alınarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında MAS (Moleküler Yardımıyla Seleksiyon) ve anter kültürü uygulamaları biberde en büyük sorunlardan birisi olan kök boğazı yanıklığı hastalığına dayanımın aktarılmasında etkili yöntemler olduğu söylenebilir. Ayrıca elde edilen

bulgular diğer biber genotiplerinin geliştirilmesinde kullanılabilecek nitelikte olup, bu çalışmayla geliştirlen kök boğazına dayanıklı/töleranslı biber genotipleri klasik testlemeyle dayanım/tölerans durumu teyit edildikten sonra Cırgalan biberi üretiminde ve diğer ıslah proğramlarında kullanılabilir durumdadır.

KAYNAKÇA

Alan, M. N. 1984. Collection and evaluation of pepper germplasm in Turkey. ***Capsicum* and Eggplant Newsletter, 3**:17-18.

Andersen, J. R., & Lübberstedt, T. 2003. Functional markers in plants. **Trends in plant science**, **8**(11), 554-560.

Arpacı, B.B., 2009. *Phytophthora capsici*'ye Dayanıklı Biber Hatlarının Ve Melezlerinin Kahramanmaraş Koşullarındaki Arazi Dayanıklılıkları ile Verim ve Kaliteleri. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Ata, A. 2011. Biberlerde (*Capsicum Annum L.*) Anter Kültüründe Mevsim Etkisi Ve Mikrospor Gelişimi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Adana

Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annum* L.) Anter Kültüründe Mevsim ve Mikrospor Gelişimi Ziraat Fakültesi Yüksek Lisans, ss: 88.

Barchi, L., Bonnet, J., Boudet, C., Signoret, P., Nagy, I., Lanteri, S., ... & Lefebvre, V. (2007). A high-resolution, intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping. **Genome, 50**(1), 51-60.

Ben-Chaim, A., Borovsky, Y., Falise, M., Mazourek, M., Kang, B. C., Paran, I., & Jahn, M. (2006). QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. **Theoretical and Applied Genetics, 113**(8), 1481.

Buyukalaca, S., Kilic, N., Comlekcioglu, N., Abak, K., & Ekbic, E. (2004). Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annum* L.) haploid embryos via anther culture. **European Journal of Horticultural Science, 69,** 206-209.

Çelik, N., Özalp, R., & Çelik, İ. (2010). Bazı biber hat ve çeşitlerinin tobacco mosaic tobamovirus (TMV)'e dayanıklılığının mekanik inokulasyon ve elisa testleri ile belirlenmesi. **Derim**, **27**(2), 1-9.

Çömlekçioğlu, N., & Ellialtıoğlu, Ş. (2018). Review on the Research carried out on in vitro Androgenesis of Peppers (*Capsicum annum* L.) in Turkey. **Research Journal of Biotechnology**, **13**, 75-84.

Çömlekçioğlu, N.,Büyükalaca, S. ve Abak, K., 2001. Effect of silvernitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annum*). XIth EUCARPIA Meeeting on Genetics and Breeding of Capsicum&Eggplant, 2001, Antalya-Turkey.

Demiray, E., Tülek, Y. 2008. Domates Kurutma Teknolojisi ve Kurutma İşleminin Domatesteki Bazı Antioksidan Bileşiklere Etkisi. **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3**: 9-20.

Duman, A. D., Zorlugenç, B., & Evliya, B. (2002). Kahramanmaraş'ta kırmızı biberin önemi ve sorunları. **KSÜ Fen ve Müh Derg, 5**(1), 111-117.

Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D. 1982. Culture in vitro d'antheres d'aubergine (*S. melongena* L.); Stimulation de la production de plantes qu moyen de traitements a 8 +35 oC associes a de faibles teneurs en substances de croissance. **Agronomie, 2** (10): 983-988.

Dwivedi, S. L., Crouch, J. H., Mackill, D. J., Xu, Y., Blair, M. W., Ragot, M., ... & Ortiz, R. (2007). The molecularization of public sector crop breeding: progress, problems, and prospects. **Advances in agronomy**, **95**, 163-318.

Ellialtıoğlu Ş, Başay S, Kuşvuran Ş (2012). Patlıcanda polendimorfizmi ve anter kültürü ilişkisinin incelenmesi. **TABAD, 5**:149–152 (in Turkish).

Enfield, NH, USA: Science Publis hers Inc.,pp. 199–222.

Falconer, DS. 1989. Threshold characters. In: Introduction to quantitative genetics. Longman Scientific and Technical, New York, pp. 300–312.

Gersch, K. P., Motsenbocker, C. E., & Lang, G. A. (1998). Anatomical description of the fruit-receptacle detachment area in cayenne pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science, 123**(4), 550-555.

Gersch, K.P., C.E. Motsenbocker, and Lang G.A. 1994. Differential fruit detachment force of mature cayenne pepper selections. **HortScience 29**:732. (Abstr.)

Gulsen, O., Sever-Mutlu, S., Mutlu, N., Tuna, M., Karaguzel, O., Shearman, R. C., ... & Heng-Moss, T. M. (2009). Polyploidy creates higher diversity among Cynodon accessions as assessed by molecular markers. **Theoretical and applied genetics, 118**(7), 1309-1319.

Günay A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği. Cilt II, Meta basımevi, İzmir s. 345.

Günay, A.. 1981. Özel Sebze Yetiştiriciliği, Serler . Cilt II. Çağ Matbaası. Ankara.

Gyulai, G., Gémesné, J. A., Sági, Z. S., Venczel, G., Pintér, P., Kristóf, Z., ... & Zatykó, L. (2000). Doubled haploid development and PCR-analysis of F1 hybrid derived DH-R2 paprika (*Capsicum annum* L.) lines. **Journal of plant physiology**, **156**(2), 168-174.

He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z. X., Liu, H., & Li, Z. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. **Frontiers in plant science**, **5**, 484.

Heidari-Zefreh, A. A., Shariatpanahi, M. E., Mousavi, A., & Kalatejari, S. (2019). Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annum* L.) using putrescine and ascorbic acid. **Protoplasma**, **256**(1), 13-24.

Hesseltine, C. W., 1976. Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods and Feeds. In Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Ed. J. V. Rodrics, Washington. D. C., 411p.

IBPGR, 1983. Geneticresources of Capsicum, IBPGR Secretariat, Rome, 49.

Kaiser, S. (1935). The factors governing shape and size in *Capsicum* fruits; a genetic and developmental analysis. **Bulletin of the Torrey Botanical Club,** 433-454.

Keleş, D. 2007. Farklı biber tiplerinin karakterizasyonu ve düşük sıcaklığa tolerans. Çukurova Üniversitesi Fen BilimleriEnstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış). 212 s. Adana.

Kiessling, K. H. (1986). Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and applied chemistry, 58**(2), 327-338.

Koleva-Gudeva, L. R., Spasenoski, M., & Trajkova, F. (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. **Scientia Horticulturae**, **111**(2), 114-119.

Lee, S., Chanoit, G., McIntosh, R., Zvara, D. A., & Xu, Z. (2009). Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 297**(2), H569-H575.

Lefebvre, V., A. Palloix, C. Caranta and E. Pochard, and Jahn M.K. 1998. Genetic mapping of the *pvr1* locus in struction of an intraspecific integrated linkage map of pepper *Capsicum* spp. and evidence that distinct potyvirus resistance loci using molecular markers and doubled haploid progenies. **Genome 38:** 112–121.

Livingstone, K. D., Lackney, V. K., Blauth, J. R., Van Wijk, R. I. K., & Jahn, M. K. (1999). Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. **Genetics, 152**(3), 1183-1202.

Mitykó, J., & Gémes Juhász, A. 2006. Improvement in the haploid technique routinely used for breeding sweet and spice peppers in Hungary. **Acta Agronomica Hungarica**, **54**(2), 203-219.

Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., & Fári, M. (1995). Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annum* L.). **Plant Breeding**, **114**(1), 78-80.

Motsenbocker, C. E. (1996). Detachment force and fruit characteristics of Tabasco pepper at several stages of development. **Hort Science, 31**(7), 1231-1233.

Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V., & Palloix, A. (2000). A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. **Genome, 43**(1), 137-142.

Mutlu, S., A. Kır, M. A. Haytaoğlu, S. A. Küçük, C. Balkan ve B. İçer. 2007. Sebze genetik kaynakları araştırma projesi sonuçraporu. ETAE, Menemen, İzmir.

Mutlu, S., Haytaoğlu M.A., Kır A. ve İçer B.. 2009. Ulusal gen bankası biber (*Capsicum annum* L.) materyalinde morfolojikkarakterizasyon. **Anadolu, J. of AARI. 1** (1):63-91

Nowaczyk, P., & Kisiała, A. (2006). Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annum* L. anther culture. **Journal of applied genetics**, **47**(2), 113-117.

Nowaczyk, P., Kisiała, A., & Olszewska, D. (2006). Induced androgenesis of *Capsicum* frutescens L. **Acta Physiologiae Plantarum**, **28**(1), 35-39.

Nowaczyk, P., Olszewska, D., & Kisiała, A. (2009). Individual reaction of Capsicum F 2 hybrid genotypes in anther cultures. **Euphytica**, **168(**2), 225-233.

Odland, M.L.. Inheritance studies in the pepper, *Capsicum frutescens*. Minn. Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 179. 1948

Öcal, Y., Taşkın, H., Pınar, H., Keleş, D., Onsinejad, R., & Büyükalaca, S. (2018, August). Development of nematode resistant pure pepper lines via anther culture method. In **XXX International Horticultural Congress IHC2018: International Symposium on Tropical and Subtropical Vegetable Production: 1257** (pp. 29-36).

Palmgren, M. S. ve Hayes A.W. 1987. Aflatoxin in Food; Mycotoxin in Food. P. Krogh (Ed). Academic Press Inc., London, 65-83p.

Pflieger, S., Palloix, A., Caranta, C., Blattes, A., & Lefebvre, V. (2001). Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, **103**(6-7), 920-929.

Pınar, H. 2013. Biberde (*Capsicum annum L.)* Çinko Etkinliğini Kontrol Eden Genlerin Kalıtımının Belirlenmesi ve İlişkili Moleküler Markörlerin Geliştirilmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. s. 202.

Portis, E., Nervo, G., Cavallanti, F., Barchi, L., & Lanteri, S. (2006). Multivariate analysis of genetic relationships between Italian pepper landraces. **Crop Science, 46**(6), 2517-2525.

Qin, X., Rotino, G.L. 1993. Anther culture of Several Sweet and Hot Pepper Genotypes. **Capsicum and Eggplant Newsletter, 12**: 59-62.

Quirin, E. A., Ogundiwin, E. A., Prince, J. P., Mazourek, M., Briggs, M. O., Chlanda, T. S., ... & Jahn, M. M. (2005). Development of sequence characterized

amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto. 5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, **110**(4), 605-612.

Quirin, E. A., Ogundiwin, E. A., Prince, J. P., Mazourek, M., Briggs, M. O., Chlanda, T. S., ... & Jahn, M. M. (2005). Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto. 5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. **Theoretical and Applied Genetics, 110**(4), 605-612.

Rao, G. U., Chaim, A. B., Borovsky, Y., & 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.

Rashid, A. 1983. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. **Physiol. Plant. 58**: 544-548.

Reifschneider, F. J. B., Boiteux, L. S., Della Vecchia, P. T., Poulos, J. M., & Kuroda, N. 1992. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. **Euphytica**, **62**(1), 45-49.

Reinert, J. ve Bajaj, Y.P.S., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissueand Organ Culture. (Reinert, J. And Bajaj, Y.P.S, Eds) Springer-Verlag, Berlin, pp. 251-267.

Rodriks, J. V., 1978. Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. 2nd Printing. American Chemical Society. Advances in Chemistry Series, Washington, 409p.

Sayılır, A., & Özzambak, E. (2005). Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü ile Besin Ortamı İçeriklerinin Embriyo Verimine Etkileri Üzerine Bir Araştırma. **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, **42**(3), 1-11.

Schiefer, H. B. (1986). Pathology of mycotoxicoses: possibilities and limits of a diagnosis. **Pure and applied chemistry, 58**(2), 351-356.

Setiamihardja, R., & Knavei, D. E. (1990). Association of pedicel length and diameter with fruit length and diameter and ease of fruit detachment in

pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science, 115**(4), 677-681.

Smith, J.E. ve Moss M.O., 1985. Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance. Printed in Great Britain, Sons. Ltd.; London, 143p.

Smith, P.G. Deciduous ripe fruit character in peppers. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 57**:343–344. 1951.

Stephanie Walker, Marisa Wall M., and Bosland Paul W.. 2004. 'NuMex Garnet' Paprika **Hort Science, 39**(3):629–630. 2004.

Sunderland, N., 1971. Antherculture: a progress report. **Sci. Prog. Oxf., 59**: 527-549.

Supena, E. D. J., Muswita, W., Suharsono, S., & Custers, J. B. M. (2006). Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. **Scientia horticulturae**, **107**(3), 226-232.

Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. B. M. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.). **Plant cell reports**, **25**(1), 1-10.

Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. B. M. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.). **Plant cell reports**, **25**(1), 1-10.

Tan, A. (1992). Türkiye'de bitkisel çeşitlilik ve bitki genetik kaynakları. **Anadolu J. of AARI, 2**, 50-64.

Tan, A. ve A. İnal. 2003. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bitki genetik kaynakları çalışmaları, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No:112, 13 s. İzmir.

Taşkın, H., 2005. Bazı biber genotiplerinde anter kültürü ile haploid embriyo uyartımında embriyo kalitesinin artırılmasına yönelik bazı uygulamalar. Ziraat Fakültesi Yüksek Lisans, ss: 79.

Thabuis, A., Lefebvre, V., Bernard, G., Daubeze, A. M., Phaly, T., Pochard, E., & Palloix, A. (2004). Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, **109**(2), 342-351.

Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubeze, A. M., Caranta, C., & Lefebvre, V. (2003). Comparative mapping of Phytophthora resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, **106**(8), 1473-1485.

Thabuis, A., Palloix, A., Servin, B., Daubeze, A. M., Signoret, P., & Lefebvre, V. (2004). Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. **Molecular Breeding**, **14**(1), 9-20.

TSE. Türk Standartları Enstitüsü TS 3706, Kırmızı Biber-Acı, Pul (Yaprak)., Ankara.

Tuncer, İ. K. 2001. Kırmızı biber kurutma seminer notları. Sütçü İmam Üniversitesi Mimarlık Mühendislik Fakültesi, Kahramanmaraş, 10-13.

TÜİK, 2009. Türkiye İstatistik Kurumu

Wang, L. H., Gu, X. H., Hua, M. Y., Mao, S. L., Zhang, Z. H., Peng, D. L., ... & Zhang, B. X. 2009. A SCAR marker linked to the N gene for resistance to root knot nematodes (Meloidogyne spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.). **Scientia horticulturae, 122**(2), 318-322.

Werner, D. J., & Honma, S. (1980). Inheritance of fruit detachment force in pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science, 105**(6), 805-807.

Wright, S. 1968. Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 1:Genetic and Biometric Foundations. The University of Chicago Press, Chicago.

Wu, F., Eannetta, N. T., Xu, Y., & Tanksley, S. D. (2009). A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *118*(5), 927-935.

Yalçın, D. 2008. Kırmızı Pul Biber Üretiminde Kritik Kontrol Noktaları ve Tehlike Analizleri. **KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 11**: 129-137.

Yi, G., Lee, J. M., Lee, S., Choi, D., & Kim, B.D. 2006. Exploitation of pepper EST–SSRs and an SSR-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics, 114**(1), 113-130.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : Nur Selin

Soyadı : ÇABUK

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

Yabancı Dili : İngilizce

e-mail :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise : Çorum Atatürk Lisesi 2007-2011

Lisans : Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 2012-2017