

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA -DÜZLERÇAMI ORTAK BAHÇE DENEME ALANINDAKİ
ALTI FARKLI KIZILÇAM (*Pinus brutia* Ten.) POPULASYONUNDA cpSSR
BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Yusuf KURT

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA -DÜZLERÇAMI ORTAK BAHÇE DENEME ALANINDAKİ
ALTI FARKLI KIZILÇAM (*Pinus brutia* Ten.) POPULASYONUNDA cpSSR
BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Yusuf KURT

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

**ANTALYA -DÜZLERÇAMI ORTAK BAHÇE DENEME ALANINDAKİ
ALTI FARKLI KIZILÇAM (*Pinus brutia* Ten.) POPULASYONUNDA cpSSR
BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Yusuf KURT

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez, 2008.03.0121.006 proje numarası ile, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

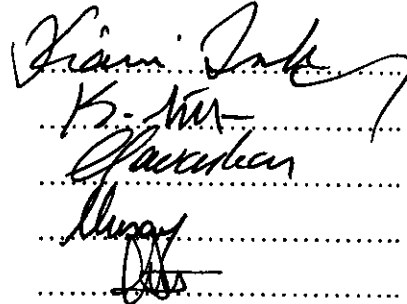
ANTALYA -DÜZLERÇAMI ORTAK BAHÇE DENEME ALANINDAKİ
ALTI FARKLI KIZILÇAM (*Pinus brutia* Ten.) POPULASYONUNDA cpSSR
BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Yusuf KURT

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez, 21/02/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ~~MAKULU~~ ile
kabul ~~MAKULU~~ edilmiştir.

Prof. Dr. Kâni IŞIK (Danışman)
Prof. Dr. Kenan TURGUT
Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN
Doç. Dr. Nuray KAYA
Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN


.....
.....
.....
.....
.....

ÖZET

ANTALYA -DÜZLERÇAMI ORTAK BAHÇE DENEME ALANINDAKİ ALTI FARKLI KIZILÇAM (*Pinus brutia* Ten.) POPULASYONUNDA cpSSR BELİRTEÇLERİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Yusuf KURT

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kâni IŞIK

Şubat 2011, xiv + 115 sayfa

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), Doğu Akdeniz havzasında doğal olarak yayılış göstermektedir. Deniz seviyesinden başlayıp Toros Dağlarına doğru yükselen iki yükselti kesitinde, alçak, orta ve yüksek zondan birer populasyon olmak üzere toplam altı doğal kızılçam populasyonu seçilmiştir. Herbiri, açık-tozlaşmış 10 aile içeren bu altı populasyonun dahil edilmesiyle Antalya bölgesinde 1979 yılında dört ayrı ortak bahçe deneme alanı kurulmuştur. Bu araştırmada, bu deneme alanlarından biri olan Düzlerçami ortak bahçe deneme alanındaki populasyonların genetik çeşitliliği, altı cpSSR (Kloroplast DNA basit dizi tekrarları) belirteci ile çalışılmıştır. Çalışılan altı lokustan Pt36480 dışındakiler polimorfik olarak saptandı. Analiz edilen altı populasyonda altı primer (lokus) için 29 allel bulundu. Kloroplast mikrosatellit allellerinin 60 farklı haplotip oluşturduğu gözlemlendi. Nei (1987)'in ortalama genetik çeşitliliği %92.83 olarak hesaplandı. Basamaklı mutasyon modeline (stepwise mutation model, SMM) göre populasyon içindeki bireyler arasındaki ortalama genetik uzaklık (D_{sh}^2) 4.87 olarak belirlendi. İki yükselti kesitinde, populasyonlar yükseltilerine göre çiftler halinde analiz edildiklerinde $R_{ST} = \%4.97$ ($P < 0.0655$) olarak bulundu. Populasyon içindeki aileler arasında da istatistiksel olarak yüksek ve önemli düzeyde genetik çeşitliliğin olduğu gözlemlendi ($R_{ST} = \%10.75$ ve $P < 0.0127$). Ayrıca, deneme alanında farklı yaşlara (13, 17, 30 yıl) ait kantitatif (morfolojik) karakter (boy ve/veya çap) verileri elde edildi. Morfolojik verilerden elde edilen Q_{ST} değerlerinin, incelenen

bütün yaş ve karakterlerde, moleküler verilerden elde edilen F_{ST} değerlerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. Çalışılan populasyonların benzerlik veya farklılıklarında; moleküler belirteçlerden elde edilen bilgiler ile kantitatif verilerden elde edilen bilgiler arasında paralellikler bulundu. Kantitatif karakterlerde gözlenen farklılıkların, populasyonların lokal adaptasyonu sonucu ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, tohum kaynaklarının seçilmesi, tohum transfer zonlarının belirlenmesi ve türün genetik kaynaklarının korunması gibi ormancılık çalışmalarında populasyonların bulunduğu yükselti zonuna ve populasyon-içi aile seçimine öncelik verilmesi gerektiği hususu, cpSSR belirteçleri kullanılarak elde edilen moleküler verilerle de desteklenmektedir. Bu nedenle, cpSSR belirteçleri, populasyonlar arasındaki benzerlik ve/veya farklılıkların ortaya konulmasında, uzun yıllar izlenmesi gereken ortak bahçe (veya orijin) denemelerine göre, daha kısa sürede bilgi üretme potansiyeline sahip görülmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Kızılçam, haplotipik çeşitlilik, lokal adaptasyon, yükseltiye bağlı çeşitlilik, genetik çeşitlilik

JÜRİ: Prof. Dr. Kâni IŞIK (Danışman)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN

Doç. Dr. Nuray KAYA

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC VARIATION WITH cpSSR MARKERS IN SIX DIFFERENT POPULATIONS OF TURKISH RED PINE (*Pinus brutia* Ten.) IN DUZLERCAMI COMMON-GARDEN TEST SITE AT ANTALYA

YUSUF KURT

Ph. D. Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Kâni IŞIK

February, 2011, xiv + 115 pages

Pinus brutia Ten. (Turkish red pine) is naturally distributed in eastern Mediterranean basin. Four common garden experiments on the species were established in 1979 with six natural populations, each including 10 open-pollinated families from three zones of two altitudinal transects, extending from coastal areas to high elevations in Antalya region of Turkey. In this study, genetic variation among and within the populations at Duzlercami common-garden test site was investigated by six cpSSR markers. Six primers were analyzed, and all, except Pt36480, were found to be polymorphic. A total of 29 alleles were found in six populations for six primers (loci). Combinations of cpSSR alleles constituted 60 different haplotypes. The overall mean of Nei (1987)'s genetic diversity was found as 92.83%. The average mean distance among individuals within populations (D_{sh}^2) was 4.87, according to an Stepwise Mutation Model (SMM). The genetic differentiation among altitudinal population pairs in two transects, estimated using R_{ST} , was 4.97% ($P < 0.0655$). A high and significant level of the genetic variation was found to be among families within populations ($R_{ST} = 10.75\%$ and $P < 0.0127$). Data on quantitative trait(s) (total height and/or diameter) were also obtained in the test site at different ages (13, 17, 30 years). The degree of quantitative differentiation (Q_{ST}) based on morphological data was higher values than molecular (F_{ST}) values in all traits and ages analyzed. There were parallelism between the results obtained from cpSSR markers and the results from quantitative traits. The differentiation in quantitative traits appears to be due to local adaptation of populations.

Previous studies on quantitative traits in *P. brutia* indicate that seed-source elevation and within-population variation should be given priority in selection and breeding of the species. These findings are also supported by molecular data obtained by cpSSR markers in this study. Therefore, results from cpSSR markers appear to have a higher potential to determine genetic variation than common-garden experiments, which require many years to follow.

KEY WORDS: Turkish red pine, haplotypic variability, local adaptation, altitudinal variation, genetic diversity

COMMITTEE: Prof. Dr. Kâni IŞIK (Supervisor)
Prof. Dr. Kenan TURGUT
Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN
Assoc. Prof. Dr. Nuray KAYA
Asst. Prof. Dr. Cengiz İKTEN

ÖNSÖZ

Türkiye’de orman alanları - özellikle tarım, sanayi ve yerleşme alanlarının genişletilmesi başta olmak üzere - çeşitli insan baskılarıyla tahrip ve/veya yok edilmektedir. Bunun yanı sıra, her yıl meydana gelen orman yangınları ile de geniş orman alanları yok olmaktadır. Sonuç olarak, orman alanlarımız gittikçe daralmakta ve mevcut ormanlarımızın verim gücü düşmektedir. Zaten odun hammaddesi açığı olan ülkemizde gelecek yıllardaki talep açığını kapatmak, hiç olmazsa biraz azaltmak için ağaç türleri popülasyonlarının genetik yapısının bilinmesi, genetik tabanı geniş olan ve hızlı gelişen orman ağacı türleri ile döl ve/veya orijin denemeleri kurulup bunlardan bilgi üretilmesi ve yoğun ıslah çalışmaları yapılması gerekmektedir. Ülkemizde en geniş doğal yayılış alanına sahip olması ve hızlı gelişen türler arasına girmesi bakımından kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), Türkiye’de ıslah çalışmaları için ideal bir orman ağacı türüdür. Bu nedenle, Kızılçam “Türkiye Milli Ağaç Islahı ve Tohum Üretimi Programı (1994-2003)” kapsamında öncelik verilen türler arasına alınmıştır.

Dünya’da ve Türkiye’de kızılçam ile ilgili morfolojik ve moleküler düzeyde birçok çalışma yapılmıştır. Türkiye’de, yukarıda bahsedilen özellikleri nedeniyle diğer türlere göre kızılçam’a çok daha fazla önem verilmektedir. Bundan dolayı, farklı coğrafik bölgelerde türün tohum bahçeleri, ortak bahçe deneme alanları ve/veya orijin denemeleri kurulmuş ve kurulmaktadır. Bu çalışma, literatür bilgimize göre, morfolojik karakter verilerinin ve kloroplast basit dizi tekrarlarının (cpSSR) birlikte kullanılarak kızılçam’ın popülasyon-içi ve popülasyonlar-arası genetik çeşitliliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu çalışmanın gelecekte kızılçam ile yapılacak olan gen kaynaklarının korunması, genetik ıslah, tohum transfer zonlarının belirlenmesi ve ağaçlandırma çalışmalarına ışık tutmasını dilerim.

Bu araştırma sırasında bana her türlü çalışma olanağı veren ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam ve Akademik Danışmanım Sayın Prof. Dr. Kâni IŞIK’a, İspanya’daki moleküler genetik laboratuvarında (Unidad de Genetica Forestal, CIFOR-INIA, Madrid-SPAIN) çalışma olanağı veren ve her konuda yardımcı olan Dr. Santiago Cesar GONZALEZ-

MARTÍNEZ'e, Dr. Ricardo ALÍA'ya, mikrosatellit tekniğini öğrenmemde yardımcı olan teknisyen Carmen GARCÍA'ya, tezin son şeklini almasında değerli önerilerini esirgemeyen Prof. Dr. Kenan TURGUT'a (Akdeniz Üni., Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN'a (Süleyman Demirel Üni., Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü), Doç. Dr. Nuray KAYA'ya (Akdeniz Üni., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü), Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e (Akdeniz Üni., Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü), Doç. Dr. Mehmet KARACA'ya (Akdeniz Üni., Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), Doç. Dr. Nebi BİLİR'e (Süleyman Demirel Üni., Orman Fakültesi), çalışmada kullanılan populasyonlardan ibre örneklerinin toplanması için lojistik destek sağlayan Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürü Dr. Neşat ERKAN'a ve müdürlük çalışanlarına, arazi çalışmaları sırasında yardımlarını gördüğüm Akdeniz Üni., Biyoloji Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM'a, Arş. Gör. B. Banu BİLGİN'e, Arş. Gör. İlker ÇİNBİLGEL'e, Arş. Gör. Sezgi ŞEREF GÜN'e, Arş. Gör. Eşref DEMİR'e ve lisans öğrencisi Zeynep ÖZUĞUR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, bu tez projesini 2008.03.0121.006 proje numarası ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, "Yurt-İçi Yurt-Dışı Bütünleştirilmiş Doktora Bursu (BDP)" ile destekleyen ve doktora çalışmalarım sırasında bir yıl süre ile İSPANYA'da çalışma olanağı sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Grubu'na teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak araştırmanın başından sonuna kadar desteklerini esirgemeyen ve hem yurt içinde hem de yurt dışında kendilerinden uzakta bulunmama rağmen sabırlı desteklerini gördüğüm aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kızılçam (<i>Pinus brutia</i> Ten.)’ın Doğal Yayılışı ve Genetik Çeşitliliği.....	5
1.2. Basit Dizi Tekrarları (Mikrosatellitler) ve Kullanımları	7
1.3. Çalışmanın Amacı	11
2. MATERYAL ve METOT.....	12
2.1. Düzlerçamı Ortak Bahçe Deneme Alanı ve Deneme Deseni	12
2.2. İbre Örneklerinin Toplanması ve Kurutulması.....	17
2.3. DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini	19
2.4. Primerlerin Belirlenmesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	21
2.5. Dikey Poliakrilamid Jelde Analizler.....	23
2.6. Morfolojik Verilerin Eldesi	30
2.7. İstatistiksel Analizler	30
3. BULGULAR.....	33
3.1. Populasyonların Haplotip ve Allel Analizi.....	33
3.2. Populasyonların Genetik Çeşitlilik Parametreleri	38
3.3. Populasyonların Ortak ve Özgü Haplotipler Bakımından Karşılaştırılması	41
3.3.1. Doyran populasyonu	42
3.3.2. Sarılar populasyonu	44
3.3.3. Bük populasyonu	46
3.3.4. Murtbeli populasyonu	48
3.3.5. Kapan populasyonu.....	49
3.3.6. Hacıbekar populasyonu.....	51
3.4. Populasyon Çiftleri Arasındaki Jaccard Benzerlik Katsayıları	53
3.5. Populasyon Çiftleri Arasındaki Genetik Mesafe (F_{ST}) Değerleri.....	54

3.6. Morfolojik Verilerin Analizi	55
4. TARTIŞMA	56
4.1. Haplotip ve Allel Çeşitliliği.....	56
4.2. Populasyonların Karşılaştırılması.....	59
4.3. Q_{ST} ve F_{ST} Değerlerinin Karşılaştırılması	66
5. SONUÇ	75
6. KAYNAKLAR	78
7. EKLER.....	93
EK-1: Düzlerçamı deneme alanındaki yerleşim planı ve örneklenen ağaçlar	93
EK-2: Deneme alanında bulunan ailelerin konum listesi	98
EK-3: Çalışmada izlenen DNA izolasyon yöntemi	100
EK-4: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	105
EK-5: İstatistiksel hesaplamalara ait bilgiler ve ilgili formüller.....	107
EK-6: Tanımlamalar	114
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Adenin
cm	Santimetre
C	Sitozin
°C	Santigrat derece
dNTPs	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
E	Boylam
g	Gram
G	Guanin
km	Kilometre
L	Litre
m	Metre
mA	Miliamper
M	Molarite (mol / Litre)
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mg	Miligram (10 ⁻³ gram)
mM	Milimolar (10 ⁻³ Molar)
ml	Mililitre (10 ⁻³ Litre)
n	Tekrar sayısı
ng	Nanogram (10 ⁻⁹ gram)
N	Enlem
T	Timin
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶ Litre)
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ Molar)
U	Ünite (enzim birimi)
Volt	Voltaj
w	Watt

Kısaltmalar

AFLP	Arttırılmış fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AMOVA	Moleküler varyans analizi (Analysis of Molecular Variance)
APS	Amonyum peroksit disulfat
bç	Baz çifti
bil.	Bileşen
BAPS	Bayesian Analysis of Population Structure
Bkz.	Bakınız
BSA	Bovin serum albumin
cpSSR	Kloroplast basit dizi tekrarları
ddH ₂ O	Çift distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
D ² _{sh}	Goldstein vd (1995)'in bireyler arasındaki genetik uzaklık değeri
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
F _{IS}	Populasyonlardaki gametlere oranla bireyleri oluşturmak için birleşen gametler arasındaki korelasyonun bütün populasyonlar göz önüne alındığında ortalaması (Populasyon içindeki gerçek heterozigotluk düzeyinde beklenen değerden sapma olup olmadığını gösterir).
F _{IT}	Tüm populasyonların gametlerine oranla birleşen bireyleri üretmek için birleşen gametler arasındaki korelasyon (Toplam gerçek heterozigotluk düzeyinde beklenen değerden sapma olup olmadığını gösterir).
F _{ST}	Tüm populasyonların gametlerine oranla her bir populasyon içindeki rastgele gametler arasındaki korelasyon (Populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın derecesini gösterir).
F-stat	Wright (1965)'in F-istatistiği değerleri
Hap.	Haplotip
H _S	Populasyon-içi genetik çeşitlilik
H _T	Toplam genetik çeşitlilik
JBK	Jaccard benzerlik katsayısı
OGM	Orman Genel Müdürlüğü

P	Olasılık değeri
<i>P.</i>	<i>Pinus</i>
Primer F	Forward (ileri) primer
Primer R	Reverse (geri) primer
Pt	<i>Pinus thunbergii</i> Parl.
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Q _{ST}	Kantitatif karakterlerin ölçülmesi ile populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmayı gösteren değer
RAPD	Rasgele arttırılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
R _{ST}	Slatkin (1995)'in alleller arasındaki büyüklük farkının kareler ortalaması alınarak elde ettiği değer. Populasyonlar arasındaki farklılaşmanın derecesini gösterir.
sp.	Species (Tür)
Sd.	Serbestlik derecesi
SSM	Basamaklı mutasyon modeli (Stepwise Mutation Model)
SSRs	Basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats)
Taq Pol.	<i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen ve yüksek sıcaklıklara (90-95 °C) dayanıklı DNA polimeraz enzimi
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetrametiletillen-diamin
TUBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages
Üni.	Üniversite
vb.	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri
Var.	Varyans

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kızılçam'ın doğal yayılış alanları.....	5
Şekil 2.1.	Populasyonların coğrafik konumları ve deneme alanlarının kurulduğu yerler.....	13
Şekil 2.2.	Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanının uydu görüntüsü.....	15
Şekil 2.3.	Düzlerçamı deneme alanından genel bir görüntü.....	16
Şekil 2.4.	Bireylerin etiketlenmesi.....	16
Şekil 2.5.	Etiketlenmiş bir birey (K01)	16
Şekil 2.6.	Genç ibre örnekleri	17
Şekil 2.7.	Kızılçamda ibre örneklerinin toplanması.....	17
Şekil 2.8.	Silika jeli değiştirilmiş bir örnek (mavi silika jelli) ve silika jelinin değiştirilmesi gereken bir örnek (pembe silika jelli)	18
Şekil 2.9.	DNA miktarının belirlenmesinde kullanılan bir agaroz jel örneği	20
Şekil 2.10.	Jel hazırlarken kullanılan çözeltiler ve malzemeler	23
Şekil 2.11.	Buzdolabında (+4 °C) bekletilmek için sarılmış jel örneği	25
Şekil 2.12.	Poliakrilamid jele yükleme yapılırken.....	26
Şekil 2.13.	Pt1254 primerine ait bir jel görüntüsü.....	27
Şekil 2.14.	Pt15169 primerine ait bir jel görüntüsü.....	28
Şekil 2.15.	Pt30204 primerine ait bir jel görüntüsü.....	28
Şekil 2.16.	Pt36480 primerine ait bir jel görüntüsü.....	29
Şekil 2.17.	Pt71936 primerine ait bir jel görüntüsü.....	29
Şekil 2.18.	Pt87268 primerine ait bir jel görüntüsü.....	30
Şekil 3.1.	Kızılçam populasyonlarında çalışılan altı primerin (lokusun) her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre frekans dağılımları.....	36
Şekil 3.2.	Populasyonların enlem (dikey eksen) ve boylamlarına (yatay eksen) göre BAPS analizi sonuçları	41
Şekil 3.3.	Çalışılan altı kızılçam populasyonunda görülen populusyona özgü haplotip sayıları.....	41
Şekil 3.4.	Doyran populasyonunun diğer populasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının populasyonlar arasında dağılımı (%)	44
Şekil 3.5.	Sarılar populasyonunun diğer populasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının populasyonlar arasında dağılımı (%)	46

Şekil 3.6.	Bük popülasyonunun diğcr popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%).....	47
Şekil 3.7.	Murtbeli popülasyonunun diğcr popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%).....	49
Şekil 3.8.	Kapan popülasyonunun diğcr popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%).....	51
Şekil 3.9.	Hacıbekar popülasyonunun diğcr popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%).....	52
Şekil 3.10.	Çalışılan altı kızılçam popülasyonunun sahip oldukları haplotipler bakımından birbirine yakınlık ve benzerlik derecelerini gösteren fenogram	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Denemede kullanılan kızılçam populasyonlarına ait coğrafik bilgiler	14
Çizelge 2.2.	Denemede yer alan kızılçam populasyonlarına ait aile kodları	14
Çizelge 2.3.	Kullanılan primerler ve sekansları	21
Çizelge 2.4.	Taq-Ekogen ile amplifiye olan primerler ve PZR bileşenleri	22
Çizelge 2.5.	Taq-Invitrogen ile amplifiye olan primerler ve PZR bileşenleri	22
Çizelge 3.1.	Çalışılan altı farklı kızılçam populasyonunda altı ayrı primer için gözlenen 60 haplotip ve bu haplotiplerin baz çifti olarak sahip oldukları allel büyüklükleri	34
Çizelge 3.2.	Kızılçam populasyonlarında çalışılan primerler, her bir primerdeki allel (büyüklüklerine göre) ve her bir populasyonda ilgili allellere sahip olan birey sayıları	37
Çizelge 3.3.	Kızılçamda çalışılan altı populasyonda genetik çeşitlilik parametreleri ve haplotipler arasındaki uzaklık	38
Çizelge 3.4.	Haplotipler arasındaki uzaklığa (D^2_{sh}) göre moleküler varyans analiz (AMOVA) sonuçları	40
Çizelge 3.5.	Kızılçamda çalışılan altı populasyonun sahip oldukları ortak haplotip çeşitlerinin sayıları	42
Çizelge 3.6.	Doyran populasyonunun haplotipleri ve frekansları	43
Çizelge 3.7.	Sarılar populasyonunun haplotipleri ve frekansları	45
Çizelge 3.8.	Bük populasyonunun haplotipleri ve frekansları	46
Çizelge 3.9.	Murtbeli populasyonunun haplotipleri ve frekansları	48
Çizelge 3.10.	Kapan populasyonunun haplotipleri ve frekansları	50
Çizelge 3.11.	Hacıbekar populasyonunun haplotipleri ve frekansları	51
Çizelge 3.12.	Çalışılan altı kızılçam populasyonu için hesaplanan Jaccard benzerlik katsayıları	53
Çizelge 3.13.	Populasyon çiftleri arasındaki genetik mesafe (F_{ST}) ve farklılık derecesini gösteren olasılık (P) değerleri	55
Çizelge 3.14.	Farklı yaş ve karakterlere ait varyans ve Q_{ST} değerleri	55

1. GİRİŞ

Günümüzde, bir yandan hızlı nüfus artışı, diğer yandan doğal kaynaklarımızın çoğu kez yanlış ve bilinçsiz kullanımı sonucu biyolojik zenginliklerimiz hızla tükenmektedir. Biyolojik zenginliklerimizden biri olan ormanlar kendi kendini yenileyebilen doğal kaynaklardan biridir. Bu kaynaklardan sürekli yarar sağlayabilmek için ormanların devamlılığını sağlamak zorunludur. Ancak, ülkemizde orman alanları, özellikle tarım, sanayi ve yerleşme alanlarının genişletilmesi başta olmak üzere, çeşitli baskılarla karşı karşıya bulunmaktadır. Bu baskılardan dolayı, orman alanlarımız gittikçe daralmakta, zaten odun hammaddesi açığı olan ülkemizde mevcut ormanlarımızın verim gücü düşmektedir. Gelecek yıllardaki talep açığını kapatmak, hiç olmazsa biraz azaltmak için alınması gerekli önlemlerden birisi orman ağacı türlerimizin genetik çeşitliliğini araştırmaktır. Orman alanları, genetik çeşitlilikle ilgili bilgilere dayanarak genetik bakımdan üstün özellikli tür ve ırklar ile ağaçlandırılmalıdır (Işık vd 1987, Boydak vd 2006, Tunçtaner 2007).

Türkiye’de son 10 yıl içerisinde 12.000 hektar orman alanı yanarak yok olmuştur (Çevre ve Orman Bakanlığı 2005). Örneğin, Türkiye’de 1993-2003 yıllarını içine alan 10 yıllık dönemde toplam 20.632 adet orman yangını meydana gelmiştir. Bu sürede yalnızca Antalya Orman Bölge Müdürlüğü denetimindeki ormanlarda yılda ortalama 162 adet orman yangını çıkmıştır (Orman Genel Müdürlüğü 2003, Ertuğrul 2005). Orman yangınları sonucu tahrip olan alanların yeniden ağaçlandırılması yasal bir zorunluluktur (Öksüz 2003). Bunun için de ağaçlandırmalarda kullanılacak ağaç türü popülasyonlarının genetik yapısının bilinmesi ve genetik tabanı geniş olan ve hızlı gelişen orman ağacı türleri ile döl ve/veya orijin denemeleri kurulup bunlardan bilgi üretilmesi ve yoğun ıslah çalışmaları yapılması gerekmektedir (Işık 1999a).

Canlı doğal kaynakların sürdürülebilirlik ilkeleri çerçevesinde kullanılabilmesi için öncelikli olarak yapılması gereken işlemlerden biri, ilgili canlı türünün genetik çeşitliliğinin araştırılması ve ortaya konulmasıdır (Conkle 1980, Conkle vd 1988). İlgili duyulan bir popülasyonun genetik bakımdan üstün olup olmadığının belirlenmesi, ilgili türün popülasyonlarının genetik yapısının ve genetik çeşitliliğinin incelenmesi ile

mümkündür. Genetik çeşitlilik bir türün gen havuzundaki kalıtsal bilginin çeşitliliği olarak tanımlanabilir. Genetik çeşitlilik, mutasyon ve kromozomal değişimler, göç, doğal seçim, populasyon büyüklüğü ve eşleşme modellerinin etkisiyle şekillenir. Bir canlı türü, yetiştiği ortamda belirli bir gen (lokus) için ne kadar çeşitli allellere sahipse o tür genetik olarak o derece zengin demektir (Strickberger 1996, Freeman ve Herron 2001, Graham vd 2003).

Canlı populasyonlarında genetik çeşitliliğin ve genetik yapının belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalar, kantitatif (morfolojik) karakterlerle ilgili verilere dayanmaktadır. Ancak canlının fenotipik yapısına yansıyan (morfolojik olarak ifade edilen) çeşitlilik, genetik çeşitliliğin çok küçük bir kısmını oluşturmaktadır (Mettler ve Gregg 1969, Gruies 1984, Gillet 1999). Genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı fenotipik olarak ifade edilmediğinden bir türün genetik çeşitliliği sadece morfolojik karakterlere dayanarak tam olarak açıklanamaz. Kuşkusuz, uyum değeri olan birçok morfolojik karakterin değerlendirilmesiyle elde edilen bilgiler, bir türün populasyonu içindeki ve populasyonları arasındaki genetik çeşitliliği ve genetik benzerliği saptamak için pek çok bilgiler ortaya koyar (Mettler ve Gregg 1969, Hartl ve Clark 1997). Ancak genotip $\times$ çevre etkileşimi, pek çok morfolojik karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi (poligenik kalıtım) ve bir genin birden fazla karaktere etki etmesi (pleiotropi veya polifenik kalıtım) gibi nedenlerden dolayı, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde morfolojik karakterler her zaman yeterli olmamaktadır (Hartl ve Clark 1997). Ayrıca, genotipik farklılıklar kendilerini her zaman fenotipik olarak (morfolojik yapıda) göstermemektedirler. Fenotipik olarak benzer görünen bireyler, aslında genotipik olarak farklı olabilirler (Işık 1997). Bu farklılığı saptayabilmek için fenotipin oluşumuna yol açan olaylar dizisinin daha ilk basamaklardan (DNA düzeyinden) başlayarak incelenmesi gerekir. Bu nedenle DNA düzeyinde yapılan bir analiz, olaylar dizisinin diğer basamaklarındaki etkilerden arınmış halde bireyin genotipi hakkında daha sağlıklı bilgiler vermektedir (Ouborg vd 1999, Varshney vd 2005, Altun 2006).

Orman ekosistemleri, çok kısa mesafelerde değişebilen farklı doğa birimlerinden oluşmaktadır. Özellikle Türkiye’de ormanların çoğunun yer aldığı dağlık bölgelerde, iklim, toprak ve biyolojik kaynaklı çevre etmenleri daha kısa mesafelerde ve daha sık

değişmektedir. Aynı türün yan yana bulunan iki komşu popülasyonu bile, birbirlerinden farklı çevre etmenleri ve farklı seleksiyon basıncı altında bulunacakları için, birbirlerinden farklı gen havuzuna ve gen kombinasyonlarına sahip olabilirler. Bu nedenle, kısa mesafelerde farklı uyum değerlerine sahip olan farklı ırklar ve alt ırklar oluşabilir. Hem yerli hem de yabancı pek çok ağaç türü üzerinde sonuçlandırılan çalışmalar, çevresel faktörlerin değişimine paralel olarak, kısa mesafelerde farklı yerel ırkların varlığını ortaya koymuştur (Bradshaw 1972, Hamann vd 1998, Işık 1999a, b). Bu yerel ırklar üzerinde doğal seleksiyonun etkisini anlamak için nötral markır'lerden (belirteç) elde edilen bilgiler ile kantitatif karakterlerden elde edilen bilgiler karşılaştırılmaktadır (Gonzalez-Martinez vd 2002, Whitlock 2008). Sirke sineği (*Drosophila* sp.)'nden yonca (*Medicago* sp.)'ya, Tale teresi (*Arabidopsis* sp.)'nden meşe ağacı (*Quercus* sp.)'na kadar birçok canlı türünde nötral belirteçlerden elde edilen sonuçlar ile kantitatif karakter sonuçları karşılaştırılmıştır (Long ve Singh 1995, Bonnin vd 1996, Yang vd 1996, Kremer vd 1997, Kuittinen vd 1997, Evanno vd 2006, Knopp vd 2007). Nötral belirteçlerden elde edilen genetik çeşitlilik parametrelerinin kantitatif karakterlerden elde edilen veriler ile karşılaştırılması, yaşam döngüleri kısa olan (bir ve/veya birkaç yıl) canlı türlerine göre orman ağaçlarında daha zordur. Çünkü orman ağaçlarının uzun yaşam süresi ve her bir bireyin büyük hacimli olması, birkaç nesilde görülebilecek değişimlerin genetik deneyler yapılarak gösterilmesini sınırlandırmaktadır. Buna karşın, orman ağacı türleriyle kurulan ortak bahçe deneme alanları ve/veya orijin denemeleri, farklı çevre koşullarına adaptasyonun genetik tabanını anlamak için çok değerli bilgiler vermektedir (Kremer vd 1997, 2000, Ritland 2000, Gonzalez-Martinez vd 2002).

Kantitatif karakterler ölçülerek popülasyonlar arasında genetik çeşitlilik derecesinin belirtildiği değer Q_{ST} değeridir. Nötral belirteçlerden elde edilen genetik farklılaşma derecesini gösteren değer ise, F_{ST} değeridir. Q_{ST} ile F_{ST} değerleri karşılaştırılarak evrimsel güçlerin popülasyonların farklılaşması üzerindeki etkisi belirtilmektedir (Whitlock 2008). Q_{ST} değeri, F_{ST} değerinden önemli ölçüde büyük ise popülasyonların incelenen karakterlerinin farklılaşmasına, genetik sürüklenmenin tek başına beklenenden daha fazla etki ettiği yorumu yapılır. F_{ST} değeri, Q_{ST} değerinden önemli ölçüde büyük ise incelenen karakterler üzerine dengeleyici seleksiyonun etkili olduğu

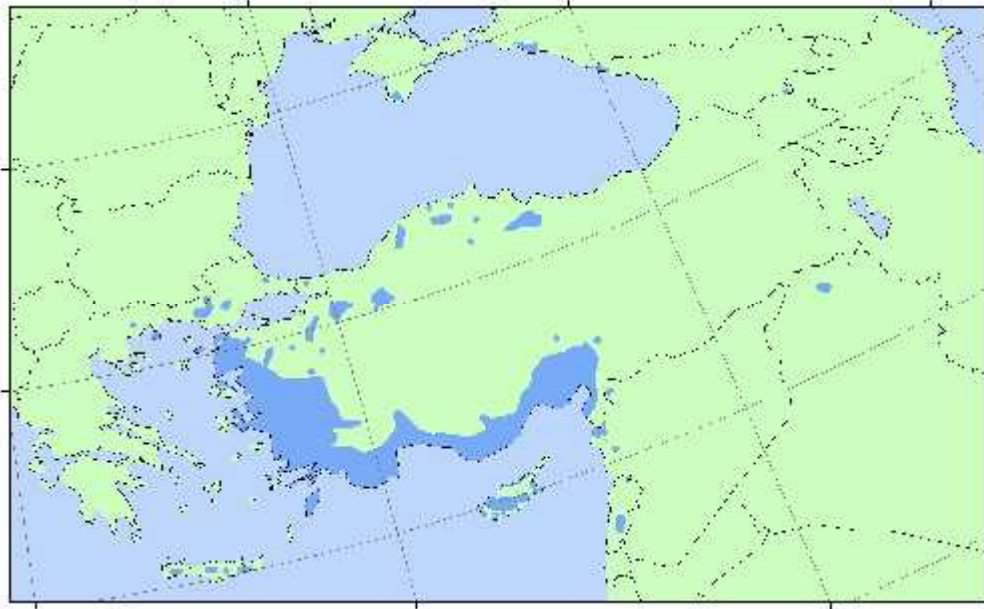
ve bunun bütün popülasyonlarda benzer şekilde görüldüğünden bahsedilir (Leinonen vd 2008, Whitlock 2008). Bu durum, genetik sürüklenmenin görüldüğü popülasyonlarda bile benzer şekilde işler. Q_{ST} değeri ile F_{ST} değerinin birbirine yakın bulunması durumunda ise, incelenen karakterler üzerine seleksiyonun popülasyonlarda heterojen bir şekilde işlediği göz önünde bulundurulur (Kremer vd 2000, Gonzalez-Martinez vd 2002, Leinonen vd 2008, Whitlock 2008). Bu bakımdan kantitatif karakterler ile nötral belirteçlerden elde edilen verilerin birlikte ele alınarak karşılaştırılması, popülasyonların farklılaşma sürecinde evrimsel güçlerin etkisini anlamak için kullanılan etkili yöntemlerden biridir.

Orman ağaçlarında kantitatif karakterler ile nötral belirteçlerin karşılaştırılması için ideal çalışmalardan biri, ortak bir alanda, ortak bahçe deneme alanlarının (orijin ve/veya döl denemeleri) kurulmasıdır. Bu şekilde, orman ağaçlarının farklı popülasyonları aynı çevre koşulları altında yetiştirilmektedir. Böylece incelenen bütün popülasyonlar ve/veya bireyler üzerindeki çevre etkisi benzer hale getirilmektedir (Kremer vd 2000, Gonzalez-Martinez vd 2002, Whitlock 2008).

Türkiye’de, en geniş doğal yayılım alanına sahip bir tür olması, hızlı gelişen türler arasına girmesi ve eldeki mevcut bilgilere göre genetik çeşitliliğinin yüksek olması bakımından kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) Türkiye’de ıslah çalışmaları için ideal bir orman ağacı türüdür (Işık vd 1987). Kızılçam, yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı Türkiye’de çok önemli bir orman ağacı türüdür. Nitekim kızılçam “Türkiye Milli Ağaç Islahı ve Tohum Üretimi Programı (1994-2003)” kapsamında öncelik verilen türler arasına alınmıştır (Öztürk ve Şıklar 2000, Boydak vd 2006). Türün sürdürülebilirlik ilkeleri çerçevesinde kullanılabilmesi için öncelikli olarak doğal popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi gerekmektedir.

1.1 Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)’ın Doğal Yayılışı ve Genetik Çeşitliliği

Kızılçamın ana yayılışı Türkiye sınırları içindedir (Fady vd 2003, Boydak 2004, Boydak vd 2006). Kızılçam, Türkiye’deki ana yayılışının dışında Yunanistan, Kıbrıs, Suriye ve Lübnan’ın yanı sıra küçük gruplar şeklinde Irak ve İran’da da doğal olarak yetişmektedir (Şekil 1.1). Kızılçamın, ana yayılış alanı Türkiye’de bulunduğu için bilimsel yayınlarda çoğunlukla “Turkish red pine” olarak belirtilmektedir. Ayrıca, “brutian” ve/veya “calabrian pine” olarak da adlandırılmaktadır (Kasaplıgil 1978, Frankis 1993, Boydak vd 2006).



Şekil 1.1. Kızılçam’ın doğal yayılış alanları (Fady vd 2003)

Kızılçamın Türkiye’deki doğal yayılışı Akdeniz bölgesi, Ege bölgesi, Marmara bölgesi ve Karadeniz bölgesini kapsar (Selik 1958, Alemdağ 1962, Davis 1965, Şefik 1965, Neyişçi 1987). Kızılçam farklı bölgelerde yayılış göstermesine rağmen optimum yetişmesini Akdeniz ikliminin görüldüğü bölgelerde gerçekleştirir. Bu bağlamda, Türkiye’deki kızılçam yayılış alanının %47’si Akdeniz bölgesinde ve %40’ı Ege bölgesinde yer alır (Neyişçi 1987). Kızılçamın, kalkerli topraktan dolomit’e ve hatta volkanik topraklara kadar uzanan değişik toprak tiplerinde yetiştiği bildirilmiştir. Ayrıca, deniz kıyısından 1500 m yükseltiye kadar farklı ekolojik ve iklimsel faktörlerin

etkili olduğu ortamlarda yayılış göstermektedir (Barbero vd 1998, Boydak 2004, Boydak vd 2006).

Kızılçam, Türkiye’de en geniş doğal yayılışa sahip olan (5.4 milyon ha), hızlı gelişen ve ağaçlandırmalarda en çok kullanılan bir türdür (Bkz. Şekil 1.1). Çok çeşitli endüstriyel kullanım yerleri olan bu tür, odununun uygun lif boyutlarına sahip olması nedeniyle kağıt endüstrisinde de kullanılmaktadır. Bu durum, kızılçamda hacim artımını, dolayısıyla büyüme karakteri ıslahını ön plana çıkarmaktadır. Ancak, kızılçamın ülkemizdeki geniş yayılış alanları dikkate alındığında, hızlı gelişmesi yanında, odun ve gövde kalite özellikleri de ıslah bakımından önemli olmaktadır (Işık vd 1999, Boydak vd 2006, Orman Genel Müdürlüğü 2006).

Kızılçam ile ilgili yapılan ilk genetik çeşitlilik çalışmaları, taksonomik olarak Halep çamı (*Pinus halepensis* Mill.) ile olan ilişkisini araştırmaya yönelik olmuştur. Çünkü kızılçam 1952 yılına kadar Halep çamının bir varyetesi olarak biliniyordu. Önceleri morfolojik ve anatomik karakterler ile daha sonra da kimyasal belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalarda kızılçam ile Halep çamının benzerlik ve/veya farklılıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır (Selik 1963, Little ve Critchfield 1969, Calamassi vd 1988, Klaus 1989, Weinstein 1989a, b, Quezel 2000, Schiller 2000). Yakın geçmişte izoenzim ve DNA belirteçleri ile yapılan çalışmalarda kızılçam ile Halep çamının sistematikteki yerleri ve farklı türler oldukları kesin olarak ortaya konulmuştur (Krupkin vd 1996, Panetsos vd 1997, 1998, Bucci vd 1998, Schiller 2000).

Kızılçamın farklı bir tür olarak alındığı ilk bilimsel çalışmalarda ise boy, çap vb. morfolojik karakterler ile anatomik karakterler incelenmiştir (Selik 1958, Palmberg 1975, Işık 1986, 1993, 1997, Işık ve Kaya 1993). Kızılçamda değişik morfolojik karakterleri ele alarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar günümüzde de devam etmektedir (Özer 1997, Işık 1998, Işık ve Işık 1999, Işık vd 1999, 2002, Bilir vd 2002, 2004, 2005, Çalışkan 2006, Alan ve Yıldız 2006). Günümüzde ayrıca, türün morfolojik özellikleri yanında protein, terpenler ve DNA düzeyinde de çalışmalar yapılmaktadır. Protein düzeyinde yapılan izoenzim çalışmaları ile Türkiye’deki belirli popülasyonların genetik çeşitliliği üzerinde bazı ek bilgiler ortaya konulmuştur (Conkle

vd 1988, Yahyaoğlu vd 1993, Schiller 1994, Kara vd 1997, Panetsos vd 1997, 1998, Gülbaba ve Özkurt 1998, 2001, Korol vd 2002a, b, Kaya vd 2006, Semiz 2009). Kızılçamda moleküler belirteçler (RAPD, RFLP, AFLP ve SSR gibi) kullanılarak DNA düzeyinde yapılan çalışmalar ise, morfolojik ve izoenzim çalışmalarına göre halen çok sınırlı kalmıştır (Kaya ve Neale 1995, Özer 1997, Bucci vd 1998, Drouzas vd 2000, Lise 2000, Özel 2001, İçgen 2002, Velioğlu vd 2002, Kandemir vd 2004, İçgen vd 2006).

Literatür bilgimize göre, kızılçamın ele alındığı ve yukarıda bir kısmından bahsedilen çalışmalardan sadece bir tanesinde (Bucci vd 1998) kloroplast basit dizi tekrarları veya mikrosatellitler (SSR) olarak adlandırılan moleküler belirteçler kullanılmıştır.

1.2 Basit Dizi Tekrarları (Mikrosatellitler) ve Kullanımları

Genetik çeşitliliğin DNA düzeyinde araştırılması için kullanılan en hızlı ve etkili metodlardan birisi basit dizi tekrarlarının veya mikrosatellitlerin çeşitliliğini analiz etmektir. Bu teknik, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR veya PCR) tabanlı olup araştırılan gen-içi ve/veya genler-arası bölgelerdeki nükleotid dizilimlerinin tekrar sayısındaki farklılıkların belirlenmesine dayanmaktadır. Mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesinde, çalışılan tekrarlı bölgenin veya lokusun yan bölgelerine (flanking) tamamlayıcı (komplementer) primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılır ve elde edilen fragmentler elektroforetik olarak analiz edilir (Anzidei vd 1999, Scotti vd 1999, Bandelj vd 2004, Varshney vd 2005).

Mikrosatellitler 1-6 nükleotidden oluşan tekrarlı DNA dizileridir. Mikrosatellitler çekirdek, kloroplast ve mitokondri genomunda bol miktarda bulunurlar ve genomda homojen dağılmışlardır. Tekrarlanan dizi genellikle (CA)_n, (TG)_n, (AG)_n, (CAG)_n, (TAT)_n ve (AAT)_n tekrarlarıdır. Mikrosatellit tekrarları, kusurlu, kusursuz ve bölünmüş veya bileşik olmak üzere üç tipe ayrılır. Ayrıca, bu üç tip arasında her türlü kombinasyon görülebilir (Hancock 1998, Navascues ve Emerson 2005, Oliveira vd 2006). Bunlar, genellikle büyüklükleri 100 baz çifti (bç)'ne kadar olan benzersiz dizi olduklarından kolaylıkla çoğaltılabilirler. Önceleri genomdaki bu tekrarlı diziler “junk (hurda) DNA” olarak adlandırılmaktaydı, çünkü bu dizilerin herhangi bir görevi

olmadığı düşünülürdü. Bugün hala, mikrosatellitlerin rolü çok iyi bilinmemesine rağmen, kodlamada işlevsel rol aldıkları ve düzenleyici element olarak görev yaptıkları bildirilmiştir. Ayrıca, araştırmacılar için moleküler belirteç olarak kullanılabilmeleri bakımından önemli bir moleküler araç olmaktadır (Hancock 1998, Kashi ve Soller 1998, Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006). Mikrosatellitler genomda kodlanan ve kodlanmayan bölgelerin her ikisinde de bulunmaktadır. Ancak, kodlanmayan bölgelerdeki frekansları kodlanan bölgelerdekinden daha yüksektir. Mikrosatellitlerin bazı tipleri belirli bir tür ve/veya grup için yaygın ve spesifik olmasına karşın analiz edilen bütün organizma genomlarında mikrosatellitlere rastlanmıştır. Bitki genomlarında daha sık görülen mikrosatellitler genellikle (AT)_n ve (GT)_n dinükleotit tekrarları iken, hayvanların genomunda (AC)_n tekrarları daha yaygındır. Trinükleotit dizilimlerde ise TAT tekrarları çok sık görülmektedir (Hancock 1998, Varshney vd 2005, Oliveira vd 2006).

Mikrosatellit analizlerinde epistatik etkileşimler söz konusu olmadığı için genotiplerin doğrudan saptanması mümkündür. Mikrosatellitler kodominant olarak kalıtıldığından genetik çaprazlamalar gerektirmeksizin homozigot ve heterozigot genotipler kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebilir. Bu konuda önemli bir nokta da, mikrosatellitlerin nötr belirteç olmaları yani seleksiyon ve çevre baskısı tarafından etkilenmemeleridir. Bu özellik genetik çeşitliliğin doğrudan ölçülmesine olanak sağlar (Gillet 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Bandelj vd 2004). Mikrosatellit belirteçlerin önemli bir özellikleri de, diğer belirteçlere göre (izoenzimler, RAPD, RFLP vb.) allel çeşitliliklerinin fazla olmasıdır. Böylece mikrosatellit belirteçleri, genetik çeşitlilik düzeyinin düşük olduğu canlı türleri için rahatlıkla kullanılabilirler. Genomda dağınık olarak bulunurlar ve çalışılmaları için az miktarda (1.5-50 ng) DNA örneği yeterlidir. Ayrıca, tekrarlanabilirlik düzeylerinin çok yüksek olması mikrosatellitlerin güvenli belirteçler olmasını sağlar (Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006). Mikrosatellit lokuslarındaki mutasyon oranı, canlı türlerine göre değişiklik (10^{-2} - 10^{-6}) göstermekle birlikte, aynı canlı türündeki ve/veya aynı genomdaki diğer lokuslara göre daha yüksektir (Eisen 1998, Hancock 1998, Estoup ve Cornuet 1998, Amos 1998, Oliveira vd 2006). Mikrosatellit analizleri sırasında, farklı PZR ürünleri karıştırılarak aynı jele yüklenebilir. Ayrıca, aynı jele 3-4 yükleme yapılabilir. Böylece, zaman, işgücü ve

maddi açıdan büyük kazanç sağlanır. Bu özelliklerinin yanı sıra, mikrosatellitlerin en büyük üstünlüklerinden biri de, bir tür için bulunan ve/veya tasarlanan primerlerin yakın türler için de kullanılabilmesidir (Anzidei vd 1999, Echt vd 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006).

Mikrosatellitler ökaryotik genomda çekirdek, mitokondri ve kloroplast olmak üzere üç farklı yerde bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen ortak özelliklere sahip olmalarına karşın, kloroplast ve mitokondri mikrosatellitleri bazı özellikleriyle çekirdek mikrosatellitlerinden ayrılmaktadır. Örneğin, kloroplastlar tek-ebeveyn tarafından kalıtılırlar ve bazı türlerde anne tarafından, bazı türlerde de baba tarafından kalıtılırlar. Gymnosperm (açık tohumlu) türlerinin çoğunda, angiosperm (kapalı tohumlu) türlerinin aksine, kloroplastlar yavru döllere baba tarafından aktarılır. Böylece, kloroplast basit dizi tekrarları (cpSSRs) ile babaya ait soy hattı hakkında bilgi elde edilebilir (Anzidei vd 1999, Navascues ve Emerson 2005). Kloroplast genomu rekombinasyon geçirmez ve bu nedenle bütün kloroplast lokusları bağlantılıdır. Haplotip olarak belirlenen basit dizi tekrarları, her bir cpSSR lokusunda bulunan allellerin kombinasyonu şeklinde ifade edilmektedir (Navascues ve Emerson 2005).

Mikrosatellit analizlerinin yukarıda bahsedilen üstün özelliklerinin yanı sıra, bazı istenmeyen özellikleri de bulunmaktadır. Bunlardan ilki, PZR sırasında Taq polimerazın (DNA polimerizasyonu için kullanılan enzim) yanlışlıkla farklı büyüklüklerdeki ürünler vermesidir. Bu durum genellikle mono- ve di-nükleotid tekrarların analizleri sırasında görülür. Taq polimerazın verdiği farklı büyüklükteki ürünler çoğunlukla istenilen ve/veya çalışılan bölge ürününden daha az yoğun olmakta ve göz ardı edilmektedir. Bununla birlikte, eğer farklı ürünlerde (istenilen ve yanlışlıkla çoğaltılan) çakışma olursa istenilen bölge ürününün ayrıştırılması zorlaşmaktadır. Bu sorun, daha önce çalışılmış ve bant büyüklüğü bilinen bir standart kullanılması ile rahatlıkla çözülebilir (Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006). İkinci sorun, analizler sırasında “null” allellere rastlanmasıdır. Bu alleller amplifiye (eşleşme) olmaz ve jelde görünmezler. Bunun nedeni muhtemelen primerin bağlanma bölgesinde meydana gelen bir delesyon ve/veya diğer mutasyonlar olabilir. Bu sorunun doğrudan bir çözümü olmamasına rağmen belirli bir miktar (%5’e kadar) verinin analizlerde kayıp veri olarak

göz ardı edilmesi ile azaltılabilir. Bu durum genellikle çok yaygın değildir ve görülme sıklığı da çok düşüktür (Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Varshey vd 2005). Üçüncü sorun ise, mikrosatellit analizlerinde kullanılan primerlerin elde edilmesinin güç olmasıdır (Scotti vd 1999).

Mikrosatellit bölgelerinin belirlenmesi, izolasyonu, sekanslanmaları ve primerlerin denenmesi; zaman, para ve uzmanlık gerektiren bir işlemdir. Yeni primerlerin bu şekilde elde edilmesinden ziyade daha ekonomik ve hızlı yöntemler kullanılarak bulunması tercih edilmektedir. Bu yöntemler; literatür taranarak uygun primerlerin seçilmesi, dizi (sekans) bankalarından yeni primerler dizayn edilmesi ve/veya primer geliştiren bir araştırma laboratuvarı ile birlikte çalışılmasıdır (Scotti vd 1999, Varshney vd 2005). Bunlar arasında en çok tercih edilen ve de en ucuz olan yöntem, literatür taranarak hedef tür ile taksonomik yakınlığı olan türlerde denenmiş olan primerlerin kullanılmasıdır. Örneğin, Vendramin vd (1996)'nin *Pinus thunbergii* Parl. kloroplast genomundan izole ettikleri 20 çift primer, *Pinaceae* familyasındaki yakın birçok ağaç türündeki analizler için kullanılmıştır (Bucci vd 1998, Echt vd 1998, Cuenca vd 2003, Gomez vd 2005, Hansen vd 2005, Hohn vd 2005, Robledo-Arnuncio vd 2005, Naydenov vd 2006, Vaxevanidou vd 2006, Bucci vd 2007, Kaya vd 2008).

Mikrosatellit analizleri; genetik çeşitlilik, genetik harita geliştirme, linkaj analizleri, belirteçler aracılığıyla seleksiyon, parmak izi analizleri, hastalıkların tayini, ebeveyn analizi, gen göçü vb. birçok alanda kullanılmaktadır (Balding 1998, Carrington vd 1998, Shibata 1998, Stoehr vd 1998, Anzidei vd 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Balloux ve Lugon-Moulin 2002, Bandelj vd 2004, Varshney vd 2005, Oliveira vd 2006). Mikrosatellit analizleri, özellikle genetik ayrımın çok zor olabildiği akraba popülasyonlarda, nispeten yakın geçmişte türemiş ve/veya coğrafik olarak ayrı kalmış (izole) olan popülasyonlarda ve genetik varyasyonun çok düşük olduğu türlerin çalışılmasında etkin bir yöntemdir (Echt vd 1998, Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006). Buna ek olarak, mikrosatellit analizleriyle çok yıllık bitkilerde morfolojik incelemelere ve izoenzim analizlerine göre çok daha çabuk sonuç alınabilir (Anzidei vd 1999). Orman ağaçlarının çoğu, özellikle kozalaklı ağaç türleri, tohum ve yavru verebilme olgunluğuna uzun yıllar sonunda (örneğin, *Cedrus libani* A. Rich.'de en erken ortalama

30 yaşında) eriştiklerinden, orman ağacı türleri ile yapılan geleneksel ıslah çalışmaları, döl denemeleri ve genetik çeşitlilik araştırmaları çok uzun zaman almaktadır (Işık 1999a). Bu zaman kaybını azaltmak amacıyla mikrosatellit analizleri, orman ağacı türlerinde diğer canlı türlerine nazaran daha sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Echt vd 1998, Anzidei vd 1999, Scotti vd 1999, Gonzalez-Martinez vd 2004, Oliveira vd 2006).

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, kıızılamda kloroplast basit dizi tekrarları (cpSSRs) primerleri kullanarak, DNA düzeyinde araştırmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, 1979 yılında Antalya Düzlerçamı yöresinde kurulan bir kıızılam ortak bahçe deneme alanındaki altı farklı popülasyon ve her bir popülasyondan 10 aile alınarak, cpSSR belirteçleri yoluyla popülasyonların ve ailelerin genetik yapısının ortaya konulması hedeflenmektedir. Özel olarak maddeler halinde belirtilirse, çalışmanın amacı:

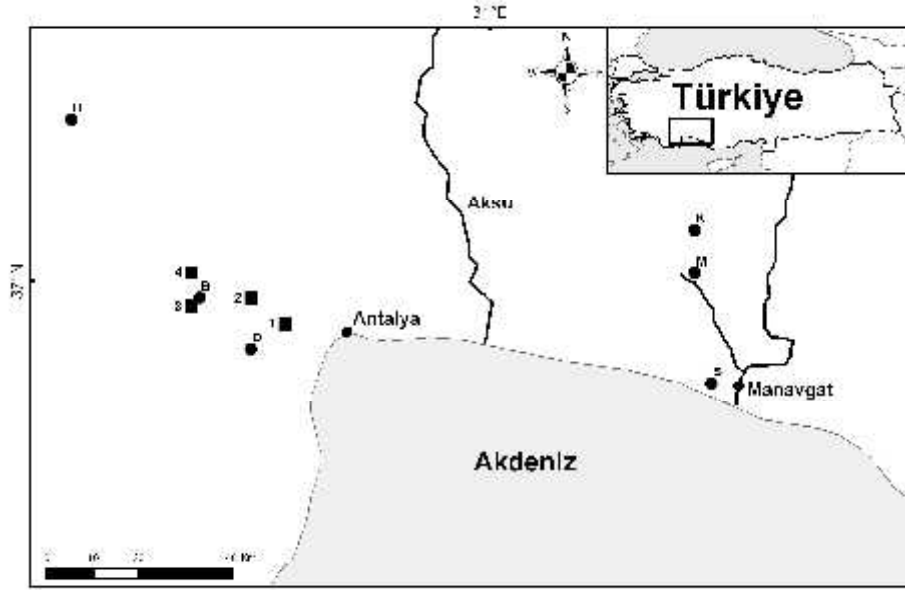
- 1- Kıızılam türüne ait Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanındaki popülasyonlarda, popülasyonlar-arası, popülasyonlar-içi (aileler-arası) ve ayrıca aile-içi yarım-kardeşler arası genetik çeşitliliği moleküler düzeyde belirlemek;
- 2- Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanından örneklenen popülasyonların ve ailelerin haplotip kimliklerini, cpSSR belirteçleri ile belirlemek;
- 3- Orijinlerin yükseltisine bağlı olarak popülasyonların cpSSR belirteçlerine dayalı genetik eşitliliklerinde farklılıklar olup olmadığını incelemek;
- 4- Kullanılan cpSSR belirteçleri ile ortaya çıkarılan moleküler verilerin, aynı deneme alanında yaklaşık son 30 yıl içinde yapılan morfolojik çalışmalardan elde edilen bilgilerle karşılaştırmak ve olası ilişkileri ortaya koymak;
- 5- Bu bilgilere dayanarak, kıızılamın ıslah stratejisi hakkında gerekli önerilerde bulunmaktır.

2. MATERİYAL ve METOT

Araştırmada uygulanan materyal ve yöntemler ayrıntılı olarak aşağıda sırasıyla verilmiştir. Kısaca özetlenirse, önce Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanından altı farklı popülasyona ait ibreler (iğne yapraklar) toplanmıştır. Elde edilen ibreler mikrosatellit analizleri yapılncaya kadar uygun koşullarda saklanmıştır. İbre örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış, seçilen primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıp PZR ürünleri dikey poliakrilamid jelde analiz edilmiştir. Ayrıca, hangi morfolojik verilerin kullanıldığı ve bunların nasıl elde edildiği de açıklanmıştır. Elde edilen veriler, her biri için uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu uygulamalar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır:

2.1. Düzlerçamı Ortak Bahçe Deneme Alanı ve Deneme Deseni

Kızılçam ıslahıyla ilgili temel biyolojik bilgilerin sağlanması amacıyla 1977 yılında, Orman Bakanlığı ve TÜBİTAK (TOAG 335 no'lu proje) desteğiyle Prof. Dr. Kani IŞIK tarafından Antalya yöresinde dört farklı yükseltide kızılçam orijin+döl denemeleri kurulmuştur (Işık 1986, Işık vd 1987). Bu denemeye girecek popülasyonların örneklenmesi için biri Antalya havzasının batısında, diğeri de doğusunda olmak üzere, deniz kıyısından başlayarak iç kesimlere doğru yükselen iki ayrı yükselti hattı belirlenmiştir (Şekil 2.1). Birinci hat Doyran-Bük-Hacıbekar (Antalya kenti-Korkuteli) hattı, ikinci hat Sarılar-Murtbeli-Kapan (Manavgat-Toroslar) hattıdır. Toroslara doğru yükselen her bir hat boyunca alçak, orta ve yüksek rakımlardan birer popülasyon olmak üzere, iki hattan toplam altı popülasyon belirlenmiştir (D: Doyran, B: Bük, H: Hacıbekar, S: Sarılar, M: Murtbeli, K: Kapan popülasyonları) (Şekil 2.1). Her popülasyondan da doğal ortamında 11 ile 16 adet arasında anaç ağaç (aile) seçilmiş, bunlardan kozalak toplanmış ve kozalak torbaları ailelere göre (kozalak toplanan her bir ağaç bazında) ayrı ayrı etiketlenmiştir (Işık 1986, Işık vd 1987).



Şekil 2. 1. Populasyonların coğrafik konumları ve deneme alanlarının kurulduğu yerler. Populasyonlar (koyu renkli daireler): H: Hacibekar, B: Bük, D: Doyran, S: Sarılar, M: Murtbeli, K: Kapan. Deneme Alanları (koyu renkli kareler): 1: Kepez, 2: Düzlerçamı, 3: Bük, 4: Yenicedere

Örneklenen kızılçam populasyonlarına ait coğrafik bilgiler ve deneme alanlarında yer alan populasyonlara ait aile kodları sırasıyla Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2’de belirtilmiştir (Işık vd 1987, Işık 1998). Populasyonlardan doğal ortamında örnekleme yapılırken rasgele 11-16 anaç ağaç seçilmiştir. Anaçlar arasındaki akrabalık olasılığını en aza indirmek için anaçlar en az 100 m aralıkla alınmıştır. Böylece, elde edilen örnek populasyonun ana populasyonu yeteri ölçüde temsil etmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Ayrıca, aileler seçilirken fenotipleri (boy vb.) bir tercih nedeni olarak dikkate alınmamıştır. Böylece, araştırmanın amacına uygun bir şekilde, populasyonlardaki sadece “üstün” ağaçların değil, her fenotipteki (görünümdeki) ağaçların temsil edilmesiyle, populasyonların her birinin doğal gen havuzunun (genetik yapısının) ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Kozalaklar ağaçların üst kısmından toplanarak elde edilen tohumların kendileme (selfing) ürünü olma olasılığı azaltılmaya çalışılmıştır. Her bir anaç ağaçtan toplanan kozalaklar, populasyonuna ve ailesine göre ayrı ayrı etiketlenmiş torbalara konulmuştur. Her aileye ait kozalaklar açık havada güneş altında kurutulmuş ve tohumlar elde edilmiştir. Fidanlığa ekim gününe kadar tohumlar her bir aileye ait etiketli torbalarda +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Işık vd 1987, Işık 1988, Işık 1998).

Çizelge 2.1. Denemede kullanılan kızılçam populasyonlarına ait coğrafik bilgiler

Populasyon	En yakın yerleşim yeri	Rakım (m)	Enlem (N)	Boylam (E)	Aile sayısı*	
					T.T.	D.A.
Doyran (D)	Doyran Köyü	61	36° 52'	30° 32'	16	10
Sarılar (S)	Sarılar Köyü	92	36° 48'	31° 26'	11	10
Bük (B)	Bük Orman Evi	481	36° 58'	30° 36'	15	10
Murtbeli (M)	Beydiğin Köyü	486	37° 01'	31° 24'	14	10
Kapan (K)	Beydiğin Köyü	932	37° 06'	31° 24'	14	10
Hacıbekar (H)	Hacıbekar Köyü	1033	37° 19'	30° 11'	15	10

*T.T.: Tohum toplanan aile sayısı, D.A.: Denemeye alınan ağaç sayısı

Çizelge 2.2. Denemede yer alan kızılçam populasyonlarına ait aile kodları

Populasyon	Denemedeki aile kodları									
Doyran (D)	D2	D3	D4	D6	D7	D9	D12	D13	D15	D16
Sarılar (S)	S1	S2	S3	S4	S6	S7	S8	S9	S10	S11
Bük (B)	B1	B2	B5	B6	B8	B9	B11	B12	B13	B14
Murtbeli (M)	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M12	M13
Kapan (K)	K1	K3	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12
Hacıbekar (H)	H2	H3	H4	H5	H9	H11	H12	H13	H14	H15

Tohumlar önce Zeytinköy fidanlığına ekilmiş (Nisan 1978'de), sonra da 1+0 fidanlar kullanılarak (Şubat, Mart 1979'da) Antalya yöresinde dört farklı yükseltide kızılçam orijin+döl denemeleri kurulmuştur (Işık 1986, Işık vd 1987, Işık 1998). Bir anaç ağaçtan elde edilen fidanlar belirli bir aileyi ya da o aileye ait yarım-kardeş (ana bir – baba farklı veya belirsiz) bireyleri oluşturmaktadır. Her bir populasyondan yeteri kadar fidan elde edilen ailelerden 30'ar adet (3×10) yarım-kardeş fidan seçilerek denemede kullanılmıştır. Bu deneme alanlarından birisi olan Düzlerçamı deneme alanı, bu araştırma projesine materyal sağlayacak deneme alanı olarak seçilmiştir. Düzlerçamı deneme alanı deniz seviyesinden yaklaşık 350 m yükseklikte ve denizden yaklaşık 15 km kuş uçuşu uzaklıkta yer almaktadır. Deneme alanının koordinatları ise 36° 58' 27

00" N ve 30° 32' 56 07" E'dir. Şekil 2.2'deki uydu görüntüsünde deneme alanının köşeleri açık renkli oklarla belirtilmiştir.



Şekil 2.2. Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanının uydu görüntüsü
(Deneme alanının köşeleri oklarla gösterilmiştir - Google Earth 2009)

Deneme için Libby ve Cockerham (1980) tarafından önerilen tek ağaç parselli rastlantı bloklarının bir modifikasyonu olan “Üç Yinelemeli Kenetlenmiş Petek Deseni” kullanılmıştır (Işık 1988). Denemede altı populasyon, her populasyondan 10 aile, her aileden 10 birey kullanılmış; bunlar üç yineleme (blok) olarak tekrarlanmıştır. Böylece, deneme alanında 3 yineleme $\times$ 6 populasyon $\times$ 10 aile $\times$ her aileye ait 10 yarım-kardeş fidan = 1800 fidan yer almıştır. Deneme alanının dış sınırlarında bulunan ayırım zonu ağaçları belirtilen toplam fidan sayısına dahil değildir. Bu desende, her anaç ağaca (aileye) ait fidanlar bir parsel içinde toplu olarak değil, blok (yineleme) içine tek tek ve rastlantısal olarak dağıtılmıştır. Denemedeki üç blok, rastlantı blokları desenindeki tersine, mekân olarak birbirinden bağımsız değildir. Başka bir deyişle, üç blok iç içe kenetlenmiş bir şekilde ve üçünün toplamına eşit bir alanda yer almaktadır (Libby ve Cockerham 1980, Işık vd 1987, Işık 1988).

Düzlerçamı deneme alanında ağaçlar arasında rekabet başladığı ve tepe çatıları kapandığı yıllarda aralama kesimleri yapılmıştır. Böylece, deneme deseninin bir gereği olarak, Düzlerçamı deneme alanında morfolojik verileri alan araştırmacıların kontrolünde iki aralama kesimi (birincisi ağaçlar 13 yaşındayken, Aralık 1990 ile Ocak-

Şubat 1991’de, ikincisi ise Şubat 1995’de) yapılmıştır. Aralama kesimlerinden sonra deneme alanında tek bir yineleme (mavi replikasyon) kalmıştır (Işık 1998). Deneme alanlarındaki ağaçlarla rekabet eden maki elemanları alt tabakayı örttüğçe ve ihtiyaç duyuldukça, erken yaşlarda daha yoğun olmak üzere, kısmen temizlenerek uzaklaştırılmıştır. Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanında yangın riskini azaltmak üzere denemede aralama kesimi sonunda kalan ağaçların kuru alt dalları da budanmıştır. Bu tez çalışmasına başlandığında, deneme alanındaki ağaçlar aile kodlarına göre 2006 yılında alüminyum plakalar kullanılarak etiketlenmiştir (Şekil 2.3, 2.4 ve 2.5). Etiketleme sonucu deneme alanında bulunan populasyonlara ve ailelere ait yarım-kardeş bireylerin yer aldığı konumun bulunması ve örnek alınması daha kolaylaşmıştır. Ölmüş olan ya da aralama kesimi ile çıkarılmış olan ağaçlar dikkate alınarak (ve onlar planlardan çıkarılarak) deneme planları 2008 yılı içinde güncelleştirilmiştir.



Şekil 2.3. Düzlerçamı deneme alanından genel bir görüntü



Şekil 2.4. Bireylerin etiketlenmesi



Şekil 2.5. Etiketlenmiş bir birey (K01)

Her bir ağacın (populasyonu ve ailesi belli olacak biçimde) konumu, EK-1’de deneme alanı yerleşim planında görülmektedir. Her bir populasyon ve her bir aileye ait bireylerin deneme alanı içinde yer aldığı konumlarını gösteren liste de EK-2’de

sunulmuştur. Örneğin, K populasyonundaki 7 no'lu aileye ait bireylerden biri, EK-2'deki listeye göre 10. sıra, 18. sütunda (10-18) yer almaktadır. Ayrıca, listelerde (EK-1 ve EK-2) koyu olarak belirtilen bireyler, bu çalışma için örneklenen bireylerdir.

2.2. İbre Örneklerinin Toplanması ve Kurutulması

Mikrosatellit çalışmaları, koniferlerde, bir ağacın yaprakları üzerinde yapılabildiği gibi, aynı bilgiler ilgili ağacın tohumları çimlendirilerek elde edilen fidelikler üzerinde de yapılabilir. Düzlerçamı deneme alanındaki ağaçların son yıllardaki (20-30 yaş arası) enerjisi daha çok vejetatif büyümeye ayrıldığı ve bu nedenle deneme alanında ve örneklenecek ailelerde yeterli sayıda kozalak (ve tohum) bulunmadığı için bu tez çalışması tohum değil, ibre örnekleri toplanarak sürdürülmüştür. Bu araştırma projesi için Düzlerçamı deneme alanında deneme planındaki altı farklı populasyonun her bir ailesinden dört birey (yarım-kardeş) rasgele seçilmiştir. Böylelikle, toplam 6 populasyon $\times$ 10 aile $\times$ 4 birey = 240 birey örneklenmiştir. Genç (yani, aynı yılın büyüme mevsimine ait) ibre örnekleri (Şekil 2.6) Haziran 2008'de ağaçlar 30. yaşını (yıl) doldurduğu zaman (ağaçların boyu yaklaşık 20 m) toplanmıştır (Şekil 2.7). Deneme alanı içinde örneklenen bireylerin konumu EK-1 ve EK-2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Her bireye ait ibre örnekleri toplanarak, o birey için etiketlenen poşetlere konulmuştur.



Şekil 2.6. Genç ibre örnekleri



Şekil 2.7. Kızılçamda ibre örneklerinin toplanması

(Fotoğraflar Arş. Görv. B. Banu BİLGİN tarafından Haziran 2008'de çekilmiştir)

Deneme alanından Haziran 2008’de toplanan ibre örnekleri, Arş. Görv. Yusuf KURT’un İspanya’ya gidiş tarihine kadar her bireye ait etiketli poşetler içinde, DNA izolasyonu yapılncaya kadar bitki genetiği laboratuvarında derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir. İspanya-INIA orman genetiği bölümü, DNA izolasyonu için toplanan bitki örneklerini silika jelde kurutarak kullanmaktadır. Bu tez çalışması için toplanan kıvılcam ibre örnekleri de silika jel yöntemi ile kurutulmuştur. Silika jel ile kurutma yönteminde, örnekler önce kâğıt poşet içine konulmakta ve kâğıt poşet de daha geniş bir plastik poşet içine konulmaktadır. Plastik poşetin içine silika jel konulup örnekteki nemin çekilmesi ve silika jelin renk değiştirmesi beklenmektedir (Şekil 2.8). Kullanılan silika jelin rengi normalde mavidir. Nemli bir ortamda nemi çektikten sonra silika jelin rengi pembeye dönüşmektedir (Weintraub 2002). Silika jelin rengi pembeye dönüşünce, onun yerine yeni (mavi renkli) silika jelin konulması gerekir. Bu tez çalışmasındaki örneklerin silika jeli, bir kez Türkiye’de ve beş kez İspanya’da olmak üzere toplam altı kez değiştirilmiştir (Şekil 2.8). Örnekler daha sonra DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Örneklerin silika jel ile kurutulma süreleri örneğin miktarına, silika jelin kalitesine ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Kıvılcam ibre örneklerinden ortalama 30 gram (gr) materyalin kurutulması için dört-beş günde bir silika jel değiştirilerek yaklaşık bir ayda kuru bitki materyali elde edilmiştir. Kuru bitki materyali silika jel içeren poşette oda sıcaklığında aylarca hatta yıllarca rahatlıkla saklanabilmektedir.



Şekil 2.8. Silika jeli değiştirilmiş bir örnek (soldaki, mavi silika jelli) ve silika jelinin değiştirilmesi gereken bir örnek (sağdaki, pembe silika jelli)

2.3. DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

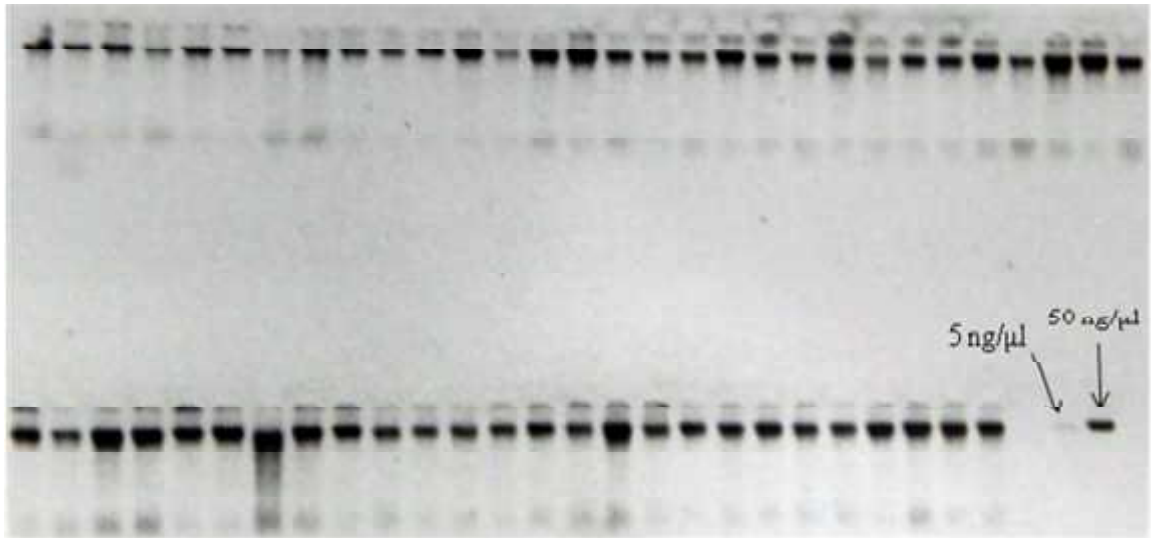
DNA izolasyon metodunun optimizasyonu için erken kuruyan birkaç bireyin ibre örneklerinden birkaç adet ibre alınarak ön deneme yapılmıştır. Bu ön denemede Invisorb® DNA Plant HTS 96 Kit/C olarak bilinen ve 50 miligrama (mg) kadar bitki materyalinden DNA izolasyonunu mümkün kılan DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Ön deneme sırasında 30 ve/veya 40 mg bitki materyali, homojenizasyon için bir ve/veya iki çelik bilye, değişik homojenizasyon ve santrifüj süreleri denenmiştir. Sonuçta, kızılçam ibreleri için ortalama 30 mg bitki materyali, bir çelik bilye, altı dakikalık homojenizasyon süresi ve değişik santrifüj süreleri (bakınız EK-3) uygun protokol olarak belirlenmiştir.

Ön deneme sonucu gerekli olan bitki materyali miktarı belirlenince her bir birey için ortalama 30 mg ibre örneği tartılıp 96'lık plakalara konuldu. Plakalara örnekler, olası bir karışıklığı önlemek için daha önce hazırlanmış olan ve populasyon, aile ve birey sırasını gösteren 96'lık plaka şeması göz önünde bulundurularak konuldu. İbre örneklerini tartarken örnekler pens ile alınmış ve örnekler arası kontaminasyonu önlemek için kesinlikle çıplak el ile dokunulmamıştır. Tartım işleminden sonra ibre örnekleri 1-2 cm uzunluğunda, tüp içine rahatlıkla sığacak şekilde, pens ile koparılmıştır. Koparılan örnek parçaları çok dikkatli bir şekilde 96'lık plakadaki tüplere sırasıyla konulmuştur (kuru ibre örneklerinin elektrostatik çekim kuvvetinden dolayı plastik tüplere konulması zaman alıcı ve çok dikkat gerektiren bir işlemdir). Bir örnek için kullanılan pens, başka bir örnek için tekrar kullanılmadan önce saf alkolde 5-10 saniye kadar bekletilmiş ve selülozlu kâğıt ile iyice temizlenmiştir. Bu işlemler bütün örnekler için, örnekler arası DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla özenle uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasında, ibre örnekleri Retsch® MM300 model homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin etkinliğini arttırmak için bitki örnekleri bir-iki gün önce hazırlanıp -20 °C'de muhafaza edilmiş veya homojenizasyon işleminden hemen önce sıvı azot içinde 5-10 saniye beklettikten sonra homojenizasyon işlemine geçilmiştir. Böylece, bitki materyali daha kuru bir hale gelmekte ve homojenizasyonu kolaylaşmaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan

kızılçam ibre örnekleri, homojenizasyondan bir-iki gün önce hazırlanıp -20 °C’de bekletilmiştir. Homojenizasyon süresi olarak üçer dakikadan oluşan iki kısım olmak üzere toplam altı dakika kullanıldı. Titreşim frekansı ise saniyede 30 olarak ayarlandı. Örneklerin iyi bir şekilde (toz veya kına şeklinde) homojenize olup/olmadığı kontrol edildikten sonra homojenizasyon işlemine son verildi. Bu tez çalışmasında, homojenize edilen örneklerden DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izole edildi. DNA izolasyon işlemi DNA kiti kullanma kılavuzunda (Bkz. EK-3) bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Çalışmada izlenen DNA izolasyon işlemi ayrıntılı olarak EK-3’de açıklanmıştır.

Örneklerin DNA miktarı agaroz jelde standart olarak 5, 25 ve 50 ng/μl lamda (λ) DNA kullanılıp sinyal gücü karşılaştırılarak belirlendi. Agaroz jel %1’lik olarak hazırlandı (Bkz. EK-4). Hazırlanan agaroz jele 4 mikrolitre (μl) ddH₂O (çift distile su) + 1 μl yükleme boyası (loading dye) + 1 μl örnek DNA’sı yüklendi. Aynı şekilde lamda DNA’lardan da 1 μl alınıp + 4 μl ddH₂O ve 1 μl yükleme boyası ile toplam hacmin hepsi agaroz jele yüklendi. Yüklenen örnekler 120 voltta 15 dakika 1X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu bulunan ortamda yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel görüntülenip fotoğrafı çekildi (Şekil 2.9). Fotoğraftaki örneklerin sinyal güçleri, lamda DNA’ların sinyal güçleri ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak örneklerin 1 mikrolitresinde bulunan DNA miktarı belirlendi (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. DNA miktarının belirlenmesinde kullanılan bir agaroz jel örneği.
Alt satırdaki son iki örnek (sağ tarafta) 5 ve 50 ng/μl lamda (λ) DNA örnekleridir

2.4. Primerlerin Belirlenmesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzole edilen DNA'lar polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi için 5 ng/μl olacak şekilde seyreltildi. PZR işlemi için aynı laboratuarda daha önce *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinaster* Ait. ve *Pinus canariensis* Chr. Smith ex. DC. ile yapılan çalışmalarda kullanılan protokol kızılçam için optimize edildi (Gomez vd 2003, 2005, Vaxevanidou vd 2006). Laboratuarda bulunan ve Vendramin vd (1996) tarafından *Pinus thunbergii* Parl. kloroplast genomundan izole edilmiş olan mononükleotid tekrarlarının belirlendiği altı primer çifti (Çizelge 2.3) PZR işlemi için kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Kullanılan primerler ve sekansları

Primer	Sekans (F: Forward, R: Reverse)
Pt1254	F: 5'-CAATTGGAATGAGAACAGATAGG-3' R: TGCGTTGCACTTCGTTATAG
Pt15169	F: 5'-CTTGGATGGAATAGCAGCC-3' R: GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA
Pt30204	F: 5'-TCATAGCGGAAGATCCTCTTT-3' R: CGGATTGATCCTAACCATAACC
Pt36480	F: 5'-TTTTGGCTTACAAAATAAAAGAGG-3' R: AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA
Pt71936	F: 5'-TTCATTGGAAATACACTAGCCC-3' R: AAAACCGTACATGAGATTCCC
Pt87268	F: 5'-GCCAGGGGAAAATCGTAGG-3' R: AGACGATTAGACATCCAACCC

PZR işleminin optimizasyon aşamasında altı popülasyonun üçünden (Sarılar, Doyran ve Bük) rasgele bireyler seçilmiş ve bütün primerler için aynı bireyler kullanılmıştır. PZR işleminin ön denemesinde farklı Taq polimeraz enzimleri, değişik MgCl₂ ve primer konsantrasyonları denenmiştir. Her bir primer için bulunan optimum koşullar Çizelge 2.4 ve 2.5'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir. PZR işlemi için karışım hazırlanırken öncelikle seyreltilmiş olan DNA'dan 1 μl (5 ng/μl) plakalara kondu ve daha sonra ise hazırlanan karışımdan (mastermix) 9 μl koyulup toplam hacim 10 μl olarak ayarlandı (Çizelge 2.4 ve 2.5). PZR koşulu olarak ise, 95 °C'de – 5 dakika

bekletme / [94 °C'de 1 dakika / 55 °C'de 45 saniye / 72 °C'de 1 dakika kullanılarak 20-35 döngü] / 72 °C'de – 8 dakika bekletilerek - 10°C'de örnekler alındı. PZR işlemleri Applied Biosystems, Gene Amp® PCR system 9700 cihazında yapıldı.

Çizelge 2.4. Taq-Ekogen ile amplifiye olan primerler ve PZR bileşenleri

Karışım	1X (µl) Pt30204	1X (µl) Pt15169	1X (µl) Pt87268	1X (µl) Pt1254
ddH ₂ O	6.32	6.32	6.32	6.12
dNTPs 10mM	0.4	0.4	0.4	0.4
MgCl ₂ 50mM	0.4	0.4	0.4	0.4
BSA 10mg/ml	0.2	0.2	0.2	0.2
Tampon 10X	1	1	1	1
Primer R 5µM	0.3	0.3	0.3	0.4
Primer F•5 µM	0.3	0.3	0.3	0.4
Taq Pol. 5u/ µl	0.08	0.08	0.08	0.08
TOTAL	9	9	9	9

Çizelge 2.5. Taq-Invitrogen ile amplifiye olan primerler ve PZR bileşenleri

Karışım	1X (µl) Pt36480	1X (µl) Pt71936
ddH ₂ O	6.32	6.32
dNTPs 10mM	0.4	0.4
MgCl ₂ 50mM	0.4	0.4
BSA 10mg/ml	0.2	0.2
Tampon 10X	1	1
Primer R 5µM	0.3	0.3
Primer F•5 µM	0.3	0.3
Taq Pol. 5u/ µl	0.08	0.08
TOTAL	9	9

*Kullanılan primer floresan boya ile işaretli

PZR sonucu elde edilen ürünler Li-Cor 4300 DNA Analyzer cihazında dikey poliakrilamid jelde yürütülerek bantların sinyal gücüne ve primerlerin polimorfizm durumuna bakıldı. Yüklemede 1 µl ddH₂O + 1 µl yükleme solüsyonu + 1 µl PZR ürünü kullanıldı. Elde edilen bu karışımdan 0.5 – 0.75 µl arasında değişen miktarlarda kullanıldı. Jelin ve kullanılan çözeltilerin hazırlanması hakkında ayrıntılı bilgiler EK-4'de açıklanmıştır. Kullanılan primerlerden sadece Pt36480 primeri monomorfik olarak görüldü. Deneme, üç popülasyondan dörder birey olmak üzere, toplam 12 bireyde yapıldığından bu primerin de bütün popülasyonlar için kullanılması kararlaştırıldı.

Akrilamid jelde görülen güçlü bant sinyallerinden sonra her bir primer için PZR döngü sayısı beş döngü düşürülerek şu şekilde değiştirildi; Pt71936 için 15 döngü. Pt15169, Pt30204 ve Pt87260 için 20 döngü. Pt36480 için 25 döngü ve Pt1254 için 30 döngü. Optimize edilen PZR bileşenleri ve döngü sayıları ile her bir primer için bütün popülasyonlarda PZR işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen plakalar Li-Cor 4300 DNA Analyzer’da dikey poliakrilamid jelde inceleninceye kadar -20 °C’de muhafaza edildi (PZR ürünleri -20 °C’de aylarca bozulmadan muhafaza edilebilir).

2.5. Dikey Poliakrilamid Jelde Analizler

Dikey poliakrilamid jel hazırlamadan önce kullanılacak malzemelerin hepsi hazırlanmalıdır. Çünkü jel hazırlanıp cam bölmeler arasına aktarıldıktan kısa süre (yaklaşık 30 dakika) sonra polimerize olmaya başlamaktadır. Dikey poliakrilamid jel hazırlarken kullanılan çözeltiler ve malzemeler Şekil 2.10’da görülmektedir.



Şekil 2.10. Jel hazırlarken kullanılan çözeltiler ve malzemeler

Jel hazırlanırken ilk olarak, kullanılacak cam bölmeler alınarak saf etil alkol (%96 veya %99’luk) ile iyi bir şekilde temizlenmiştir. Temizleme işleminde özel selülozlu (selüloz içeriği normal kâğıtlara göre biraz fazla olan) kâğıt kullanılmalıdır. Böylece cam bölmeler üzerinde herhangi bir leke ve/veya çok küçük kâğıt parçaları kalmamaktadır. Cam bölmeler üzerinde herhangi bir leke veya kâğıt parçasının kalması, cihazın okumasında kirlilik (background) oluşumuna neden olabilir. Cam bölmeler iyice alkol

ile temizlendikten sonra aralarına 25 cm uzunlukta ve 0.25 mm kalınlığında ince plastik şerit (spacer) konulur. Cam bölmeler kapatılarak kenar sıkıştırma aparatları yerleştirilir ve bunlar iyice sıkıştırılır. Düz bir düzlemde cam bölmelerin düzgün bir şekilde kapatılıp kapatılmadığı kontrol edilir. Hazırlanan cam bölmeler jelin döküleceği ağız kısmından 2-3 cm yukarıda olacak şekilde ayarlanır (Şekil 2.10).

Poliakrilamid jel için gerekli olan malzemeler hazırlanır. Bunlar sırasıyla; Mikrosatellit analizi için solüsyon (% 6.9'luk akrilamid içeren jel stok solüsyonu), TEMED (N, N, N, N-Tetrametiletillen-diamin) ve %10'luk APS (Amonyum peroksit disulfat)'dir (Şekil 2.10). Jel stok solüsyonu ve TEMED +4 °C'de, %10'luk APS ise -20 °C'de muhafaza edilmektedir. Jel stok solüsyonun'dan 25 ml bir behere konur ve behere dikey hava akımlı kabin içinde 15 µl TEMED eklenir. Bu karışım (Jel stok solüsyonu + TEMED) çalkalayıcıda 15-20 saniye karıştırıldıktan sonra 150 µl %10'luk APS eklenir. Bu da çalkalayıcıda 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra hazırlanan çözeltinin 22-23 ml'si şırınga içerisine alınır. Jelin polimerizasyonunu kontrol etmek için beherde 2-3 ml çözelti bırakılır. Hazırlanan çözelti cam bölmelerin arasına dikkatli bir şekilde aktarılır. Şırınga kullanılırken cam bölmeler arasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilir. Jel çözeltisi döküldükten hemen sonra, tarak yeri aparatı cam bölmelerin arasındaki açıklığa yerleştirilir. Bu aparatı koyarken çok dikkat edilmelidir. Çünkü bu aparatı koyarken de hava kabarcığı oluşabilir. Hava kabarcığı oluşması durumunda jel tekrar hazırlanmalıdır. Bundan dolayı tarak yeri aparatını yerleştirirken ağız kısmına biraz fazla çözelti dökülür ve tarak yeri aparatı hemen yerleştirilir. Hazırlanan jel, polimerize olması için oda sıcaklığında 1-2 saat (genellikle 1.5 saat) bekletilir. Jel polimerize olduktan sonra el kurutma kâğıtları birkaç kat yapılarak musluk suyu ile ıslatılıp cam bölmelerin açık olan her iki ucuna yerleştirilir. Cam bölmeler streç film ile sarılarak, jel bir gece +4 °C'de bekletilir. Şayet jel 2-3 gün sonra kullanılacaksa, el kurutma kâğıtları iyice ıslatılır ve cam bölmelerin açık uçları bu ıslatılmış kâğıtlarla kapatılır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Buzdolabında (+4 °C) bekletilmek için sarılmış bir jel örneği

Bir gece +4 °C’de bekletilen jel, ertesi gün buzdolabından alındı ve oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi (Şekil 2.11). Streç film söküldü ve jel musluk suyu altında iyice yıkandı. Yıkama işlemi jelin yükleme yapılan ağız kısmında su akışı net bir şekilde görüldüğü zaman bırakıldı. Yüklemenin yapılacağı ağız kısmında biriken jel kırıntıları bir tel ile alındı. Bu kırıntılar alınmazsa tarağın oluşturacağı kuyucukları doldurabilir ve yürütme işleminin düzgün bir şekilde gerçekleşmesini engelleyebilir. Ağız kısmındaki kırıntılar alındıktan sonra jelin ön ve arka kısmındaki cam bölmeler saf etil alkol ile iyice temizlendi. Bu işlem, cihazın okumasını düzgün bir şekilde yapması için gereklidir. Cam bölmeler saf alkol ile temizlendikten sonra, jele tarak yerleştirildi. Laboratuarda bulunan Li-Cor 4300 DNA Analyzer cihazı 64 örneklik tarağa sahipti. Tarak yerleştirildikten sonra bir bant ile cam bölmeye sabitlendi. Yükleme yapılacak ağız kısmına 0.8X’lik TBE tamponu için gerekli olan plastik tampon yeri sabitlendi. Cam bölmeler Li-Cor cihazına yerleştirildi. Yürütme işlemi için 0.8X’lik TBE tamponu kullanıldı. Jel aparatı ve Li-Cor cihazının bağlantıları yapılarak ön-yürütme işlemi başlatıldı. Ön-yürütme işlemi 15 dakika sürmektedir. Ön-yürütme işlemi jelde, tamponda ve Li-Cor cihazında herhangi bir sorun olup olmadığını kontrol etmek için yapılmaktadır. Bu arada jele yüklenecek örnekler hazırlanabilir.

Jelin ağız kısmında bulunan tarakta 1-64 arası rakamlar bulunmaktadır. Ayrıca, 1’den önce ve 64’den sonra 3’er kuyucuk daha vardır. Fazla kuyucuklar genellikle markırlar (belirteç) için kullanılmaktadır. Örnekler yükleme işlemi için hazırlanırken

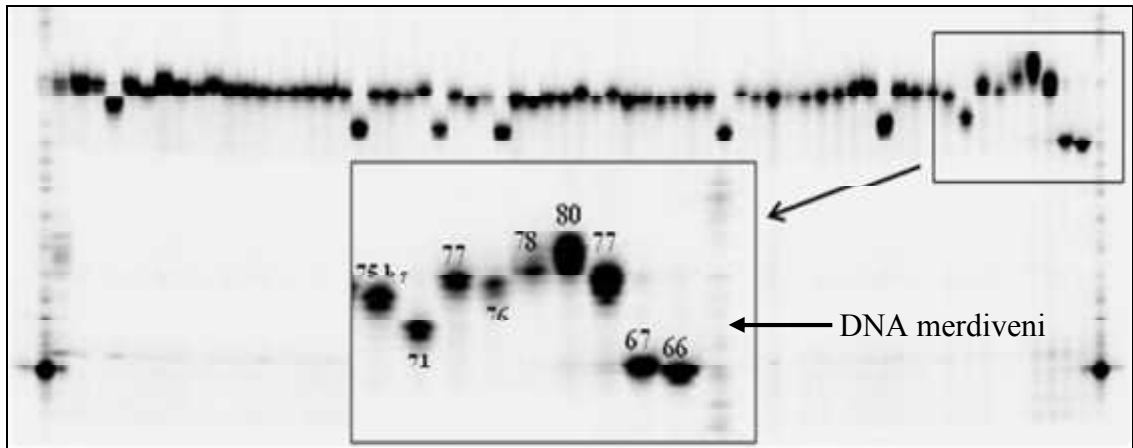
sırasıyla 1 µl ddH₂O + 1 µl yükleme solüsyonu + 1 µl PZR ürünü plakada bulunan kuyucuklara konuldu. Bu miktarlar Li-Cor cihazından alınacak sinyalin gücüne göre değiştirilebilir. Örneğin, sinyal çok zayıf ise çift distile su kullanılmayabilir. Elde edilen yükleme karışımı 10 saniye santrifüj edildikten sonra denatürasyon işlemi için PZR cihazına konuldu. Karışım PZR cihazında 94 °C’de 2 dakika bekletildi. Böylece DNA iplikleri birbirinden ayrılıp bağımsız hale gelecektir. Ön-yürütme işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen karışımdan 0.5-0.75 µl arasında değişen miktarlarda kullanıldı (Şekil 2.12). Kullanılan bu miktar, Li-Cor cihazındaki sinyalin zayıf ve/veya güçlü olmasına göre arttırılabilir veya azaltılabilir. Bantların büyüklüğünü öğrenmek için kullanılan DNA merdiveni (squamark) belirtecinden ise 0.10-0.25 arasında değişen miktarlarda kullanıldı. Yürütme sırasında Li-Cor cihazının koşulları sırasıyla; Volt (0-1500) = 1490.5, mA (0-40) = 24.5, Güç [(w) (0-120)] = 36.5, Sıcaklık [(°C) (0-50)] = 45 olarak görülmüştür. Bu değerlerde her yürütme işleminde farklılık gösterebilir. Çünkü değerler cihaz tarafından verilen aralıklarda otomatik olarak belirlenmektedir. Jelin polimerizasyonu, yürütme ortamının sıcaklığı vb. birçok faktör değerleri etkilemektedir.



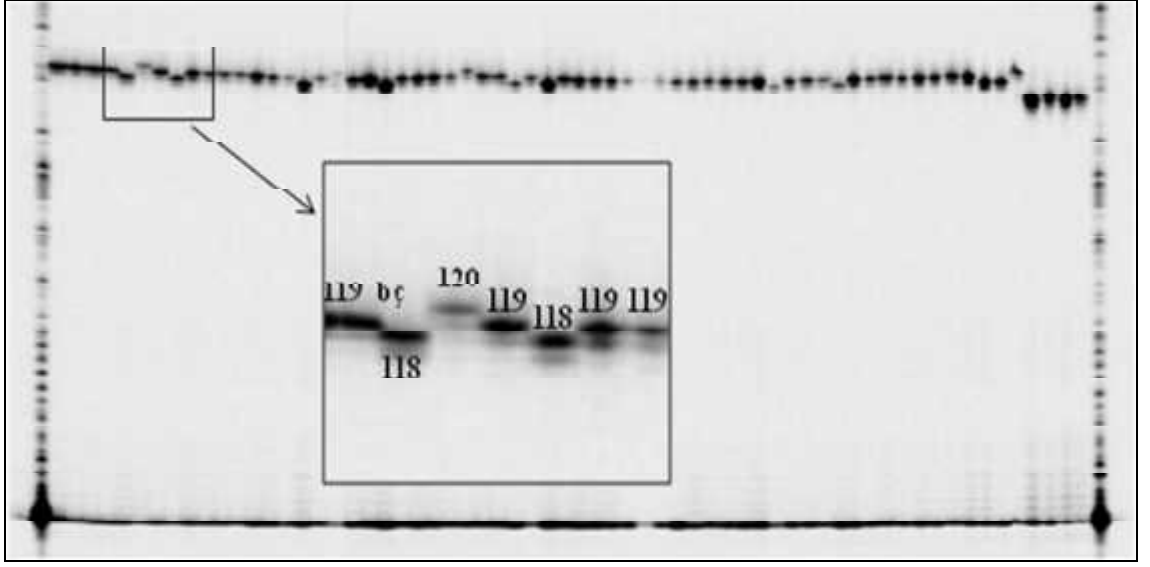
Şekil 2.12. Poliakrilamid jele yükleme yapılırken

Kızılçam örneklerinin yüklenmesinde belirteç olarak, daha önce aynı laboratuarda değişik araştırmacılar tarafından analiz edilmiş olan ve bant uzunlukları bilinen *P. pinaster* Ait. ve *P. halepensis* Mill. örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca, dış belirteç olarak da DNA merdiveni (squamark - 800 nm) belirteci kullanılmıştır. Her bir akrilamid jele

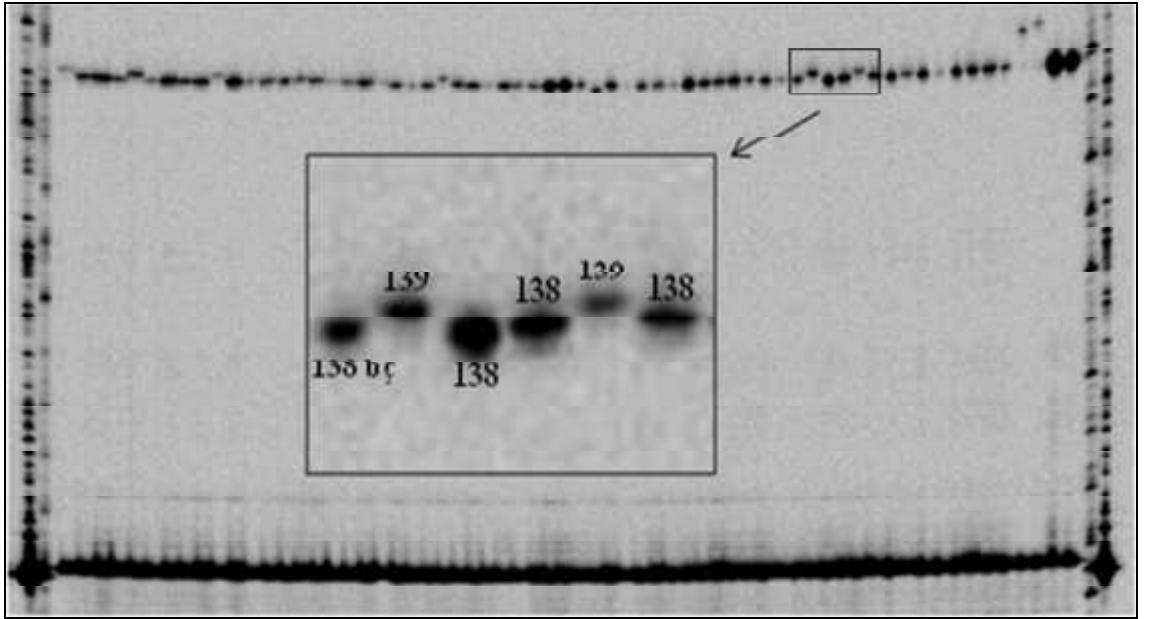
en fazla üç ve/veya dört kez yükleme yapılabilmektedir. Kullanılan primerin verdiği bandın uzunluğuna ve beklenen süreye göre yükleme sayısı değişmektedir. Örneğin, Pt87268 primeri en fazla 172 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant vermektedir. Bundan dolayı bu primer çalışılırken jele en fazla 2 kez yükleme yapılması daha sağlıklı sonuç alınmasını sağlar. Bunun aksine, Pt1254 primeri en fazla 76 bç büyüklüğünde bant verdiği için dolayı bu primerin çalışılması sırasında jele dört kez yükleme yapılabilir. Ayrıca, en fazla yükleme sayısı olarak genellikle üç yükleme kullanılmaktadır. Çünkü iki yüklemeden sonra cihaz iyice ısınmaktadır ve bu ısınma jelde bantların dalgalı şekilde görünmesine neden olmaktadır. Jele ilk yükleme yapıldıktan yaklaşık 40-50 dakika sonra ikinci yükleme yapılmaktadır. Kullanılan primerlere ait örnek jel görüntüleri Şekil 2.13, Şekil 2.14, Şekil 2.15, Şekil 2.16, Şekil 2.17 ve Şekil 2.18’de görülmektedir. Her bir şekildeki son dört örnek (sağ tarafta) belirteç olarak kullanılan örneklerdir. Bu örneklerden ilk ikisi *P. pinaster* Ait. ’e, son ikisi ise *P. halepensis* Mill. ’e aittir. Bu örnekler daha önce değişik çalışmalarda analiz edilmiş olan ve bant büyüklükleri bilinen örneklerdir. Bütün şekillerde primerler orijin bölgelerinden başlayarak bant verdikleri yerlere kadar görüntülenmektedir. Allel büyüklüklerinin daha iyi ayırt edilebilmesi için polimorfik olan bazı bölgelerdeki bant büyüklükleri baz çifti (bç) olarak ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca, Pt36480 primerinin monomorfik, diğer primerlerin ise polimorfik olduğu, jel şekillerinde açıkça görülmektedir.



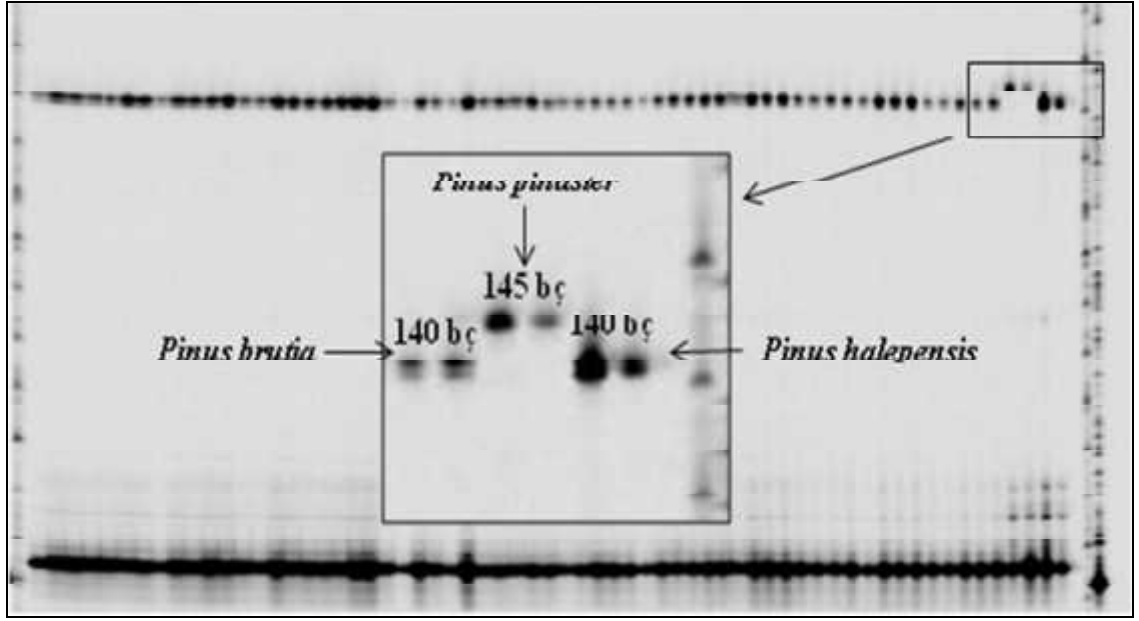
Şekil 2.13. Pt1254 primerine ait bir jel görüntüsü



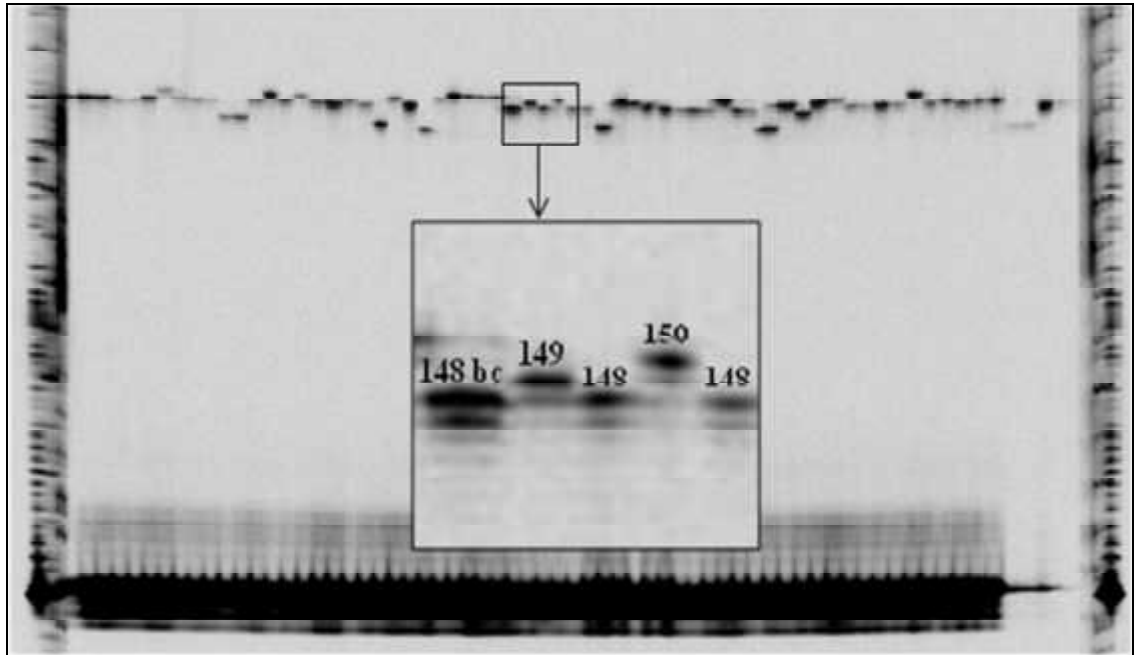
Şekil 2.14. Pt15169 primerine ait bir jel görüntüsü



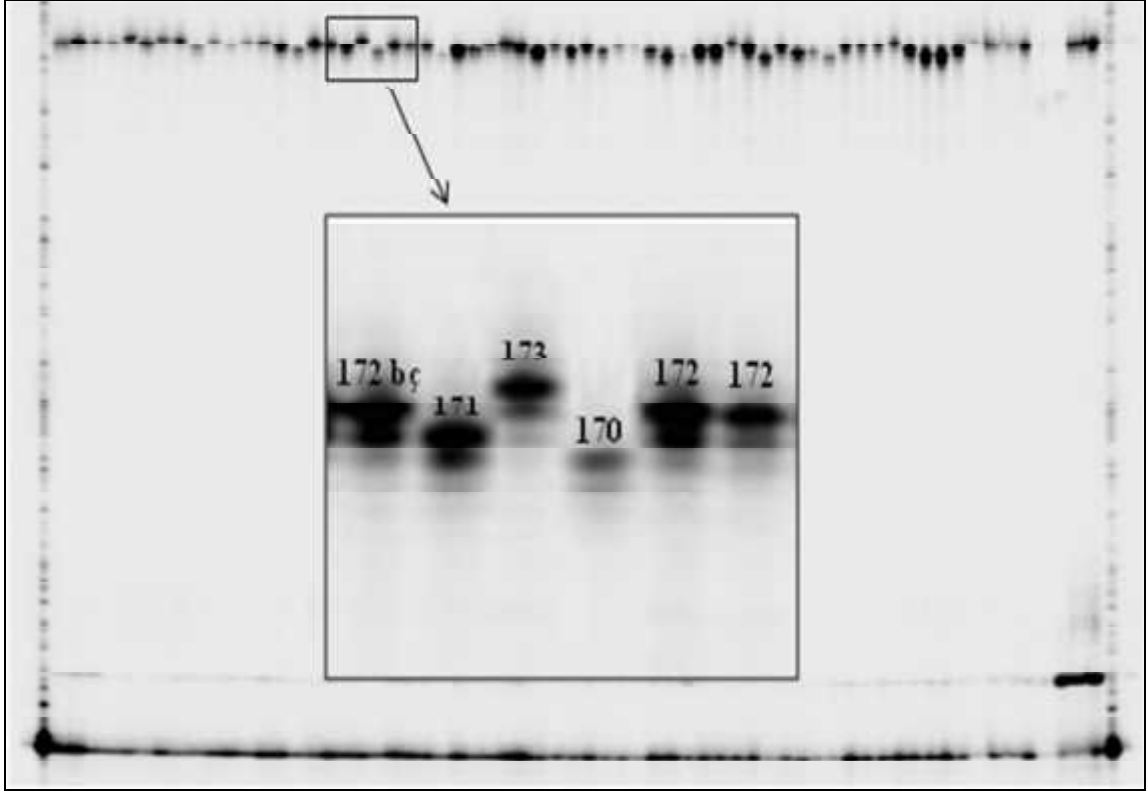
Şekil 2.15. Pt30204 primerine ait bir jel görüntüsü



Şekil 2.16. Pt36480 primerine ait bir jel görüntüsü



Şekil 2.17. Pt71936 primerine ait bir jel görüntüsü



Şekil 2.18. Pt87268 primerine ait bir jel görüntüsü

2.6. Morfolojik Verilerin Eldesi

Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanında bulunan bireylerin 13. ve 17. yaşlarına ait morfolojik veriler, daha önce yapılan ve değişik yıllarda yayınlanan çalışmalardan derlenmiştir (Işık ve Kara 1997, Işık 1998, Işık ve Işık 1999). Ayrıca, Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanındaki bireylerin 30. yaşa ait çap ölçümleri Mayıs 2008 yılında yapılmıştır. Deneme alanındaki bireylerin çok uzun boylu olmaları (yaklaşık 20 m), aralarındaki dikim aralıklarının nispeten dar olması (3.46 m) ve her bir ağaç tepesinin görülmesini engelleyen sıklık nedeniyle, elektronik aletlerle de olsa, ağaçların son yıla ait boyları ölçülememiştir.

2.7. İstatistiksel Analizler

Her bir primerin jelde sahip olduğu her bir bölge bir lokus olarak alındı. Her bir birey için bir primerde görülen ayrı ayrı bantlar ise belirli bir allelin ifadesi olarak değerlendirildi. Bu ilkeye dayanarak, analiz edilen her bir primer için,

populasyonlardaki bireylerin her birinin sahip olduğu allellerin büyüklüğü belirlendi ve allel frekansları ayrı ayrı hesaplandı. Populasyonların genetik çeşitliliğini belirleyebilmek için her bir populasyonda, polimorfik lokuslar ve yüzdeleri, polimorfik lokuslardaki ortalama allel sayıları hesaplandı.

Polimorfizm ölçütü olarak, bir lokustaki allel sayısı dikkate alındı. Şöyle ki, bütün populasyonlar göz önüne alındığında iki ve/veya daha fazla allele sahip olan mikrosatellit bölgesi polimorfik lokus olarak değerlendirildi. Çalışılan altı kloroplast mikrosatellit bölgesinin her bir bireydeki farklı kombinasyonları haplotip olarak tanımlandı. Ortalama allel sayısı, çalışılan her bir populasyondaki her bir lokusun sahip olduğu allel sayısının aritmetik ortalaması alınarak bulundu. Her bir populasyonun genetik çeşitliliği, Nei (1987)'nin tarafsız haplotip çeşitliliği (unbiased haplotypic diversity) hesaplanarak belirlendi. Populasyonlar içindeki bireyler arasında bulunan genetik mesafe, basamaklı mutasyon modeline göre hesaplandı (stepwise mutation model, SMM). Bu modele göre rekombine olmayan kloroplast genomu tek bir lokus olarak alındı ve Goldstein vd (1995)'in genetik uzaklık değeri (D^2_{sh}) hesaplandı. İstatistiksel analizlerle ilgili formüller ve bilgiler ayrıntılı olarak EK-5'de verilmiştir.

Populasyonların genetik yapısını birbiriyle karşılaştırabilmek ve populasyonlar arası farklılaşmanın özellikle hangi lokuslardan kaynaklandığını belirleyebilmek için Wright (1978)'in F -istatistiği ve Slatkin (1995)'in R_{ST} değerleri kullanıldı. Üç farklı şekilde (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) ifade edilen F -istatistiği, gözlenen genotip oranları ile Hardy-Weinberg koşullarında beklenen genotip oranları arasında sapma olup olmadığını gösterir (Wright 1965). Ayrıca, populasyonların sahip olduğu haplotipler (allel büyüklükleri ile) girdi olarak kullanılarak Arlequin programında moleküler varyans analizi (AMOVA) yapıldı. Yukarıdaki istatistiki hesaplamalarda allel frekanslarının ve populasyonlar arası coğrafik mesafenin dikkate alındığı BAPS [(Bayesian Analysis of Population Structure) (versiyon 5.2) (<http://web.abo.fi/fak/mnf/mate/jc/software/baps.html>)] ve populasyonların sahip olduğu haplotiplerin göz önünde bulundurulduğu Arlequin [(versiyon 3.11) (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>)] bilgisayar programları kullanıldı (Corander vd 2003, 2008, Excoffier vd 2005).

Populasyon çiftleri arasındaki Jaccard benzerlik katsayıları, populasyonların sahip oldukları haplotipler göz önünde bulundurularak hesaplandı. Hesaplanan Jaccard benzerlik katsayılarından yola çıkılarak populasyonların benzerlik fenogramı çizildi. Hesaplamaların nasıl yapıldığı ve Jaccard benzerlik katsayılarının nasıl bulunduğu EK-5’de ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Işık vd 2005).

Morfolojik verilerin analizinde ise SAS paket programı kullanıldı (SAS versiyon 8.0, SAS 1999). Bu tez çalışmasında ele alınan deneme alanındaki populasyon ve aile varyasyonları daha önce yapılan çalışmalardan elde edilerek, ölçülen her bir karakter için Q_{ST} değerleri hesaplandı (Işık 1998, Işık vd 1999). Hesaplanan Q_{ST} değerleri, F_{ST} değerleri ile karşılaştırılarak populasyonlar hakkındaki olası varsayımlar belirlendi. Morfolojik veriler ile moleküler verilerin karşılaştırılmasıyla ilgili ayrıntılı bilgiler ve gerekli formüller EK-5’de verilmiştir.

3. BULGULAR

Bulgular bölümündeki bilgiler şu şekilde özetlenebilir: Analizlerden elde edilen bilgilere dayanarak her bir primerin bantlaşma fenotipi belirlendi ve net bir şekilde gözlenen lokuslar ve/veya alleller değerlendirmeye alındı. Değerlendirmeye alınan lokuslardaki allellerden yola çıkılarak populasyonların sahip oldukları haplotipler ve genetik çeşitlilik düzeyleri hesaplandı. Böylece populasyonların genetik yapısı belirlenerek populasyonlar arasındaki genetik benzerlik ve/veya farklılık düzeyleri ortaya konuldu. Bu bulguların ve değerlendirmelerin her biri aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmaktadır.

3.1. Populasyonların Haplotip ve Allel Analizi

Yapılan analizler sonucunda çalışılan altı primerin her biri için öncelikle bantlaşma fenotipleri belirlendi. Çalışılan her bir primer bölgesi lokus, bu bölgelerde görülen farklı büyüklükteki bantlar ise ilgili lokusun allelleri olarak ele alındı. Çalışılan primerlerden Pt36480 primeri monomorfik, diğerleri ise polimorfik olarak saptandı. Analiz edilen altı populasyonda altı primer için toplam 29 allel (her bir lokus için 1-9 arası allel) belirlendi. Altı populasyonda analiz edilen toplam 240 bireyden (ağaçtan), her bir primer için kolayca ayırt edilebilen bantlar verdikleri için, 231 adet birey değerlendirmeye alındı. Populasyonlarda her bir primer için değerlendirmeye alınan birey sayısı, ortalama 38.5 bireydir (35 bireyle en az sayı Hacıbekar, 40 bireyle en çok sayıda Murtbeli ve Doyran populasyonları).

Her bir bireyde çalışılan altı primer için elde edilen farklı büyüklükteki allel bantlarının kombinasyonu haplotip olarak değerlendirildi. Buna göre, altı populasyonda toplam 60 haplotip gözlemlendi. Gözlenen haplotipler ve her bir lokusta baz çifti olarak sahip oldukları allel büyüklükleri Çizelge 3.1’de gösterilmektedir. Belirlenen 60 haplotipten 37’si (% 61.7) özel ve/veya eşsiz olarak saptandı. Başka bir deyişle, her bir populasyonda bulunan haplotiplerin yaklaşık % 10.3’ü özel ve/veya eşsiz olarak gözlemlendi. Haplotiplerden dört tanesinin (H12, H19, H39 ve H45) bütün populasyonlarda

ortak olarak bulunduğu saptandı. Ortak olan dört haplotipin, toplam haplotip frekansının % 45.5'ini oluşturdıkları bulundu.

Çizelge 3.1. Çalışılan altı farklı kızılçam populasyonunda altı ayrı primer için gözlenen 60 haplotip ve bu haplotiplerin baz çifti olarak sahip oldukları allel büyüklükleri (Çalışılan altı popülasyonda ortak olan haplotipler koyu ve italik rakamlarla gösterilmiştir)

	Lokus ve/veya primerler					
Haplotip	Pt1254	Pt15169	Pt30204	Pt36480	Pt71936	Pt87268
1	72	119	138	140	143	171
2	73	119	138	140	143	171
3	72	119	138	140	144	171
4	73	119	138	140	144	171
5	72	119	138	140	144	172
6	71	119	138	140	148	170
7	71	119	138	140	149	170
8	74	119	138	140	148	170
9	76	118	138	140	148	170
10	71	119	138	140	149	171
11	76	119	139	140	147	170
12	76	119	138	140	148	170
13	74	119	138	140	148	171
14	72	119	138	140	149	171
15	76	118	138	140	148	171
16	70	119	138	140	149	172
17	77	119	138	140	148	170
18	76	119	138	140	149	170
19	76	119	138	140	148	171
20	71	118	138	140	149	173
21	76	119	137	140	149	171
22	76	119	138	140	147	172
23	76	118	138	140	149	171
24	75	120	138	140	148	171
25	70	119	138	140	149	173
26	75	119	138	140	149	171
27	77	119	138	140	148	171
28	77	119	138	140	147	172
29	76	120	138	140	148	171
30	71	119	138	140	149	173
31	76	119	139	140	148	171

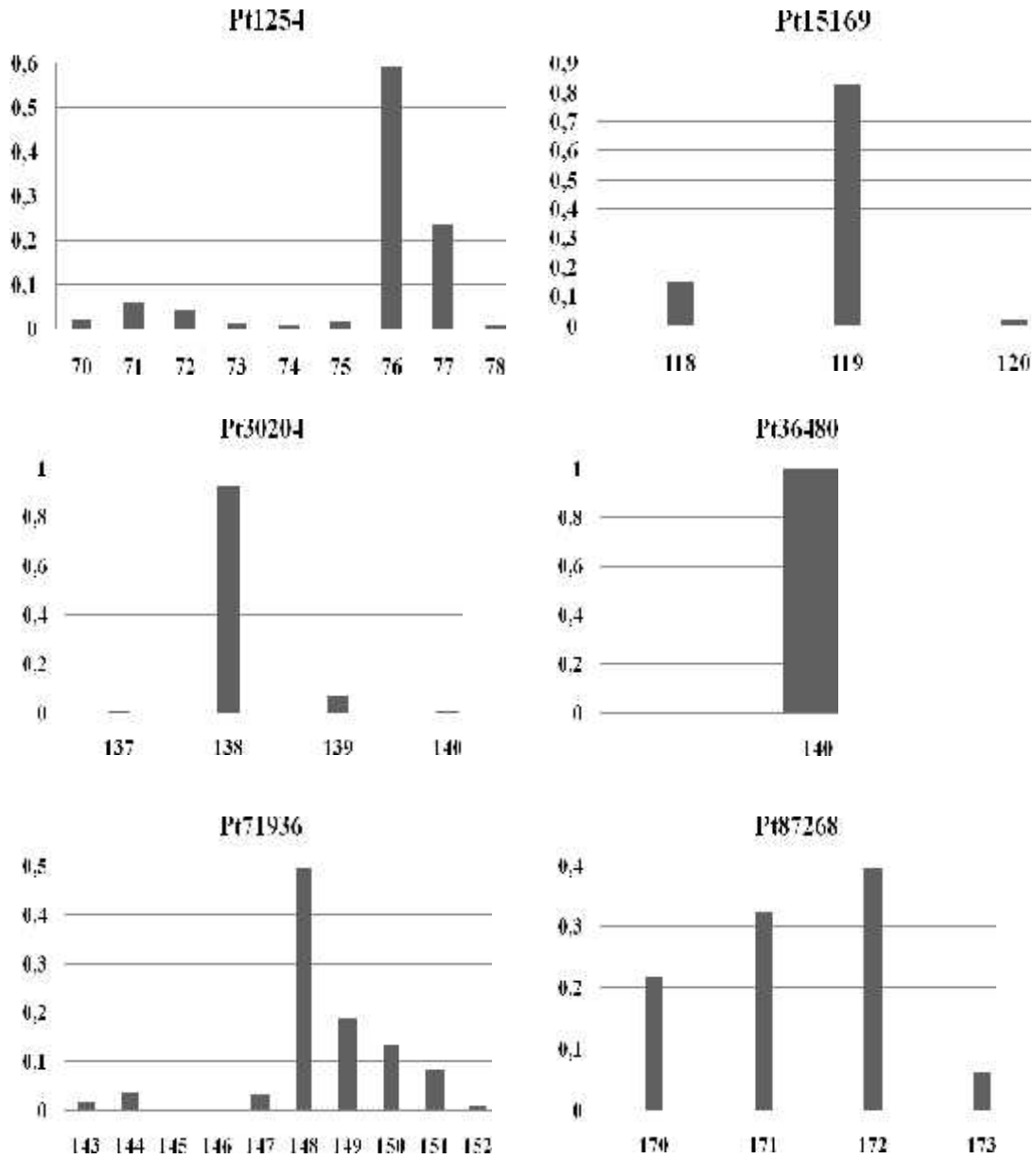
Devamı arka sayfada

Çizelge 3.1'in devamı

32	76	119	138	140	149	171
33	76	118	138	140	150	171
34	75	120	138	140	149	171
35	70	119	139	140	149	173
36	70	119	138	140	150	173
37	77	119	139	140	148	171
38	75	119	138	140	150	171
39	77	119	138	140	148	172
40	76	120	138	140	149	171
41	71	119	138	140	150	173
42	76	119	138	140	151	170
43	76	119	139	140	148	172
44	76	119	138	140	149	172
45	76	118	138	140	150	172
46	77	119	139	140	148	172
47	77	119	138	140	149	172
48	77	118	138	140	150	172
49	76	119	139	140	149	172
50	78	119	139	140	148	172
51	76	119	138	140	150	172
52	76	119	138	140	149	173
53	76	118	138	140	151	172
54	77	119	140	140	148	172
55	77	120	138	140	148	173
56	77	119	138	140	150	172
57	77	119	138	140	151	172
58	78	119	138	140	151	172
59	77	119	139	140	151	172
60	77	119	138	140	152	172

Çalışılan altı primerde 60 çeşit farklı haplotip görülmesi, ilgili primerlerin farklı büyüklükte allellere sahip olduğunu gösterir. Örneğin, bu ölçüte göre, analizlerde kullanılan primerlerden en çok allel (dokuz adet) Pt1254 primerinde, en az allel (bir adet) ise Pt36480 primerinde görüldü. Bu durumda, Pt36480 primeri monomorfik, Pt1254 primeri ise polimorfik bir primerdi. Analizlerde kullanılan diğer primerlerin ise üç ile sekiz arasında değişen sayılarda allellere sahip oldukları ve hepsinin polimorfik olduğu gözlemlendi. Çalışılan altı primerden beşinin (Pt71936 dışındakiler) sahip olduğu allellerin aralarında sadece birer baz çiftlik (bç) farklar bulunduğu belirlendi. Pt71936 primerinde ise, 144 bç ile 147 bç allel büyüklükleri arasında herhangi bir büyüklüğe

sahip hiçbir allel olmadığı, bu iki büyüklük arasında iki bç'lik boşluğun bulunduğu gözlemlendi (Şekil 3.1). Bu durum, Sarılar popülasyonu dışındaki diğer popülasyonlarda toplam 13 bireyde gözlemlendi. Bük ve Doyran popülasyonlarında sadece 144 bç'lik allel görülürken, Hacıbekar popülasyonunda ise sadece 143 bç'lik allelin varlığı gözlemlendi. Murtbeli ve Kapan popülasyonlarında, hem 143 bç'lik hem de 144 bç'lik iki allele de rastlandı. Bütün popülasyonlar göz önüne alındığında altı lokusun her birinde görülen allellerin allel büyüklüklerine göre frekans dağılımları Şekil 3.1'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Kızılcım popülasyonlarında çalışılan altı primerin (lokusun) her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre frekans dağılımları (Dikey eksen: Frekans, Yatay eksen: Baz çifti olarak allel büyüklüğü)

Populasyonların, her bir primer bölgesi için sahip olduğu alleller ve ilgili allelleri bulunduran birey sayıları Çizelge 3.2’de belirtilmektedir. Buna göre en çok sayıda alleli olan primerler, Pt1254 (dokuz adet) ve Pt71936 (sekiz adet) primerleridir. Bununla beraber hiçbir populasyon bu primerlere ait bütün allellerin hepsini birden içermemektedir. Örneğin, Pt71936 primerinin Murtbeli ve Kapan populasyonlarındaki allellerine baktığımızda 152 bç’lik allel her iki populasyonda da bulunmamaktadır. Ayrıca, bazı allellerin sadece bir ve/veya birkaç populasyona özgü olduğu görülmüştür. Örneğin, Pt1254 lokusunda 70 bç’lik allel sadece Hacıbekar populasyonunda, 74 bç’lik allelde sadece Sarılar ve Hacıbekar populasyonlarında bulunmaktadır.

Çizelge 3.2. Kızılçam populasyonlarında çalışılan primerler, her bir primerdeki alleller (büyüklüklerine göre) ve her bir populasyonda ilgili allellere sahip olan birey sayıları

Primer ve Allel büyüklüğü		Hat 1			Hat 2			Toplam
		Populasyon*			Populasyon*			
		S	M	K	D	B	H	
Pt1254	70	0	0	0	0	0	5	5
	71	3	1	3	4	3	0	14
	72	0	2	3	1	1	3	10
	73	0	1	2	0	0	0	3
	74	1	0	0	0	0	1	2
	75	3	0	0	0	1	0	4
	76	23	18	25	21	28	25	140
	77	10	17	7	13	7	2	56
	78	0	1	0	1	0	0	2
Pt15169	118	7	5	8	5	5	5	35
	119	30	34	31	35	34	31	195
	120	2	1	1	0	1	0	5
Pt30204	137	1	0	0	0	0	0	1
	138	36	39	37	35	36	34	217
	139	3	1	2	5	3	2	16
	140	0	0	0	0	1	0	1
Pt36480	140	40	40	40	40	40	38	238
Pt71936	143	0	1	1	0	0	2	4
	144	0	2	4	1	2	0	9
	147	1	1	3	1	1	1	8
	148	17	28	17	19	14	22	117
	Devamı arka sayfada							

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.2'nin devamı								
Pt71936	149	9	2	7	7	12	8	45
	150	5	4	7	7	4	5	32
	151	7	2	1	4	6	0	20
	152	1	0	0	1	0	0	2
Pt87268	170	8	11	7	11	8	6	51
	171	11	6	17	7	16	19	76
	172	18	21	13	19	14	8	93
	173	3	2	2	3	2	3	15
Toplam		239	240	238	240	239	220	1416

*Populasyonlar: S: Sarılar, M: Murtbeli, K: Kapan, D: Doyran, B: Bük, H: Hacıbekar

3.2. Populasyonların Genetik Çeşitlilik Parametreleri

Analiz edilen populasyonlara ait genetik çeşitlilik parametreleri Çizelge 3.3'de sunulmuştur. Buna göre, ortalama genetik çeşitlilik %92.83 olarak gözlendi. Çalışılan primerler bakımından genetik çeşitliliğin en az olduğu populasyon %86.67 ile Murtbeli, en fazla olduğu populasyon ise %95.82 değeri ile Sarılar olarak belirlendi. Basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki ortalama genetik uzaklık katsayısı 4.87 olarak bulundu. Populasyon başına düşen ortalama haplotip sayısı 20.2, ortalama özel haplotip sayısı ise 6.2 olarak belirlendi.

Çizelge 3.3. Kızılçamda çalışılan altı populasyonda genetik çeşitlilik parametreleri ve haplotipler arasındaki uzaklık

Populasyon	n*	N*	N_p*	H_e*	D²_{sh}*
Doyran	40	23	6	0.9538	4.21
Sarılar	39	24	8	0.9582	4.03
Bük	39	21	3	0.9514	4.68
Murtbeli	40	16	3	0.8667	4.37
Kapan	38	20	7	0.9403	5.94
Hacıbekar	35	17	10	0.8992	5.97
Ortalama	38.5	20.2	6.2	0.9283	4.87

*n: değerlendirilen birey sayısı, N: haplotip çeşidi sayısı, N_p: özel ve/veya eşsiz haplotip sayısı, H_e: Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik katsayısı, D²_{sh}: basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki genetik uzaklık katsayısı

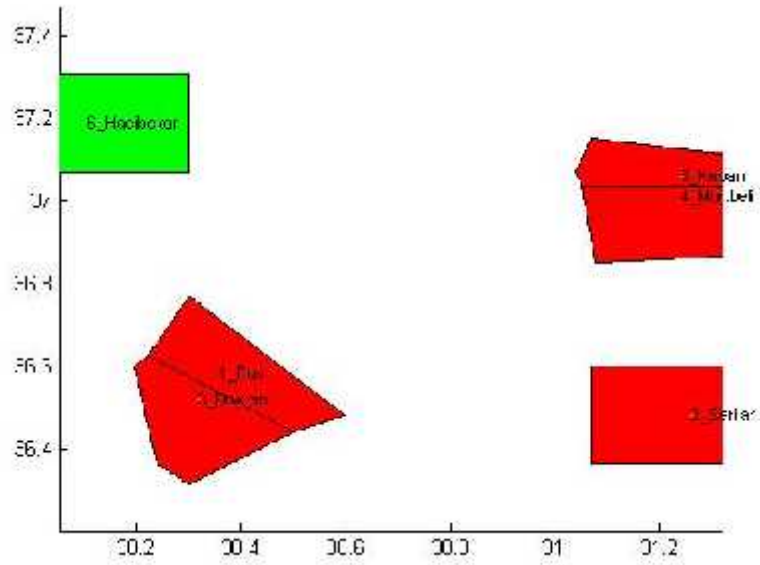
Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları Çizelge 3.4’de sunulmaktadır. Buna göre, çalışılan populasyonlar, bulundukları üç farklı yükselti kuşağına göre karşılaştırıldığında, yükselti kuşakları (gruplar) arasındaki genetik farklılık $R_{ST} = \%4.97$ ($P < 0.0655$) olarak bulundu (Çizelge 3.4.a). Populasyonlar, bulundukları iki hatta göre (doğu kesiti, batı kesiti) karşılaştırıldıklarında hatlar (gruplar) arasında istatistiksel olarak önemli farklılık görülmedi (Çizelge 3.4.b). Fakat, hatlar içinde (grup içi) farklı yükselti kuşağındaki populasyonlar arasında R_{ST} değeri $\%4.82$ olarak bulunmuştur ki bu sonuç Çizelge 3.4.a ile uyum içerisindedir. Bütün populasyonlar yükselti kuşağına, doğu-batı hattına ve bağımsız olarak göz önüne alındığında, genetik çeşitliliğin büyük kısmının ($\%86.48 - \%98.59$) populasyon içinde olduğu görülmüştür ($P < 0.004$, Çizelge 3.4). Ayrıca, populasyonlar içinde bulunan aileler arasında yüksek ve önemli düzeyde genetik çeşitliliğin olduğu bulunmuştur ($R_{ST} = 10.75$, $P < 0.0127$, Çizelge 3.4.c). Her bir karşılaştırmada (Çizelge 3.4.a, b ve c olarak gösterilen üç grup), karşılaştırılan grupların sahip oldukları haplotipler dikkate alınarak Arlequin programındaki analizleri sonucunda, F_{ST} değerleri sırasıyla, 0.01405, 0.01601 ve 0.04767 olarak bulunmuştur.

Allel frekanslarının ve populasyonlar arası coğrafik mesafenin dikkate alındığı BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure) analizi sonucunda, Hacıbekar bir grup, geri kalan diğer beş populasyon da başka bir grup olarak ortaya çıkmışlardır (Şekil 3.2). BAPS analizi, allel frekansları istatistiksel olarak önemli düzeyde fark göstermeyen populasyonları aynı renkte göstermektedir. Şekil 3.2’de populasyonlar enlem ve boylam derecelerine göre gösterilmişlerdir (Bkz. Çizelge 2.1). BAPS analizine göre, coğrafik olarak birbirine yakın olan Doyran ve Bük, ayrıca Murtbeli ve Kapan populasyonları allel frekansları bakımından da birbirine benzer görünmektedirler. Buna karşın, çalışılan altı populasyon içerisinde coğrafik olarak nispeten uzak olan ve kızılçamın optimum yayılışının perifer kısmında bulunan Hacıbekar populasyonu, allel frekansları bakımından çalışılan diğer beş popülasyondan farklı bulunmuştur.

Çizelge 3.4. Haplotipler arasındaki uzaklığa (D_{sh}^2) göre moleküler varyans analiz (AMOVA) sonuçları

Varyasyon kaynağı	s.d.	F-stat			R _{ST}		
		varyans mutlak değeri	Var. (%)	P	varyans mutlak değeri	Var. (%)	P
(a) Yükseltiye bağlı olarak üç populasyon çifti							
Gruplar-arası	2	0.0020	-0.42	0.6696	0.3535	4.97	0.0655
Grup-içi populasyonlar-arası	3	0.0086	1.83	0.0782	-0.0294	-0.41	0.5005
Populasyon-içi	225	0.4643	98.59	0.0000	6.7817	95.44	0.0039
(b) İki yükselti hattı							
Gruplar-arası	1	0.0014	0.29	0.2903	-0.1389	-1.99	0.7986
Grup-içi populasyonlar-arası	4	0.0062	1.32	0.0088	0.3366	4.82	0.1154
Populasyon-içi	225	0.4643	98.40	0.002	6.7817	97.17	0.0039
(c) Altı populasyon yükselti kuşağı ve yükselti hattından bağımsız olarak							
Populasyonlar-arası	5	0.0057	1.22	0.0137	0.1951	2.77	0.0528
Populasyon-içi aileler-arası	54	0.0167	3.55	0.0117	0.7561	10.75	0.0127
Aile-içi	171	0.4488	95.23	0.0009	6.0838	86.48	0.0009

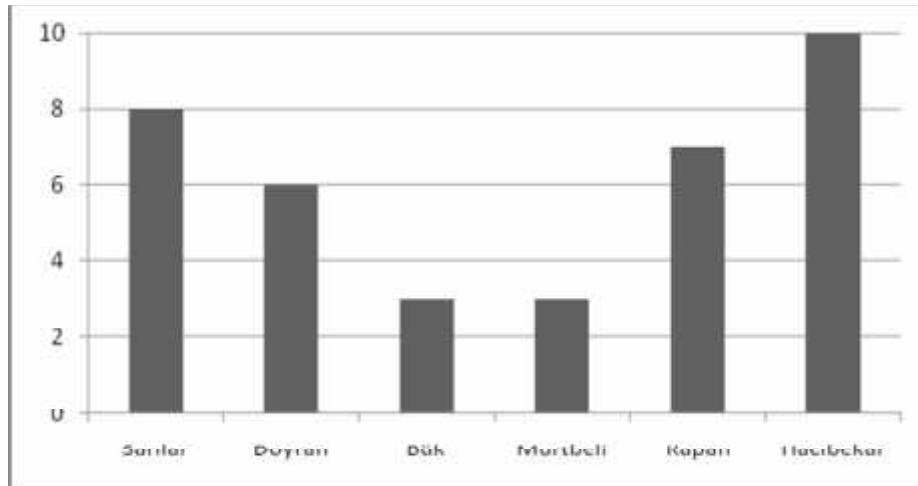
F-stat: Wright (1965)'in F-istatistiği, s.d.: serbestlik derecesi, Var.: Varyans, P: olasılık değeri, R_{ST}: alleller arasındaki büyüklük farkının kareler ortalaması



Şekil 3.2. Populasyonların enlem (dikey eksen) ve boylamlarına (yatay eksen) göre BAPS analizi sonuçları

3.3. Populasyonların Ortak ve Özgü Haplotipler Bakımından Karşılaştırılması

Populasyonların sahip oldukları kendine özgü haplotip sayıları Şekil 3.3'de gösterilmiştir (Ayrıca, Bkz. Çizelge 3.3). Buna göre, kendine özgü haplotip sayısı orta zonda bulunan populasyonlarda (Murtbeli ve Bük) en az, kenar zon (marjinal) populasyonlarda (Sarılar ve Hacıbekar) ise en fazla olarak görülmüştür.



Şekil 3.3. Çalışılan altı kızılçam populasyonunda görülen populasyona özgü haplotip sayıları

Populasyonların sahip oldukları ortak haplotiplerin sayıları Çizelge 3.5’de verilmiştir. Buna göre, Sarılar populasyonu, Hacibekar populasyonu ile beş, Bük populasyonu ile 13 ortak haplotipe sahiptir. Sarılar populasyonunun diğer populasyonlar ile paylaştığı ortak haplotiplerin toplam sayısı ise 46’dır (Çizelge 3.5). Çalışılan altı populasyon arasında Bük populasyonu, diğer beş populasyon ile en çok sayıda (53 adet) ortak haplotipi paylaşan populasyondur. Diğer populasyonlar ile en az sayıda (30 adet) ortak haplotipi paylaşan populasyon ise Hacibekar populasyonudur.

Populasyonlar, aşağıdaki paragraflarda ayrı ayrı ele alınmış ve diğer populasyonlar ile olan benzerlik durumları pasta grafikleri ile gösterilmiştir. Bu grafikler, Çizelge 3.5’de gösterilen ve ortak paylaşılan haplotip sayıları temel alınarak yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Kızılçamda çalışılan altı populasyonun sahip oldukları ortak haplotip çeşitlerinin sayıları

	Doyran	Sarılar	Bük	Murtbeli	Kapan	Hacibekar
Doyran	-	12	13	9	11	6
Sarılar	12	-	13	8	8	5
Bük	13	13	-	10	11	6
Murtbeli	9	8	10	-	10	6
Kapan	11	8	11	10	-	7
Hacibekar	6	5	6	6	7	-
Toplam*	51	46	53	43	47	30

*Diğer populasyonlar ile paylaşılan toplam haplotip sayıları

3.3.1. Doyran populasyonu

Doyran populasyonunun sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.6’da gösterilmektedir. Buna göre, Doyran populasyonunun toplam 23 haplotip çeşidine sahip olduğu görülmektedir. Haplotiplerden 6 tanesinin (H6, H7, H11, H50, H52, H59) Doyran populasyonuna özgü olduğu ve bunların Doyran populasyonunda bulunan toplam haplotiplerin (40 adet) %15’ini oluşturdukları bulunmuştur. Ayrıca, altı populasyonun hepsinde bulunan ortak dört haplotipin (H12, H19, H39, H45) Doyran populasyonunda toplam 17 adet olduğu bulunmuştur. Bu ortak dört haplotipin (17 adet) Doyran populasyonundaki toplam haplotiplerin (40 adet) %42.5’ini oluşturduğu

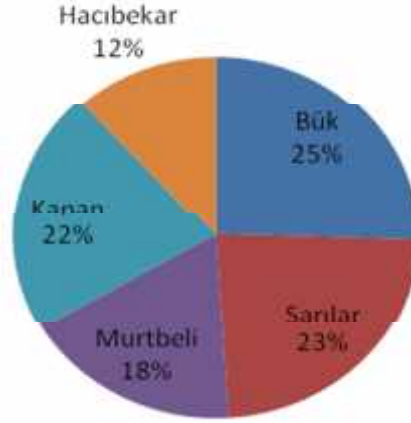
görülmüştür. Haplotip frekanslarından hesaplanan H_e değeri [Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik katsayısı] Doyran popülasyonu için 0.9538 olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3).

Çizelge 3.6. Doyran popülasyonunun haplotipleri ve frekansları (popülasyona özgü olan haplotipler, koyu ve italik olarak gösterilmiştir)

Sıra no	Haplotip			
	kodu	sayısı	frekansı	frekans ²
1	H3	1	0.025	0.000625
2	H6	1	0.025	0.000625
3	H7	1	0.025	0.000625
4	H11	1	0.025	0.000625
5	H12	6	0.15	0.0225
6	H17	2	0.05	0.0025
7	H19	3	0.075	0.005625
8	H27	2	0.05	0.0025
9	H30	1	0.025	0.000625
10	H32	1	0.025	0.000625
11	H39	3	0.075	0.005625
12	H41	1	0.025	0.000625
13	H43	1	0.025	0.000625
14	H44	1	0.025	0.000625
15	H45	5	0.125	0.015625
16	H47	1	0.025	0.000625
17	H49	1	0.025	0.000625
18	H50	1	0.025	0.000625
19	H51	1	0.025	0.000625
20	H52	1	0.025	0.000625
21	H57	3	0.075	0.005625
22	H59	1	0.025	0.000625
23	H60	1	0.025	0.000625
Toplam	23	40	1	0.07

Doyran popülasyonunun çalışılan diğer beş popülasyon ile benzerlik durumu, diğer beş popülasyon ile paylaştığı ortak haplotipler bakımından Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Şekildeki değerler, her bir popülasyonun Doyran popülasyonu ile ortak olduğu haplotip sayısının, Doyran popülasyonunun çalışılan diğer beş popülasyon ile ortak olduğu toplam haplotip sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Örneğin, Doyran popülasyonu, diğer beş popülasyon ile sahip olduğu toplam 51 ortak haplotipten 13 tanesini Bük

populasyonu ile paylaştığı için, Bük populasyonu ile benzerlik derecesi $13/51 = 0.254 \approx \%25$ bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.5). Buna göre, Doyran populasyonunun en çok Bük (%25), Sarılar (%23) ve Kapan (%22), en az ise Hacıbekar (%12) populasyonu ile ortak haplotipe sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.4. Doyran populasyonunun diğer populasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının populasyonlar arasında dağılımı (%)

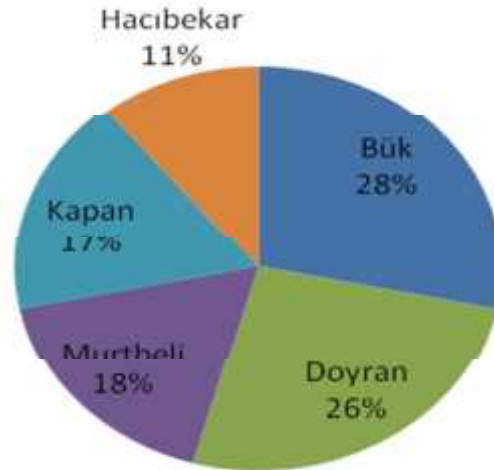
3.3.2. Sarılar populasyonu

Sarılar populasyonunun sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.7’de gösterilmektedir. Buna göre, Sarılar populasyonunun toplam 24 haplotip çeşidine sahip olduğu görülmektedir. Haplotiplerden sekiz tanesinin (H13, H21, H24, H26, H38, H40, H42, H48) Sarılar populasyonuna özgü olduğu ve bu haplotiplerin toplam sekiz adet olduğu görülmüştür. Bu sekiz adet özgü haplotipin Sarılar populasyonunda görülen toplam 39 adet haplotipin %20.5’ini oluşturdukları bulunmuştur. Ayrıca, altı populasyonun hepsinde ortak olan dört haplotipin (H12, H19, H39, H45) Sarılar populasyonunda toplam 14 adet olduğu bulunmuştur. Bu 14 adet ortak haplotipin, Sarılar populasyonunun toplam haplotiplerinin (39 adet) %35.9’unu oluşturduğu görülmüştür. Haplotip frekanslarından hesaplanan H_e değeri [Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik katsayısı] Sarılar populasyonu için 0.9582 olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3). Bu değer, çalışılan populasyonlar arasında en yüksek H_e değeri olarak ortaya çıkmıştır.

Çizelge 3.7. Sarılar popülasyonunun haplotipleri ve frekansları
(popülasyona özgü olan haplotipler, koyu ve italik olarak gösterilmiştir)

Sıra no	Haplotip			
	kodu	sayısı	frekansı	frekans ²
1	H12	6	0.1538462	0.0236686
2	<i>H13</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
3	H14	1	0.025641	0.0006575
4	H18	1	0.025641	0.0006575
5	H19	2	0.0512821	0.0026298
6	<i>H21</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
7	<i>H24</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
8	<i>H26</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
9	H30	2	0.0512821	0.0026298
10	H32	1	0.025641	0.0006575
11	<i>H38</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
12	H39	4	0.1025641	0.0105194
13	<i>H40</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
14	H41	1	0.025641	0.0006575
15	<i>H42</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
16	H43	1	0.025641	0.0006575
17	H45	2	0.0512821	0.0026298
18	H46	1	0.025641	0.0006575
19	H47	1	0.025641	0.0006575
20	<i>H48</i>	<i>1</i>	<i>0.025641</i>	<i>0.0006575</i>
21	H49	1	0.025641	0.0006575
22	H53	4	0.1025641	0.0105194
23	H57	2	0.0512821	0.0026298
24	H60	1	0.025641	0.0006575
Toplam	24	39	1	0.0664037

Ortak paylaşılan haplotip sayısına göre (Bkz. Çizelge 3.5), Sarılar popülasyonunun çalışılan diğer beş popülasyona olan benzerlik durumu Şekil 3.5’de gösterilmiştir. Buna göre, Sarılar popülasyonunun en çok Bük (%28) ve Doyran (%26), en az Hacıbekar (%11) popülasyonu ile ortak haplotipe sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.5. Sarılar populasyonunun diğer populasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının populasyonlar arasında dağılımı (%)

3.3.3. Bük populasyonu

Bük populasyonunun sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.8’de gösterilmektedir. Buna göre, Bük populasyonunun toplam 21 haplotip çeşidine sahip olduğu bulunmuştur. Haplotiplerden üç tanesinin (H34, H54, H56) Bük populasyonuna özgü olduğu ve bunların toplam üç adet bulundukları görülmüştür. Bu üç adet özgü haplotipin, Bük populasyonunun sahip olduğu toplam haplotiplerin (39 adet) %7.7’sini oluşturdukları bulunmuştur. Ayrıca, altı populasyonun hepsinde ortak olan dört haplotipin Bük populasyonunda toplam 11 adet olduğu ve Bük populasyonunda bulunan toplam haplotiplerin (39 adet) %28.2’sini oluşturdukları görülmüştür. Haplotip frekanslarından hesaplanan H_e değeri [Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik katsayısı] Bük populasyonu için 0.9514 olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3).

Çizelge 3.8. Bük populasyonunun haplotipleri ve frekansları (populasyona özgü olan haplotipler, koyu ve italik olarak gösterilmiştir)

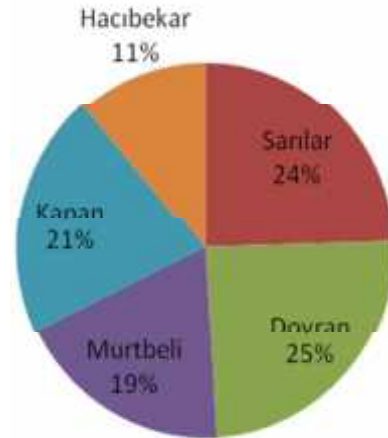
Sıra no	Haplotip			
	kodu	sayısı	frekansı	frekans ²
1	H2	1	0.025641	0.0006575
2	H3	1	0.025641	0.0006575
3	H9	1	0.025641	0.0006575
4	H12	4	0.1025641	0.0105194

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.10'un devamı

5	H14	1	0.025641	0.0006575
6	H18	3	0.0769231	0.0059172
7	H19	5	0.1282051	0.0164366
8	H27	1	0.025641	0.0006575
9	H30	1	0.025641	0.0006575
10	H32	5	0.1282051	0.0164366
11	H34	1	0.025641	0.0006575
12	H39	1	0.025641	0.0006575
13	H41	1	0.025641	0.0006575
14	H43	1	0.025641	0.0006575
15	H45	1	0.025641	0.0006575
16	H49	2	0.0512821	0.0026298
17	H51	1	0.025641	0.0006575
18	H53	3	0.0769231	0.0059172
19	H54	1	0.025641	0.0006575
20	H56	1	0.025641	0.0006575
21	H57	3	0.0769231	0.0059172
Toplam	21	39	1	0.0729783

Bük popülasyonunun çalışılan diğer beş popülasyon ile benzerlik durumu, paylaşılan ortak haplotip sayısına göre Şekil 3.6'da gösterilmiştir (Bkz. Çizelge 3.5). Buna göre, Bük popülasyonunun en çok Doyran (%25) ve Sarılar (%24), en az ise Hacibekar (%11) popülasyonu ile ortak haplotipe sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 3.6. Bük popülasyonunun diğer popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%)

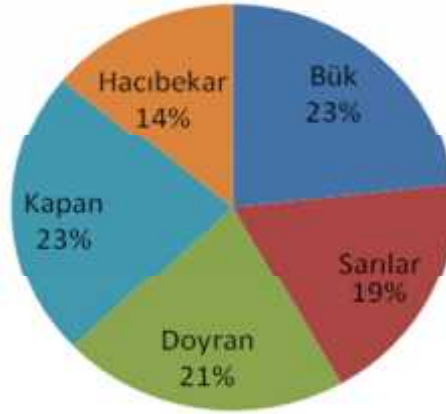
3.3.4. Murtbeli popülasyonu

Murtbeli popülasyonunun sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.9’da gösterilmektedir. Buna göre, Murtbeli popülasyonunun toplam 16 haplotip çeşidine sahip olduğu görülmektedir. Haplotiplerden üç tanesinin (H5, H55, H58) Murtbeli popülasyonuna özgü olduğu ve bunların toplam üç adet oldukları bulunmuştur. Bu üç adet özgü haplotipin, Murtbeli popülasyonunda gözlenen toplam haplotiplerin (40 adet) %7.5’ini oluşturdukları bulunmuştur. Altı popülasyonun hepsinde görülen ortak dört haplotipin Murtbeli popülasyonunda 27 adet olduğu ve bu haplotiplerin Murtbeli popülasyonunda bulunan toplam haplotiplerin (40 adet) %67.5’ini oluşturduğu görülmüştür. Haplotip frekanslarından hesaplanan H_e değeri [Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik katsayısı] Murtbeli popülasyonu için 0.8667 olarak bulunmuştur. Bu değer, çalışılan popülasyonlar arasında en düşük H_e değeri olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.3).

Çizelge 3.9. Murtbeli popülasyonunun haplotipleri ve frekansları (popülasyona özgü olan haplotipler, koyu ve italik olarak gösterilmiştir)

Sıra no	Haplotip kodu	Haplotip sayısı	Frekans	Frekans ²
1	H2	1	0.025	0.000625
2	H3	1	0.025	0.000625
3	H5	1	0.025	0.000625
4	H9	1	0.025	0.000625
5	H12	8	0.2	0.04
6	H14	1	0.025	0.000625
7	H17	2	0.05	0.0025
8	H19	3	0.075	0.005625
9	H30	1	0.025	0.000625
10	H39	12	0.3	0.09
11	H44	1	0.025	0.000625
12	H45	4	0.1	0.01
13	H46	1	0.025	0.000625
14	H55	1	0.025	0.000625
15	H57	1	0.025	0.000625
16	H58	1	0.025	0.000625
Toplam	16	40	1	0.155

Ortak paylaşılan haplotip sayısına göre (Bkz. Çizelge 3.5), Murtbeli popülasyonunun çalışılan diğer beş popülasyona olan benzerlik durumu Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Buna göre, Murtbeli popülasyonunun en çok Bük (%23), Kapan (%23) ve Doyran (%21), en az ise Hacibekar (%14) popülasyonu ile ortak haplotipe sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.7. Murtbeli popülasyonunun diğer popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%)

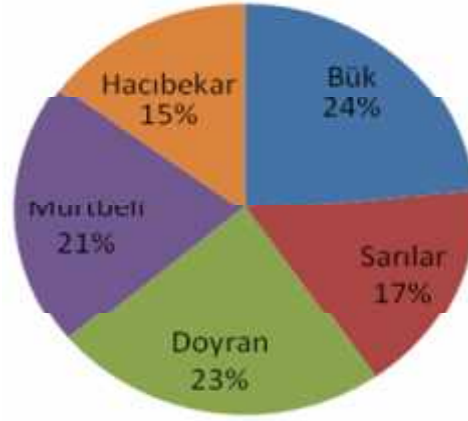
3.3.5. Kapan popülasyonu

Kapan popülasyonunun sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.10’da gösterilmektedir. Buna göre, Kapan popülasyonunun toplam 20 haplotip çeşidine sahip olduğu gözlenmiştir. Haplotiplerden yedi tanesinin (H4, H10, H20, H23, H28, H29, H37) Kapan popülasyonuna özgü olduğu ve toplam yedi adet oldukları bulunmuştur. Bu yedi özgü haplotipin Kapan popülasyonunun sahip olduğu toplam haplotiplerin (38 adet) %18.4’ünü oluşturdukları bulunmuştur. Ayrıca, altı popülasyonun hepsinde görülen ortak dört haplotipin Kapan popülasyonunda 18 adet olduğu ve bunların Kapan popülasyonunda bulunan toplam haplotiplerin (38 adet) %47.4’ünü oluşturduğu görülmüştür. Haplotip frekanslarından hesaplanan He değeri [Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik katsayısı] Kapan popülasyonu için 0.9403 olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3).

Çizelge 3.10. Kapan populasyonunun haplotipleri ve frekansları
(populasyona özgü olan haplotipler, koyu ve italik olarak gösterilmiştir)

Sıra no	Haplotip			
	kodu	sayısı	frekansı	frekans ²
1	H2	1	0.0263158	0.0006925
2	H3	3	0.0789474	0.0062327
3	<i>H4</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
4	<i>H10</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
5	H12	6	0.1578947	0.0249307
6	H14	2	0.0526316	0.0027701
7	H17	1	0.0263158	0.0006925
8	H19	4	0.1052632	0.0110803
9	<i>H20</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
10	<i>H23</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
11	H27	1	0.0263158	0.0006925
12	<i>H28</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
13	<i>H29</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
14	H30	1	0.0263158	0.0006925
15	H32	1	0.0263158	0.0006925
16	<i>H37</i>	<i>1</i>	<i>0.0263158</i>	<i>0.0006925</i>
17	H39	2	0.0526316	0.0027701
18	H43	1	0.0263158	0.0006925
19	H44	2	0.0526316	0.0027701
20	H45	6	0.1578947	0.0249307
Toplam	20	38	1	0.0844875

Kapan populasyonunun çalışılan diğer beş populasyon ile benzerlik durumu, ortak paylaşılan haplotip sayısına göre (Bkz. Çizelge 3.5), Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Buna göre, Kapan populasyonunun en çok Bük (%24), Doyran (%23) ve Murtbeli (%21), en az ise Hacıbekar (%15) populasyonu ile ortak haplotipe sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.8. Kapan populasyonunun diğer populasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının populasyonlar arasında dağılımı (%)

3.3.6. Hacıbekar populasyonu

Hacıbekar populasyonunun sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.11’de gösterilmektedir. Buna göre, Hacıbekar populasyonu toplam 17 haplotip çeşidine sahiptir. Haplotiplerden 10 tanesinin (H1, H8, H15, H16, H22, H25, H31, H33, H35, H36) Hacıbekar populasyonuna özgü olduğu ve toplam 13 adet oldukları görülmüştür. Bu 13 adet özgü haplotipin Hacıbekar populasyonundaki toplam haplotiplerin (35 adet) %37.1’ini oluşturdukları bulunmuştur. Ayrıca, altı populasyon arasında paylaşılan dört haplotipin Hacıbekar populasyonunda 18 adet olduğu ve bunların Hacıbekar populasyonundaki toplam haplotiplerin (35 adet) %51.4’ünü oluşturduğu görülmüştür. Haplotip frekanslarından hesaplanan H_e değeri [Nei (1987)’nin genetik çeşitlilik katsayısı] Hacıbekar populasyonu için 0.8992 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.11. Hacıbekar populasyonunun haplotipleri ve frekansları (populasyona özgü olan haplotipler, koyu ve italik olarak gösterilmiştir)

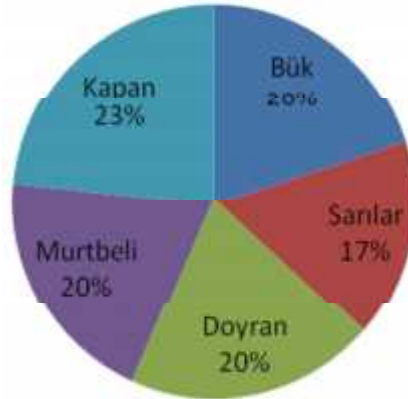
Sıra no	Haplotip			
	kodu	sayısı	frekansı	frekans ²
1	<i>H1</i>	<i>2</i>	<i>0.0571429</i>	<i>0.0032653</i>
2	<i>H8</i>	<i>1</i>	<i>0.0285714</i>	<i>0.0008163</i>
3	H12	5	0.1428571	0.0204082
4	H14	1	0.0285714	0.0008163
5	<i>H15</i>	<i>1</i>	<i>0.0285714</i>	<i>0.0008163</i>
6	<i>H16</i>	<i>2</i>	<i>0.0571429</i>	<i>0.0032653</i>

Devamı arka sayfada

Çizelge 3.11'in devamı

7	H19	10	0.2857143	0.0816327
8	H22	1	0.0285714	0.0008163
9	H25	1	0.0285714	0.0008163
10	H27	1	0.0285714	0.0008163
11	H31	1	0.0285714	0.0008163
12	H33	2	0.0571429	0.0032653
13	H35	1	0.0285714	0.0008163
14	H36	1	0.0285714	0.0008163
15	H39	1	0.0285714	0.0008163
16	H44	2	0.0571429	0.0032653
17	H45	2	0.0571429	0.0032653
Toplam	17	35	1	0.1265306

Hacıbekar popülasyonunun çalışılan diğer beş popülasyon ile benzerlik durumu, paylaşılan ortak haplotiplerin (Bkz. Çizelge 3.5) yüzdeleri alınarak Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Buna göre, Hacıbekar popülasyonunun en çok Kapan (%23), en az ise Sarılar (%17) popülasyonu ile ortak haplotipe sahip olduğu bulunmuştur. Hacıbekar popülasyonunun kalan üç popülasyon (Doyran, Bük ve Murtbeli) ile benzerlik oranı (%20) aynı çıkmıştır.



Şekil 3.9. Hacıbekar popülasyonunun diğer popülasyonlarla paylaştığı ortak haplotip sayılarının popülasyonlar arasında dağılımı (%)

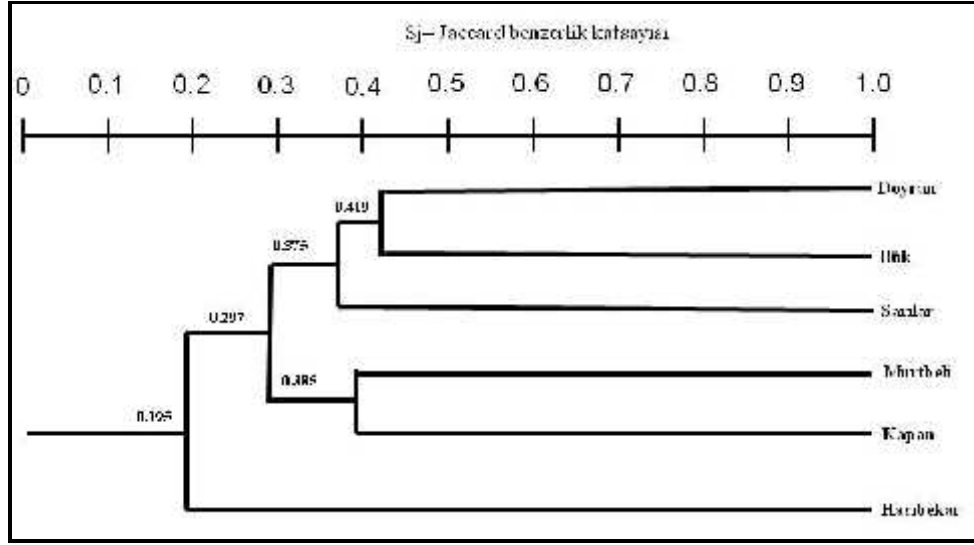
3.4. Populasyon Çiftleri Arasındaki Jaccard Benzerlik Katsayıları

Çalışılan altı kızılçam populasyonu ikişerli alınıp birbirleri ile karşılaştırılınca, kombinasyon olarak $C = \frac{N!}{(N-k)!k!} = \frac{6!}{4!2!} = 15$ adet ikili karşılaştırma olasıdır (N: populasyon sayısı, k: ikişerli karşılaştırma). Bu nedenle çalışmamızda 15 adet S_j değeri elde edilmiş ve bu değerler bir matris üzerinde gösterilmiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. Çalışılan altı kızılçam populasyonu için hesaplanan Jaccard benzerlik katsayıları

Populasyon	D	S	B	M	K
Sarılar	0.343				
Bük	0.419	0.406			
Murtbeli	0.343	0.25	0.37		
Kapan	0.344	0.222	0.367	0.385	
Hacıbekar	0.176	0.139	0.188	0.222	0.233

Yukarıda belirtilen çizelgenin elde edilmesinde, EK-5’de ayrıntılı bir şekilde açıklanmış olan maddeler sırasıyla izlenmiştir. Fenogram çizimi için gerekli olan bütün Jaccard benzerlik katsayıları matrisleri de EK-5’de belirtilen maddeler izlenerek elde edildi. Populasyon çiftlerinin Jaccard benzerlik katsayısına göre sahip oldukları fenogram Şekil 3.10’da görülmektedir. Fenograma göre, Doyran ve Bük populasyonları sahip oldukları haplotiplerin benzerlik veya farklılıkları dikkate alınınca birbirine en çok benzeyen populasyonlardır. Coğrafik olarak birbirine yakın olan Murtbeli ve Kapan populasyonları da birbirine benzer olan ikinci kümeyi oluşturmaktadır. Sarılar populasyonu, Doyran ve Bük populasyonlarının oluşturduğu kümeye 0.375 değerinde katılmıştır. Hacıbekar populasyonu ise, BAPS analizleri sonucunda olduğu gibi (Bkz. Şekil 3.2), analiz edilen diğer beş populasyondan farklı bir kümede yer almaktadır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Çalışılan altı kızılçam populasyonunun sahip oldukları haplotipler bakımından birbirine yakınlık ve benzerlik derecelerini gösteren fenogram

3.5. Populasyon Çiftleri Arasındaki Genetik Mesafe (F_{ST}) Değerleri

Çizelge 3.6 ile 3.11 arasındaki çizelgelerde verilen haplotip frekansları kullanılarak populasyon çiftleri arasındaki F_{ST} değerleri hesaplandı (Çizelge 3.13). Ayrıca, F_{ST} değerlerinin olasılık değerleri (P), ilgili populasyon çiftlerinin istatistiksel önemde farklı olup olmadıkları da Çizelge 3.13’de belirtilmiştir. Bütün analizler Arlequin versiyon 3.11’de rasgele 1023 standart permütasyon prosedürü seçilerek yapılmıştır. Buna göre, Murtbeli populasyonu, Bük ve Kapan populasyonlarından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulunmuştur. Ayrıca Hacibekar populasyonu, Kapan populasyonu hariç diğer bütün populasyonlardan en az 0.05 düzeyine göre istatistiksel önemde farklı bulunmuştur. Analiz edilen diğer populasyon çiftleri arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark görülmemiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Populasyon çiftleri arasındaki genetik mesafe (F_{ST}) ve farklılık derecesini gösteren olasılık (P) değerleri

Populasyon	Doyran	Sarılar	Bük	Murtbeli	Kapan
Sarılar	-0.0063 (0.8076)	-			
Bük	0.0026 (0.3369)	-0.0029 (0.6543)	-		
Murtbeli	0.0139 (0.0986)	0.0143 (0.0918)	0.0477 (0.0001)*	-	
Kapan	-0.0109 (0.9492)	0.0037 (0.2725)	0.0101 (0.1299)	0.0199 (0.0381)*	-
Hacıbekar	0.0194 (0.0371)*	0.0293 (0.0088)*	0.0208 (0.0303)*	0.0544 (0.0020)*	0.0127 (0.1104)

*P = En az 0.05 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak farklı

3.6. Morfolojik Verilerin Analizi

Morfolojik veriler kullanılarak her bir yaş ve çalışılan her bir karaktere ait Q_{ST} değerleri hesaplandı. Hesaplama $Q_{ST} = V_P / (V_P + 8 V_F)$ formülü kullanıldı. Formülde V_P = Populasyon varyansını, V_F = Populasyon-içi ailelerin varyansını belirtmektedir. Buna göre, bulunan Q_{ST} değerleri Çizelge 3.14’de sunulmuştur. Populasyonlar 30. yaş çap karakteri için yükselti kuşaklarına göre üç grup halinde (alçak, orta ve yüksek zon) alındıklarında Q_{ST} değerleri 0.000 olarak bulunmuştur. Her bir populasyon bağımsız olarak ele alındığında ise Q_{ST} değeri 0.077 olarak gözlenmiştir. En yüksek Q_{ST} değerine ise 13. yaştaki boy karakterinde rastlanmıştır. Yükseltiye göre 30. yaştaki çap karakteri için üç grup halinde alınan populasyonların Q_{ST} değeri hariç, diğer bütün yaşlara ve karakterlere ait Q_{ST} değerleri F_{ST} değerlerinden yüksek bulunmuştur.

Çizelge 3.14. Farklı yaş ve karakterlere ait varyans ve Q_{ST} değerleri

Yaş	13			17			30	
Varyans	Karakter			Karakter			Karakter	
	Boy	Çap	Hacim	Boy	Çap	Hacim	Çap ¹	Çap ²
V_P	1702.07	48.8	13.00	2484	0.61	44.75	288.13	0
$V_{F(P)}$	859.67	38.0	7.69	1519.4	0.56	30.30	429.19	429.19
Q_{ST}	0.198	0.138	0.174	0.170	0.119	0.156	0.077	0.000

¹Bütün populasyonlar bağımsız olarak alınmıştır,

²Populasyonlar yükselti kuşağına göre (yüksek, orta ve alçak zon) üç grup halinde ele alınmıştır

4. TARTIŞMA

4.1. Haplotip ve Allel Çeşitliliği

Kızılçam ile daha önce cpSSRs belirteçleri ile yapılan ilk çalışma, literatür bilgimize göre, Bucci vd (1998)'nin yaptığı çalışmadır. Bucci vd (1998)'nin yaptığı çalışmada, Yunanistan, Türkiye ve Lübnan'dan farklı kızılçam populasyonları alınmış ve genetik çeşitlilikleri ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, bahsedilen çalışmada, *Pinus elderica* Medw. ve *Pinus halepensis* Mill. populasyonları da çalışılıp genetik çeşitlilik düzeyleri ve Türkiye-Kıranköy orijinli (Uşak) Halep çamı + kızılçam simpatrik populasyonları incelenerek, aralarındaki ilişki belirtilmiştir.

Kızılçam ile ilgili olarak daha önce izoenzim (Conkle vd 1988, Kara vd 1997, Panetsos vd 1998, Korol vd 2002a, b, Aravanopoulos vd 2004) ve RAPD belirteçleri (Kandemir vd 2004, İçgen vd 2006, Lise vd 2007) kullanılarak çalışmalar yapılmıştı. Bu tez çalışmasında ele alınan altı kızılçam populasyonunda görülen genetik çeşitlilik düzeyi, adı geçen çalışmalardan elde edilen genetik çeşitlilik değerlerinin arasında bulunmuştur. Basamaklı mutasyon modeline göre bu tez çalışmasında populasyon-içi ortalama haplotip çeşitlilik düzeyi $D_{sh}^2 = 4.87$ (Bkz. Çizelge 3.3) olarak belirlenmiştir. Bu değer; *Pinus halepensis* Mill. ($D_{sh}^2 = 3.58$, Morgante vd 1997), *Pinus halepensis* Mill. ve *Pinus pinaster* Ait. ($D_{sh}^2 = 2.3$, Gomez vd 2005), *Pinus pinaster* Ait. ($D_{sh}^2 = 3.04$, Ribeiro vd 2001) ve *Pinus sylvestris* L. ($D_{sh}^2 = 4.3$, Robledo-Arnuncio vd 2005) gibi Akdeniz havzasında ve/veya Avrupa'da yayılış gösteren diğer çam türleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlardan nispeten yüksektir. Bu tez çalışmasında örneklenen populasyonlar sadece Antalya havzasını kapsamasına rağmen, kızılçam populasyonlarında görülen bu yüksek sayıdaki haplotipik çeşitlilik düzeyi, kızılçamın adı geçen diğer çam türlerine göre daha yüksek genetik çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu tez çalışmasından elde edilen haplotipik çeşitlilik düzeyi Bucci vd (1998) tarafından kızılçam ile ilgili yapılan çalışmadaki sonuçlardan da yüksek bulunmuştur. Bu durum her iki çalışmada ele alınan örnek sayısının azlığı veya çokluğu ile açıklanabilir. Bucci vd (1998)'de her bir kızılçam populasyonu için 7-12 birey

çalışılmışken, bu çalışmada her bir populasyon için 35 ila 40 birey değerlendirmeye alınmıştır (Bkz. Çizelge 3.3).

Kızılçam ve/veya diğer çam türleri ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, bu tez çalışmasında bulunan allel sayısı (29 adet) ve haplotip sayısı (60 adet) nispeten yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Oysa yapılan diğer çalışmalarda kullanılan populasyon sayısı ve/veya analiz edilen lokuslar, bu tez çalışmasında ele alınan populasyon ve/veya lokuslardan daha fazladır (Morgante vd 1997, Bucci vd 1998, Echt vd 1998, Ribeiro vd 2001, Gomez vd 2005, Robledo-Arnuncio vd 2005). Buna karşın, bu tez çalışmasında bulunan allel ve haplotip sayıları nispeten yüksektir. Bunun nedeni, bu tezde çalışılan populasyonların yüksek genetik çeşitlilik barındırması ve bu tez çalışmasında diğer çalışmalara göre her bir populasyondan daha fazla birey analiz edilmiş olması olabilir. Örneğin, yukarıda bahsedilen çalışmalardaki çam türlerinde her bir populasyondan 7-25 birey incelenmesine karşın, bu tez çalışmasında 35-40 birey incelenmiştir. Ayrıca, bu tezde çalışılan bazı lokusların (Pt1254, Pt71936) kızılçamda oldukça yüksek allel çeşitliliğine sahip olması (Bkz. Çizelge 3.2 ve Şekil 3.1), allel ve haplotip sayısının yüksek çıkmasına neden olmuş olabilir.

Analiz edilen beş polimorfik lokusta bulunan allel büyüklükleri Bucci vd (1998)'nin yaptığı çalışmadaki sonuçlar ile çoğunlukla paralellik göstermektedir. Bu tez çalışmasında incelenen ve en yüksek allel sayısına (dokuz adet) sahip olan Pt1254 primeri, Bucci vd (1998) tarafından incelenen primerler arasında değildir. Bununla birlikte, Bucci vd (1998) Pt15169 lokusunun, bu tez çalışmasında bulduğumuz allellere ek olarak, 117 bp'lik allele de sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, Pt36480 lokusunun üç, Pt30204 lokusunun iki ve Pt71936 lokusunun ise 145-150 bp arasında altı allele sahip olduğu bulunmuştur. Pt87268 lokusu için ise, kızılçamda bu tez çalışmasının sonuçları ile aynı bp büyüklüğündeki allelleri bulduklarını belirtmişlerdir (Bkz. Şekil 3.1 ve Çizelge 3.2).

Bu tez çalışmasının sonuçları ile Bucci vd (1998)'nin sonuçları arasında göze çarpan önemli bir farklılık Pt36480 lokusunda görülmektedir. Bucci vd (1998), bu lokusu çalışılan kızılçam populasyonlarında polimorfik olarak bulmalarına karşın, bu

tez çalışmasında ilgili lokus monomorfik olarak gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.1). Bu durum; Bucci vd (1998)'nin örneklediği kızılçam populasyonlarının Yunanistan, Türkiye ve Lübnan gibi geniş bir coğrafik alanı kapsamasına karşın, bu tez çalışmasında sadece türün Antalya'da bulunan ve coğrafik olarak nispeten dar bir alandaki altı populasyonunun ele alınmış olması ile açıklanabilir.

Coğrafik olarak birbirlerine çok uzak olan populasyonlar, gen havuzunu kaplayan alanın genişlemesi nedeniyle genetik çeşitlilik bakımından birbirine yakın populasyonlara göre daha farklı bulunmaktadır. Coğrafik olarak birbirine yakın olan ve/veya türün kesintisiz yayılış gösterdiği alanlardan örneklenen populasyonlarda gen akışı olma olasılığı yüksek olduğundan, populasyonlar-arası genetik çeşitlilik düzeyi ve/veya allel çeşitliliği benzer olabilmektedir. Bundan dolayı, populasyonlar-arası ve/veya populasyon-içi örnekleme yaparken populasyonların ve/veya bireylerin birbirlerine uzak mesafelerde (> 100 m) seçilmesi, genetik çeşitlilik düzeyinin daha geniş olasılıkla yakalanabilmesini sağlamaktadır (Balloux ve Lugon-Moulin 2002, Petit vd 2005). Bununla birlikte, farklı çevre koşullarında yetişen populasyonlar farklı seleksiyon baskısına maruz kalabilirler. Özellikle orman ekosistemleri, çok kısa mesafelerde değişkenlik gösterebilen farklı doğa birimlerinden oluşabilmektedir. Akdeniz havzası, Ortadoğu ve Türkiye'de bulunan ormanların çoğunun yer aldığı dağlık bölgelerde, iklim, toprak ve biyolojik kaynaklı çevre etmenlerinin daha kısa mesafelerde ve daha sık değiştiği bilinmektedir. Aynı türün bir dağın farklı yamaçlarında bulunan iki komşu populasyonu bile, birbirlerinden farklı çevre etmenleri ve farklı seleksiyon basıncı altında bulunacakları için, birbirlerinden farklı gen havuzuna ve gen kombinasyonlarına sahip olabilirler. Bundan dolayı, kısa mesafelerde bile değişkenlik gösteren uyum değerlerine sahip olan farklı ırklar ve/veya alt ırklar oluşabilir (Işık 1999a,b, Gonzalez-Martinez vd 2002, Medail ve Diadema 2009).

Analizlerde incelenen Pt71936 lokusunda bulunan alleller arasında iki bç'lik boşluğun olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 3.1). Benzer durum, Robledo-Arnuncio vd (2005) tarafından *Pinus sylvestris* L. populasyonlarının genetik yapısının araştırıldığı çalışmada da belirtilmiştir. Kızılçamda 144 ve 147 bç'lik, *Pinus sylvestris* L.'de ise 141 ve 144 bç'lik allel büyüklükleri arasında iki bç'lik boşluk görülmüştür. Sekans analizi

sonucunda 141 bç'lik alleli taşıyan bireylerin primerin bağlanma bölgesinde beş bç'lik bir delesyona (eksilme) sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun çalışılan 13 populasyonun sekizinde görüldüğü ve mutasyonun 325 birey arasından sadece 11 birey tarafından taşındığı belirtilmiştir (Robledo-Arnuncio vd 2005). Kızılçamda da çalışılan altı populasyonun (240 birey) beşinde ve toplam 13 bireyde iki bç'lik boşluğun olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 3.1 ve Çizelge 3.2).

4.2. Populasyonların Karşılaştırılması

Doyran populasyonu, Sarılar populasyonundan sonra en fazla (23 adet) haplotip çeşidinin ve en yüksek Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik katsayının (0.9538) görüldüğü populasyondur (Bkz. Çizelge 3.3). Her iki populasyon da sahil zonunda (alçak zonda) yer almaktadır. Doyran populasyonu, aynı hatda (fakat farklı yükseltide) bulunduğu ve aralarında kuş uçuşu yakın coğrafik mesafenin (< 20 km, Bkz. Şekil 2.1) olduğu Bük populasyonu (%25) ile ve ayrıca farklı hatda bulunmasına karşın benzer yükselti kuşağında bulunan Sarılar populasyonu (%23) ile en yüksek ortak haplotiplere sahiptir (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.4). Doyran populasyonu, en az (%12) ortak haplotipi aynı hatda bulunan (ama daha yüksek zonda yer alan ve kızılçamın optimum yayılışından kısmen izole olmuş) Hacıbekar populasyonu ile paylaşmaktadır (Bkz. Şekil 3.4). Doyran ve Hacıbekar populasyonları aynı hatta olmalarına karşın muhtemelen yükseltiye bağlı olarak sıcaklık farkından dolayı çiçeklenme zamanındaki mevsimsel izolasyon sonucu aralarında gen akışı olmayabilir. Şöyle ki; yüksek zondaki populasyonların fenolojik (ve çiçeklenme) özellikleri orta kuşakta bulunan populasyonlara göre farklılıklar göstermektedir. Çünkü çalışılan populasyonların bulunduğu bölgede, yükselti arttıkça sıcaklık ve büyüme mevsimi uzunluğu azalmaktadır (Alpacar 1981, Işık 1986). Bundan dolayı, dişi ve erkek çiçek oluşturma zamanı, tozlaşma süresi vb. birçok fenolojik faktörler yüksek zondaki populasyonlarda, alçak ve orta kuşak populasyonlarına göre daha sonraki haftalarda gerçekleşmektedir. Hatta Keskin (1999)'in bir kızılçam tohum bahçesinde yaptığı çiçeklenme fenolojisi ile ilgili çalışmada, çalışılan klonlar arasındaki fenolojik özelliklerin (dişi ve erkek çiçek oluşturma zamanı, tozlaşma zamanı ve süresi vb.) farklı olduğu ve genetik kontrol altında bulunduğu ortaya çıkmıştır.

Sarılar popülasyonu, analiz edilen popülasyonlar arasında basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler-arası en düşük ($D_{sh}^2 = 4.03$, Bkz. Çizelge 3.3) genetik uzaklık katsayısına sahiptir. Sarılar popülasyonundaki bu düşük katsayı bile, Akdeniz havzasında yayılış gösteren birçok çam türü için bulunan katsayılardan daha yüksektir (Morgante vd 1997, Ribeiro vd 2001, Gomez vd 2005). Bu durum, Sarılar popülasyonunun sahip olduğu haplotipleri oluşturan farklı büyüklükteki allellerin, çalışılan diğer popülasyonların allellerine göre birbirine yakın büyüklükte olması ile açıklanabilir. Ayrıca, Sarılar popülasyonu, altı popülasyon içinde Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik katsayısı en yüksek (0.9582, Bkz. Çizelge 3.3) olan popülasyondur. Bu durum, en yüksek (24 adet, Bkz. Çizelge 3.3) haplotip çeşidine sahip olması ve Hacıbekar popülasyonundan sonra en yüksek (sekiz adet) özel haplotip çeşidini bulundurması ile açıklanabilir. Sarılar popülasyonu, kızılçam için optimum olarak görülen yayılış alanının sahile yakın kenar bölgesinde bulunmaktadır (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1). Bu kenar popülasyonlar, kızılçamın optimum yayılışının görüldüğü orta kuşakta (300 – 600 m) yer alan popülasyonlara göre, fiziki çevre, nem, kuraklık, ekstrem sıcaklıklar, erken ve geç donlar gibi doğal seçim (seleksiyon) etkenlerinden nispeten daha fazla etkilenirler (Işık 1998, Hampe ve Petit 2005). Bununla birlikte, Sarılar popülasyonu, kızılçamın Akdeniz sahil kuşağı boyunca kesintisiz yayılış gösterdiği enlem kuşağının ortalarında yer almaktadır (Bkz. Şekil 1.1 ve Şekil 2.1). Bundan dolayı, kenar popülasyonların aksine, değişik popülasyonlardan gen göçü olduğu için yüksek genetik çeşitlilik ve yüksek özel haplotip çeşidi sayısına sahip olabilmektedir. Benzer durum, Scalfi vd (2009) tarafından İtalya'nın kuzeyinde bulunan sarıçam'ın kenar popülasyonları için de bildirilmiştir. Şöyle ki; çalıştıkları kenar popülasyonlardaki kloroplast haplotip çeşitliliğini, daha önce bütün Avrupa ve İber yarımadasında bulunan popülasyonlardan elde edilen sonuçlara yakın bulmuşlardır (Scalfi vd 2009). Bunlara ek olarak, sadece polen (erkek bireyin üreme hücresi) aracılığıyla taşınan kloroplastlardan elde edilen sonuçlar, genetik çeşitlilik üzerine çok fazla etki etmeyebilir. Çünkü rüzgâr ile tozlaşan türlerde (ki kızılçam böyle bir türdür), polenlerin yayılma mesafesi ana ağaçtan onlarca kilometre uzaklıkta olabilmektedir. Bundan dolayı kenar, orta ve/veya yüksek zondaki popülasyonlar gen göçü sonucu birbirlerine benzeyebilmektedir (Dyer ve Sork 2001, Burczyk vd 2004).

Sarılar popülasyonunun en yüksek ortak haplotipi, Bük (%28) ve Doyran (%26) popülasyonları ile paylaştığı görülmüştür (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.5). Doyran popülasyonunun Sarılar gibi alçak yükselti zonundan olması, Bük popülasyonunun da önemli iklim özellikleri bakımından alçak zon popülasyonlarına benzeyen kapalı bir havza içinde olması (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1) bu durumu açıklayabilir. Ayrıca Sarılar popülasyonu, genetik mesafe (F_{ST}) değerlerine göre her iki popülasyondan da istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulunmamıştır (Bkz. Çizelge 3.13). Sarılar popülasyonu, en az (%11, Bkz. Şekil 3.5) ortak haplotipi Hacıbekar popülasyonu ile paylaşmaktadır. Buna ek olarak, genetik mesafe değerlerine göre Sarılar popülasyonunun Hacıbekar'dan istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.01$) farklı olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.13). Hacıbekar popülasyonunun kıvılcımın optimum yayılışının kenar bölgesinde (perifer ve/veya marjinal), Akdeniz ikliminden karasal iklime geçiş zonunda yer alması, yüksek zonda bulunması ve iki popülasyon arasında kuş uçuşu coğrafik mesafenin çalışılan diğer popülasyonlara göre nispeten fazla olması, farklılığın nedenleri arasında sayılabilir (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1).

Bük popülasyonunun Murtbeli ile birlikte en düşük (3 adet) özel haplotipe sahip olduğu (Bkz. Şekil 3.3) ve haplotip sayısının genel haplotip ortalamasına (20.2 adet) yakın olduğu (21 adet) bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3). Bük popülasyonunun en çok ortak haplotipi Doyran (%25) ve Sarılar (%24) popülasyonları ile paylaşması (Bkz. Şekil 3.6 ve Çizelge 3.5), Doyran popülasyonu ile aynı hatda ve yakın mesafede olması (< 20 km, Bkz. Şekil 2.1), Sarılar popülasyonu ile de kıvılcımın bu bölgede kesintisiz bir yayılış alanı içinde bulunması ile açıklanabilir. Çünkü türün kesiksiz dağılım gösteren bir alanında, benzer çiçeklenme zamanına sahip popülasyonlar arasında polen aracılığıyla tozlaşma ve popülasyonların birbirine benzemesi kaçınılmaz olmaktadır (Buczyk vd 2004). Ayrıca Bük popülasyonu orta yükselti kuşağında olmasına karşın, kapalı havza içinde ve nispeten “yağmur gölgesi” zonunda yer almaktadır. Bu nedenle, önemli iklim özellikleri bakımından alçak zon popülasyonlarına benzemektedir (Işık vd 1987). Bük popülasyonu en az (%11) ortak haplotipe, aynı hatda olan ve aralarında yaklaşık 50 km uzaklık ve 600 m yükselti farkı bulunan (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1) Hacıbekar popülasyonu ile paylaşmaktadır (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.6). Bu durum, her iki popülasyonun (Bük ve Hacıbekar) hem farklı seleksiyon baskısına maruz

kalmaları hem de farklı fenolojik özelliklere (erkek ve dişi çiçek oluşturma zamanı, tozlaşma zamanı ve süresi vb.) sahip olmaları ile açıklanabilir.

Analiz edilen populasyonlar arasında Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik katsayısı (He) en düşük (0.8667, Bkz. Çizelge 3.3) bulunan populasyon Murtbeli populasyonudur. Buna karşın, çizelgedeki en büyük değerden sadece %8'lik (0.8992 – 0.9582) bir fark vardır. Murtbeli populasyonunun en düşük (16 adet) haplotip çeşidine, Bük populasyonu ile birlikte en düşük (üç adet) özel haplotip çeşidi sayısına sahip olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3 ve Şekil 3.3). Ayrıca, altı populasyonun tümünde ortak olarak görülen haplotiplerin (H12, H19, H39, H45) Murtbeli populasyonunda incelenen 40 bireyden 27'sinde görüldüğü ve bunun, Murtbeli populasyonunda bulunan bütün haplotiplerin %67.5'ini oluşturduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.7). Bahsedilen bu özelliklerinden dolayı, Murtbeli populasyonunun genetik çeşitlilik katsayısı, incelenen diğer populasyonlara göre daha düşük bulunmuştur. Murtbeli populasyonu ile en çok (%23) ortak haplotipe sahip olan populasyonlar, Bük ve Kapan (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.7) populasyonları olarak bulunmuştur. Kapan populasyonunun Murtbeli ile aynı hatda olması ve aralarında 20 km'den az kuş uçuşu mesafenin bulunması (gen akışı olasılığı yüksek), Bük populasyonunun ise Murtbeli ile aynı hatda olmamasına karşın, benzer yükselti kuşağında bulunması (benzer çevresel etkenler ve benzer seleksiyon baskısı altında bulunması) populasyonlar arasındaki benzerliğin açıklanmasındaki nedenler arasında sayılabilir (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1). Murtbeli populasyonu ile hem coğrafik olarak aralarında nispeten uzak mesafe olan hem de farklı yükselti zonunda bulunan Hacıbekar populasyonu, Murtbeli ile en az düzeyde (%14) ortak haplotipe sahip populasyon olarak görülmüştür (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.5). Buna ek olarak, populasyon çiftleri arasındaki genetik mesafe değerlerine göre her iki populasyon (Murtbeli ve Hacıbekar) birbirinden istatistiksel olarak da önemli düzeyde ($P < 0.001$) farklı bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.13).

Murtbeli populasyonu, toplam ortak haplotip çeşit sayısı bakımından en çok (%23) Bük ve Kapan populasyonlarına benzemesine rağmen populasyon çiftleri arasındaki genetik mesafe değerlerine göre her iki populasyondan istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.04$) farklı bulunmuştur. Bu durum, ilk bakışta bir çelişki olarak

görülmesine karşın üç popülasyonun sahip oldukları ortak sekiz haplotipin frekansları incelendiğinde gerçek anlaşılmaktadır. Örneğin, altı popülasyonda ortak dört haplotipden biri olan H39 haplotipinin sayısı Murtbeli popülasyonunda 12 adet iken, Bük ve Kapan'da sırasıyla bir ve iki adettir. Aynı haplotipin Sarılar ve Doyran popülasyonundaki sayısı ise sırasıyla dört ve üç adettir. Ayrıca altı popülasyonda ortak olan dört haplotip dışındaki ortak haplotiplerin frekansı üç popülasyon (Murtbeli-Bük-Kapan) arasında sadece bir adettir. Murtbeli popülasyonu sahip olduğu haplotip çeşidi bakımından Bük ve Kapan popülasyonları ile benzer olmasına rağmen haplotiplerin frekansları arasındaki farktan dolayı popülasyon çiftleri arasındaki genetik mesafe göz önüne alındığında, istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulunmaktadır (Bkz. Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.13).

Kapan popülasyonunun basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki genetik uzaklık katsayısı (D^2_{sh}) Hacıbekar'dan sonra en yüksek değer (5.94) olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3). Bu durum, Kapan popülasyonunun birbirinden çok farklı allel büyüklüklerine sahip haplotipleri barındırdığını göstermektedir. Kapan popülasyonunun en çok Bük (%24), Doyran (%23) ve Murtbeli (%21) popülasyonları ile ortak haplotipe sahip olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.8). Murtbeli popülasyonunun coğrafik mesafe olarak Kapan'a yakın olması (< 20 km, Bkz. Şekil 2.1), Doyran ve Bük popülasyonlarının ise kızılçamın optimum yayılış alanı içinde bulunması popülasyonlar arasında paylaşılan ortak haplotiplerin yüksek olmasının açıklanmasında sebepler arasında sayılabilir. Ayrıca, bahsedilen popülasyonların kızılçamın doğal yayılış alanının merkezi sayılan yerde bulunmaları, benzer seçilim (seleksiyon) baskısına maruz kalabileceklerinin işaretidir. Kızılçamın optimum yayılış alanından biraz uzakta olan Hacıbekar popülasyonu ise, Kapan popülasyonu ile benzer yükselti kuşağında bulunmasına karşın (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1) diğer popülasyonlara göre Kapan popülasyonu ile en az (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.8) ortak haplotipe sahiptir. Bu sonuçlara göre, kızılçam doğal yayılışının kısmen dışında ve izole bir şekilde bulunan Hacıbekar popülasyonunun farklı seçilim baskısı altında olabileceğini belirtebiliriz. Örneğin, yüksek zondaki böyle popülasyonlar geç ilkbahar ve erken sonbahar mevsimlerinde, don faktörünün baskısı ile karşılaşmaktadırlar. Böyle farklı seçilim baskısı altında olan popülasyonlarda zamanla yeni ve farklı mutasyonlar

birikmekte ve bu mutasyonlar populasyonun farklı gen havuzuna sahip olmasını sağlayabilmektedirler (Işık vd 1987, Freeman ve Herron 2001).

Hacıbekar populasyonu, Murtbeli'nden sonra en az (17 adet) haplotip çeşidine ve en düşük (0.8992) genetik çeşitlilik katsayısına sahip olmasına karşın, en fazla (10 adet) özel haplotip sayısına ve basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki en yüksek (5.97) genetik uzaklık katsayısına sahiptir (Bkz. Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.5). Haplotipler arasındaki en yüksek genetik uzaklık katsayısı, sahip olduğu haplotiplerin birbirinden çok farklı büyüklükte olan allellerin kombinasyonu sonucu oluştuğunu göstermektedir. Hacıbekar populasyonunun çalışılan diğer populasyonlara göre farklı seçilim baskıları altında olduğu ve bunun sonucunda da farklı ve yeni mutasyonları barındırdığı söylenebilir. Hacıbekar populasyonunun en çok (%23) ortak haplotipe, benzer yükselti kuşağından gelen Kapan ile sahip olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.9). Benzer yükselti kuşağından olan populasyonların birbirine daha fazla benzemesi, yükselti faktörünün populasyonların genetik çeşitliliğini belirleme etkisinin önemli olduğunu göstermektedir. Benzer durum, kantitatif karakterler ve izoenzimler kullanılarak kızılçam populasyonlarının genetik çeşitliliklerinin ortaya konulduğu çalışmalarda da belirtilmiştir (Işık 1986, Işık ve Kara 1997, Kara vd 1997).

Hacıbekar populasyonunun en az (%17) ortak haplotipi paylaştığı populasyonun, coğrafik olarak en uzakta bulunan Sarılar populasyonu olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 3.9). Hacıbekar populasyonu en çok (%23) ortak haplotipi ve frekans değerlerini paylaştığı Kapan populasyonu hariç, geri kalan dört populasyondan haplotipler arasındaki genetik mesafe değerlerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.04$) farklı bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.13). Bu durum, Hacıbekar populasyonunun kendine özgü olan, en çok sayıda (10 adet) özel haplotip çeşidine sahip olması ve bazı ortak haplotiplerin herbirini diğer populasyonlara göre fazla sayıda bulundurması ile açıklanabilir. Örneğin, altı populasyonda ortak olan H19 haplotipinin Hacıbekar populasyonundaki frekansı 10 iken, diğer populasyonlardaki frekansı iki ile beş arasında değişmektedir (Bkz. Çizelge 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11).

BAPS analizi sonucunda, Hacibekar popülasyonunun bir, diğer beş popülasyonunda başka bir grup oluşturduğu görülmüştür. Jaccard benzerlik katsayılarından elde edilen fenogram da BAPS analizinden elde edilen sonuca benzerlik göstermektedir (Bkz. Şekil 3.2 ve Şekil 3.10). Fenograma göre, coğrafik olarak birbirine en yakın olan popülasyonlar (Doyran-Bük ve Murtbeli-Kapan) birbirlerine en çok benzeyen popülasyonlardır (Bkz. Şekil 2.1). Adı geçen dört popülasyonun oluşturduğu gruba 0.375 değerinde Sarılar popülasyonu katılmıştır. Hacibekar popülasyonu ise, diğer beş popülasyondan farklı bir grupta yer almaktadır (Bkz. Şekil 3.10). Çalışılan mikrosatellit belirteçleri rekombinasyon geçirmemekte ve incelenen türün genetik yapısına demografik geçmişinin etkisini yansıtmaktadır. Yani, genetik sürüklenmenin ve mutasyonların popülasyonun gen havuzuna etkisini belirtmektedir (Anzidei vd 1999, Balloux ve Lugon-Moulin 2002). Bundan dolayı türün optimal yayılış alanının dışında, periferik ve/veya marjinal bölgelerde bulunan popülasyonların genetik yapısı, türün optimum yayılış alanındaki popülasyonlarından belirgin biçimde farklı olmaktadır.

Hacibekar popülasyonunun bulunduğu coğrafik konum, diğer beş popülasyondan farklı çıkmasının nedeni olabilir. Birincisi, Hacibekar popülasyonu 1000 m'nin üzerinde yüksek rakımda bulunmaktadır (Bkz. Çizelge 2.1). Çalışılan popülasyonların bulunduğu bölgede, yükselti arttıkça sıcaklık ve büyüme mevsimi uzunluğu azalmaktadır. Buna ek olarak, yüksek zondaki böyle popülasyonlar geç ilkbaharda ve erken sonbaharda görülebilen, don faktörünün baskısı ile karşılaşmaktadırlar (Işık vd 1987). Ayrıca Hacibekar popülasyonu, kızılçamın optimum yayılış alanının dışında, kısmen izole olmuş bir yörede yer almaktadır (Bkz. Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1). İkincisi, Hacibekar popülasyonu Akdeniz ikliminden karasal iklime geçiş zonunda bulunmaktadır. Bu geçiş zonunda, kızılçamın optimum yayılışının görüldüğü diğer alanlara göre yıllık yağış miktarı daha düşük görülmektedir (Işık vd 1987, Işık ve Işık 1999).

Hacibekar popülasyonunun yukarıda belirtilen özellikleri, bu popülasyonun diğer popülasyonlardan gen akışı bakımından mevsimsel izolasyonla ayrılmasına neden olmaktadır. Belirtilen bu özelliklerin kombinasyonu, coğrafik olarak izole olan popülasyonların genetik olarak niçin farklı olabileceklerini açıklamaktadır. Coğrafik ve ekolojik olarak farklı bölgelerde bulunan doğal popülasyonlar, evrimsel süreç içinde,

çevreye adaptasyon sonucu genetik olarak farklılaşırlar. Çünkü coğrafik izolasyondan dolayı populasyonlar arasında gen akışı olmamaktadır ve homojenizasyon (populasyonların birbirine benzemesi) önlenmektedir. Farklı çevresel etmenlere (yağış, sıcaklık, nem, toprak besin elementleri vb.) maruz kalan populasyonda, farklı seleksiyon baskıları sonucunda zamanla yeni ve farklı mutasyonlar birikmekte ve bu durum populasyonun farklı bir gen havuzuna sahip olmasına yol açmaktadır. Böyle farklı çevre etmenleri ve farklı seleksiyon basıncı altında bulunan populasyonlar, farklı uyum değerlerine sahip olup zamanla farklı ırkların ve/veya alt ırkların oluşmasını sağlarlar (Işık 1999a, Balloux ve Lugon-Moulin 2002, Burczyk vd 2004). Hacıbekar populasyonu gibi, bir türün ana yayılış gösterdiği alandan kısmen ve/veya tamamen izole olmuş populasyonlarda, populasyon büyüklüğünün nispeten küçük olması, kurucu etkisinin görülmesi ve gen akışının olmaması sonucunda genetik kayma görülebilmektedir (Ohsawa ve Ide 2008).

4.3. Q_{ST} ve F_{ST} Değerlerinin Karşılaştırılması

Analiz edilen populasyonlar yükseltilerine göre karşılaştırıldıkları zaman, yükseltiye bağlı olarak ortaya çıkan populasyonlar arası genetik çeşitlilik, tüm çeşitliliğin %4.97'sini oluşturmaktadır ($R_{ST} = \%4.97$, Bkz. Çizelge 3.4.a). Ayrıca, doğu-batı hattı (iki yükselti hattı) karşılaştırıldığında, her bir grubun içindeki populasyonlar arası çeşitlilik oranı $R_{ST} = \%4.82$ olmaktadır (Bkz. Çizelge 3.4.b). Her iki durum, populasyonların yükseltiye göre değişen çevre koşullarında farklılaştıklarını göstermektedir. Nitekim orman ekosistemleri Türkiye'de homojen olmayan ve çok kısa mesafelerde bile değişebilen farklı doğa birimlerinden oluşmaktadır. Böylece populasyonlar üzerinde ayırıcı (çeşitlendirici) seleksiyon etkili olmakta ve populasyonlar zaman ve bulundukları mekâna bağlı olarak çok kısa mesafelerde bile, farklı seleksiyon baskısı sonucu birbirlerinden farklılaşabilmektedirler. Özellikle Türkiye'de ormanların çoğunun yer aldığı dağlık bölgelerde, iklim, toprak vb. biyotik ve abiyotik kaynaklı çevresel faktörlerin daha kısa mesafelerde ve daha sık değiştiği bilinmektedir (Bradshaw 1972, Işık 1999a, b). Aynı türün yan yana bulunan iki komşu populasyonu bile, birbirlerinden farklı çevre etmenleri ve farklı seleksiyon basıncı altında bulunacakları için, birbirlerinden farklı gen havuzuna ve gen kombinasyonlarına

sahip olabilmektedirler. Bu nedenle, kısa mesafelerde farklı uyum değerlerine sahip olan farklı ırklar ve/veya alt ırklar oluşabilmektedir. Hem yerli hem de yabancı pek çok ağaç türü üzerinde sonuçlandırılan çalışmalar, çevresel faktörlerin değişimine paralel olarak, kısa mesafelerde farklı yerel ırkların veya lokal popülasyonların varlığını ortaya koymuştur (Hamann vd 1998, Işık 1999a, b, Gonzalez-Martinez vd 2002, Ohsawa ve Ide 2008). Aynı türün farklı çevre koşullarında bulunan popülasyonlarında görülen çekici bir nokta da, bu popülasyonların değişen çevre koşullarına karşı belirli bir uyum esnekliklerinin olmasıdır. Bir türün böyle popülasyonlarının bulunması yüksek bir adaptasyonel esnekliğinin göstergesidir. Bu durum, türün evrimsel süreç içinde devamlılığının sağlanması için önemli bir avantaj olmaktadır (Işık 1986, Işık ve Kara 1997).

Popülasyonlar yükseltiye bağlı olarak (yüksek, orta ve alçak zon popülasyonları halinde) analiz edildiği zaman popülasyon-içi genetik çeşitlilik, tüm çeşitliliğin %95.44'ü, iki yükselti hattı ayrı olarak ele alındığı zaman ise popülasyon-içi genetik çeşitlilik, tüm çeşitliliğin %97.17'si olarak bulundu (Bkz. Çizelge 3.4.a ve b). Ayrıca, Nei (1987)'nin genetik çeşitlilik katsayısı ortalama %92.83 olarak hesaplandı (Bkz. Çizelge 3.3). Bu durum, kızılçamda yapılan izoenzim çalışmalarında olduğu gibi, cpSSRs belirteçleriyle yapılan çalışmalarda da popülasyon-içi genetik çeşitliliğin çok yüksek olduğunu göstermektedir (Işık ve Kara 1997, Panetsos vd 1998, Korol vd 2002b, Aravanopoulos vd 2004). Bahsedilen moleküler düzeydeki çalışmaların (izoenzim, cpSSRs vb.) yanı sıra, fidan ve/veya ağaç evrelerindeki birey karakteristiklerine ait birçok ölçümde de popülasyon-içi genetik çeşitlilik yüksek (%82 - 95) bulunmuştur (Işık 1986, Işık vd 1987, Işık ve Işık 1999, Çalışkan 2006). Buna ek olarak, bu tez çalışmasında ele alınan deneme alanı ve diğer deneme alanlarında (Bkz. Şekil 2.1) fidan özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, 13. ve 17. yaşlara ait incelenen birçok morfolojik karakterlerde de popülasyon-içi genetik çeşitlilik düzeyi, izoenzim ve cpSSRs belirteçlerinden elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir (Işık 1986, Işık vd 1987, Işık 1998, Işık ve Işık 1999).

Genel olarak, orman ağaçlarında popülasyon-içi genetik çeşitlilik diğer canlılara göre daha yüksek, popülasyonlar arasındaki farklılaşma da (genetik mesafe) daha

düşüktür. Populasyonların genetik çeşitliliği ve genetik yapısı evrimsel güçlerin ortaklaşa etkisiyle şekillenir. Özellikle eşleşme (döllenme) sistemi, gen akımı ve doğal seçim populasyonlar içerisindeki ve arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesini etkileyen önemli faktörlerdir (Nevo 1978, Hamrick 1989, Aitken vd 2008, Ohsawa ve Ide 2008). Orman ağaçları, tohum ve polenlerinin büyük bir kısmını (yaklaşık %90) ancak, yaklaşık 100 m yarıçapında sınırlı bir alana yayabilirler (Işık 1999a, Burczyk vd 2004). Böylece her populasyon, eğer ormanda kesintisiz yayılış söz konusu ise, komşu populasyonlarla örtüşen alt populasyonlardan meydana gelir. Ayrıca, ağaç türleri uzun ömürlü oldukları için, her bir alt populasyon, bulunduğu mikrohabitatın özel çevre koşullarına özgü farklı seçim (seleksiyon) baskısı ve göç faktörlerinin etkisi altında o mikrohabitatteki yerel çevre farklılıklarına uyum yapmış uzun yıllar aynı habitatı işgal eden farklı bireylerden oluşmaktadır. Bu durum, gen akışı sayesinde populasyonlar-arası genetik farklılıkları azaltmakta yani populasyonlar arasında homojenizasyon sağlamaktadır. Buna ek olarak, mikrohabitata özgü seleksiyon basıncı sayesinde de populasyon-içi genetik çeşitliliğin artmasına yol açmaktadır (Bradshaw 1972, Libby 1973, Işık 1999b, Aitken vd 2008). Hem morfolojik hem de moleküler verilere dayalı olarak kızılçamda populasyon-içi genetik çeşitliliğin yüksek bulunması, kızılçam'ın ağaç ıslahı çalışmaları için uygun bir tür olduğunu göstermektedir.

Haplotipler arasındaki uzaklığa göre altı populasyonun bağımsız olarak alınmasıyla yapılan moleküler varyans analizi sonucunda, populasyon-içi aileler-arası genetik çeşitlilik düzeyi de istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulunmuştur ($R_{ST} = \%10.75$, $P < 0.0127$, Bkz. Çizelge 3.4). Bu durum çalışılan populasyonların genetik olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklı olan ailelerden oluştuğuna işaret etmektedir. Benzer durum, aynı populasyonlar üzerinde çalışmalar yapan Işık (1986) tarafından ailelerin bazı morfolojik fidan karakterleri için de ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında, aynı deneme alanındaki bireylerin 13. ve 17. yaşlarına ait incelenen morfolojik karakterlerinde de populasyon-içi aileler-arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıkların olduğu bildirilmiştir (Işık 1998, Işık ve Işık 1999, Işık vd 1999). Deneme alanı kurulurken belirlenen doğal populasyonlardan ailelerin rasgele ve en az 100 m aralıklarla seçilmesi (ayrıntılı bilgi için Bkz. Işık vd 1987, Işık 1998), populasyon-içi aileler-arası genetik çeşitliliğin gerçek değerine yakın olarak tahmin

edilmesini sağlamaktadır (Işık 1986, Işık vd 1987, Işık 1998). Bu durum, kızılçam'da populasyon-içi aileler-arası genetik çeşitliliğin yüksek olması, kızılçam'ın ağaç ıslahı çalışmalarında populasyon seçiminin yanı sıra, populasyon-içi ailelerin seçiminin de üzerinde önemle durulması gereken bir etken olduğunun göstergesidir.

Bu tez çalışmasında F_{ST} ve R_{ST} sonuçlarına göre, populasyonlar-arası genetik farklılaşma düzeyi, %-0.41 ile %4.82 arasında değişen değerlerde bulundu (Bkz. Çizelge 3.4.a ve b). Kızılçam'ın ele alındığı ve RAPD belirteçlerinin kullanıldığı genetik çeşitlilik çalışmalarında ise populasyonlar-arası genetik farklılaşmanın %7-35 arasında görüldüğü belirtilmiştir (Velioğlu vd 2002, Kandemir vd 2004, İçgen vd 2006, Lise vd 2007). RAPD belirteçlerinin kullanıldığı çalışmalarda populasyonlar-arası genetik çeşitliliğin bu çalışmaya ve izoenzim çalışmalarına göre yüksek bulunması birkaç nedene bağlanabilir. Bahsedilen çalışmalarda ele alınan tohum meşcerelerinin, tohum bahçelerinin ve/veya ağaçlandırmaların (plantasyon) coğrafik olarak izole olması veya birbirlerine uzak konumda bulunması, tozlaşma mekanizmaları (çalışılan tohum meşcereleri arasında düşük olması), eşleşme sistemleri (mating system), tohum dağılımı ve gen akışı populasyonlar-arası genetik çeşitliliğin yüksek olmasının nedenleri arasında sayılabilir. Populasyon-içi genetik çeşitliliğin nispeten düşük olması ise tohum meşceresi alanlarının çok küçük olması, tohum meşceresinde geri kalan (yaşayan) ağaçların yapay seçim sonucu ortaya çıkan genetik tabanı daraltılmış bir populasyon olmaları ve dolayısıyla ağaç sayısının ve bir sonraki yıl üretilcek tohumların daha seçkin bireylerden meydana gelmesi sonucu oluşabilmektedir. Ayrıca, populasyonlar-arası genetik çeşitliliğin yüksek olması kullanılan RAPD belirteçlerinin sahip olduğu özelliklerden de kaynaklanabilir. Şöyle ki, RAPD yönteminde 6-10 nükleotid uzunluğunda tek bir primer kullanılır ve bu primer kalıp DNA üzerinde rasgele bağlandığı bölgelerin çoğaltımını sağlar. Bunun yanı sıra, primerlerin kalıp DNA üzerindeki bölgelere bağlanma sıcaklıklarının (annealing temperature) düşük olması (30-50 °C) nedeniyle de populasyonlar-arası polimorfizm düzeyi yüksek çıkabilmektedir (Williams vd 1990, Aydın 2004, Altun 2006). RAPD tekniğinin belirtilen özelliklerinden dolayı, kullanıldığı çalışmalarda populasyonlar-arası genetik çeşitlilik düzeyi yüksek bulunabilmektedir.

İncelenen karakterlere ait Q_{ST} değerleri (Bkz. Çizelge 3.14), Çizelge 3.4’de bulunan gruplara ait F_{ST} değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, 30. yaş çap karakteri için populasyonlar üç yükselti kuşağı halinde alındığında Q_{ST} değeri 0.000 (sıfır) olarak hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 3.14). Buradan, aynı yükseltide fakat farklı kesitlerde (hatlarda) bulunan populasyonların farklı çap değerine sahip olmadıkları; başka bir deyişle önemli ölçüde genotip $\times$ çevre (populasyon $\times$ yükselti hattı) etkileşimi olduğu anlaşılmaktadır. Seleksiyon bakımından nötral olan moleküler belirteçlerin kantitatif karakterlerden farklı bulunması ve genellikle düşük çıkması lokal adaptasyon gösteren populasyonlar için beklenen bir sonuçtur (Kremer vd 2000, Gonzalez-Martinez vd 2002). En yüksek F_{ST} değeri (0.04767, Bkz. Bulgular “3.2. Populasyonların Genetik Çeşitlilik Parametreleri”) populasyon-içi ailelerin analiz edildiği grupta görüldü. En düşük Q_{ST} değeri ise (0.077, Bkz. Çizelge 3.14) 30. yaş çap değerinde hesaplandı. Yani, en düşük Q_{ST} değeri bile en yüksek F_{ST} değerinin yaklaşık iki katı olarak görüldü. Bununla birlikte, diğer yaşlara ait karakterlerin Q_{ST} değerleri ile cpSSR belirteçlerinden elde edilen F_{ST} değerleri arasında ortalama 5-6 kat’a varan büyük farklılıklar görüldü (Bkz. Çizelge 3.14 ve Bulgular “3.2. Populasyonların Genetik Çeşitlilik Parametreleri”). Bu durum, kızılçam’ın Türkiye’deki geniş yayılış alanı içinde lokal adaptasyonlara sahip bir tür kompleksi olduğunun göstergesidir. Işık (1986) ve Işık (1998), bu tez çalışmasındaki aynı populasyonların kullanıldığı ve farklı yaşlara ait birçok morfolojik karakterin incelendiği çalışmalarında, çeşitliliğin çoğunun yükselti ve yükseltiye bağlı iklimsel faktörlerin bir fonksiyonu sonucu meydana geldiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak, çeşitliliğin bir kısmının adaptif öneminin (yüksek uyum değerinin) bulunduğunu ve bunun genetik kontrol altında olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, adı geçen çalışmalarda, büyüme karakterlerinin yükseltiye bağlı olarak değişiminin bölgedeki iklimsel çeşitliliğin evrimsel bir yansıması olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Çünkü çalışılan populasyonların bulunduğu bölgede yükselti arttıkça sıcaklık ve büyüme sezonu uzunluğu azalmaktadır (Işık 1986, Işık 1998). Benzer sonuçlar, *Pinus hartwegii* Lindl. fidanlarının bazı karakterleri (boy, sürgün fenolojisi ve don zararı) için de bildirilmiştir. Yükseltiye bağlı olarak incelenen bütün karakterler bakımından populasyonlar arasında klinal (tedrici, adım adım değişen) bir çeşitlilik gözlenmiştir. Örneğin, yükselti arttıkça fidan boyunun azaldığı görülmüştür (Viveros-Viveros vd 2009).

Kızılçamın farklı yükselti kuşaklarından (yüksek, orta ve alçak) alınan populasyonlar ile yapılan izoenzim çalışmalarında da, lokal adaptasyonun (yerel çevre koşullarına uyum) görüldüğü bildirilmiştir. Orta kuşak ile orta-üst kuşak populasyonların alt ve üst kuşak populasyonlara göre daha yüksek genetik çeşitlilik içerdikleri görülmüştür. Kızılçamın optimum yayılış alanı içinde bulunan orta kuşak populasyonlarının daha yüksek düzeyde heterozigotluk gösterdiği ve lokus başına düşen allel sayısının bu populasyonlarda daha fazla olduğu belirtilmiştir (Işık ve Kara 1997, Kara vd 1997). Buna ek olarak, birçok bitki türünde yapılan çalışmalarda da orta kuşak populasyonlarının, alçak ve/veya yüksek kuşak populasyonlarından daha fazla genetik çeşitlilik barındırdığı görülmüştür (Ohsawa ve Ide 2008). Bu durum, coğrafik olarak merkezde bulunan populasyonların periferik veya marjinal populasyonlara göre türün optimal koşullarında yaşamasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, coğrafik olarak “öz” ve/veya “merkez” olarak belirtilen populasyonlarda, nispeten yüksek genetik çeşitlilik düzeyi görülmektedir (Işık ve Kara 1997, Kara vd 1997, Ohsawa ve Ide 2008). Bu tez çalışmasında ise, coğrafik olarak kızılçam için “merkez” sayılan Murtbeli populasyonu çalışılan populasyonlar arasında en düşük (%86.67) genetik çeşitlilik değerine sahiptir. Bük populasyonu ise en yüksek (%95.14) genetik çeşitlilik gösteren populasyonlardan biri olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.3). Bu tez çalışmasında, genetik çeşitliliğin merkezi populasyonlarda, periferik (kenar) populasyonlara göre nispeten düşük çıkması örneklemeye ve çalışılan cpSSR belirteçlerinin özelliklerine bağlanabilir. Şöyle ki, türün periferik populasyonları merkezi populasyonlara göre daha az sayıda bireyden oluşmaktadır. Bu durum da, örnekleme sırasında merkezi populasyonların periferik populasyonlara göre tam olarak temsil edilmemesi ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, çalışılan cpSSR bölgeleri evrimsel güçlerden mutasyonun etkisi ile şekillenmektedirler. Seçilim ve çevre baskısı mikrosatellit bölgelerine doğrudan etki etmemektedir. Böylece, periferik populasyonlarda merkezi populasyonlara göre daha fazla allel çeşitliliği ve dolayısıyla daha fazla özel haplotip görülebilmektedir (Bkz. Çizelge 3.2 ve Şekil 3.3).

Navascues vd (2008) yükseltinin *Pinus canariensis* Chr. Smith ex. DC. populasyonları arasındaki gen akışına olan etkisini inceledikleri çalışmalarında, bu tez çalışmasına konu olan örneklemeye benzer bir örnekleme stratejisi izlemişlerdir. İki

coğrafiik hat boyunca 1000, 1500 ve 2100 m'den birer populasyon olmak üzere toplam altı populasyon incelemişlerdir. Bu çalışmamızda kullanılan cpSSR primerlerinin yanı sıra iki farklı cpSSR primeri (Pt26081 ve Pt110048) ve sekiz nükleer (nc) SSR primeri kullanmışlardır. Sonuçta, $F_{ST} = 0.013$, $p < 0.001$ (cpSSR) ve $F_{ST} = 0.019$, $p < 0.0001$ (ncSSR) olarak bulmuşlardır. İstatistiksel olarak önemli ama düşük düzeyde bulunan bu farklılığın yükselti ile ilişkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir (Navascues vd 2008). Öte yandan, değişik yükseltilerden seçilen *Pinus ponderosa* Douglas ex Lawson populasyonlarında yedi izoenzim çalışılmış ve populasyonların fosfoglukomutaz-1 (PGM-1) lokuslarında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.001$) farklılık olduğu bildirilmiştir. Yükselti arttıkça belirtilen lokustaki varyasyonun azaldığı belirtilmiştir (Mitton vd 1980). Konifer türleri ile daha önce yapılan ve yükselti kuşaklarının göz önünde bulundurulduğu birçok izoenzim çalışmasında ise genetik farklılığın çok düşük ve/veya istatistiksel olarak önemsiz düzeyde olduğu bildirilmiştir (Neale ve Adams 1985, Kara vd 1997, Ettl ve Peterson 2001, Saenz-Romero ve Tapia-Olivares 2003).

Saenz-Romero vd (2006) tarafından beş ayrı yükseltiden seçilen *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl. populasyonlarından (1000-1500 m her 100 m'de bir populasyon olmak üzere) oluşturulan deneme alanındaki fidanların 2.5 yaşındaki boy karakterlerinin yükseltiye bağlı olarak genetik farklılık gösterdikleri rapor edilmiştir. Düşük yükselti kuşağından gelen populasyonların yüksek yükselti kuşağından gelen populasyonlara göre daha fazla büyüme potansiyellerinin oldukları bildirilmiştir. Bu durumun, populasyonların farklı yükselti kuşakları boyunca ayırıcı (çeşitlendirici) seleksiyon baskılarına maruz kalması ile açıklanabileceği belirtilmektedir. Şöyle ki, düşük yükselti kuşağındaki populasyonlar ılıman iklim koşullarına adapte olmuşlardır ve bu durum seleksiyonun yüksek büyüme potansiyeli yönünde etkili olmasını sağlamaktadır. Bunun aksine, ılıman iklim koşullarına daha az toleranslı yüksek yükselti kuşaklarındaki populasyonlarda ise büyüme potansiyeli daha az görülmektedir (Saenz-Romero vd 2006). Bu tez çalışmasındaki aynı populasyonların kullanıldığı Işık (1986)'da çimlenme özellikleri ve bazı fidan karakterlerinde yükseltiye bağlı olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Farklı yükselti kuşaklarından örneklenen sarıçam populasyonlarının bazı morfolojik özelliklerinin de yükseltiye bağlı istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Turna ve Güney 2009). Ayrıca, kızılçamın Girit

adasından örneklenen ve yükselti kuşaklarının göz önünde bulundurulduğu çalışmada, bazı morfolojik karakterlerin yükseltiye ve boylama göre farklı oldukları belirtilmiştir (Dangasuk ve Panetsos 2004). Yükseltiye bağlı olarak görülen bu farklılıkların yükselti kuşakları boyunca değişen çevresel ve iklimsel (sıcaklık, nem vb.) koşulların farklı seçim baskılarına yol açmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Dangasuk ve Panetsos 2004, Navascues vd 2008, Turna ve Güney 2009).

Bu tez çalışmasında, farklı yaşlardaki boy karakteri için hesaplanan Q_{ST} değerleri, cpSSR belirteçlerinden elde edilen F_{ST} değerlerinden çok yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.14 ve Bulgular “3.2. Populasyonların Genetik Çeşitlilik Parametreleri”). Benzer durum farklı araştırmacılar tarafından değişik orman ağaçları için de rapor edilmiştir (*Pinus contorta* ssp. *latifolia* – Yang vd 1996, *Quercus petraea* Lieb. – Kremer vd 1997, *Pinus pinaster* Ait. – Gonzalez-Martinez vd 2002). Bu durumun, boy gelişimi üzerine seleksiyon baskısının bir sonucu olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Bireylerin rekabet baskısından (güneş ışığı vb.) kurtulmak için hızlı bir şekilde büyüdükleri belirtilmektedir (Yang vd 1996, Gonzalez-Martinez vd 2002).

Değişik orman ağaçları için, kantitatif karakterlerden elde edilen Q_{ST} değerlerinin nötral lokuslardan elde edilen F_{ST} değerlerinden önemli düzeyde farklı olduğu bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Yang vd 1996, Kremer vd 1997, Gonzalez-Martinez vd 2002, 2004). Birçok canlı türü için hesaplanan ve karşılaştırılan Q_{ST} ve F_{ST} değerlerinin rapor edildiği çalışmaların çoğunda (yaklaşık %70), bu tez çalışmasında olduğu gibi, Q_{ST} değerleri ortalama F_{ST} değerlerinden büyük bulunmuştur (Lynch vd 1999, Leinonen vd 2008). Gonzalez-Martinez vd (2002) nötral belirteçlerden izoenzimlerin kullanıldığı ve bazı kantitatif karakterlerin ele alındığı çalışmalarında, Q_{ST} değerlerinin, bu tez çalışmasında bulunduğu gibi, F_{ST} değerlerinden yüksek çıkmasının *Pinus pinaster* Ait. populasyonlarının lokal adaptasyonlarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Gen akışının yüksek olduğu durumlarda, çevresel değişkenliğin ve genotip-çevre etkileşiminin kantitatif karakterlerin farklılaşmasında büyük bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, bu çalışmadaki kızılçam populasyonlarında olduğu gibi *Pinus pinaster* Ait. populasyonlarının farklılaşmasında da, bazı önemli ekolojik faktörlerin (yağış, sıcaklık, rakım, toprak besin elementleri vb.)

populasyonların lokal adaptasyonlarında ana belirleyiciler olduğunu belirtmişlerdir (Gonzalez-Martinez vd 2002).

Kantitatif karakterlerdeki çeşitliliğin çoğu, doğrudan doğruya doğal seleksiyon ve ekolojik faktörlere adaptasyon ile ilişkilidir. Kloroplast basit dizi tekrarlarının çeşitliliği ise, genellikle daha homojen ve nispeten geniş alanlarda yayılış gösteren türler için, bazı evrimsel güçler (mutasyon, göç ve/veya gen akışı) tarafından etkilenmektedir (Kremer vd 2000, Gonzalez-Martinez vd 2002, 2004, Sgro ve Hofmann 2004). Kloroplast basit dizi tekrarları seçim ve çevresel faktörlerden doğrudan etkilenmemelerine karşın, evrimsel güçler (mutasyon, göç ve genetik kayma) genlerin yapısını ve allel frekanslarını değiştirebilir. Her bir populasyonda yerel seleksiyon farklılıklarından dolayı farklı alleller bulunabilir veya bütün populasyonlar aynı allele sahip olsalar bile, belirli bir allelin her bir populasyondaki frekansı farklı olabilir. Bundan dolayı, kızılcım gibi nispeten uzun ömürlü, farklı ekolojik koşullarda yayılış gösteren bitki türlerine ait populasyonlar karakteristik olarak yüksek düzeyde populasyon-İçi genetik çeşitlilik gösterirler (Işık 1999a, Provan vd 2001, Balloux ve Lugon-Moulin 2002, Navascues ve Emerson 2005).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, cpSSR belirteçleri ve 13., 17. ve 30. yaşlara ait morfolojik veriler (boy, çap, hacim) kullanılarak Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanında yetiştirilen altı doğal kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) populasyonu incelendi. cpSSR belirteçleri temel alınarak yapılan analizler sonucunda, kızılçam populasyonlarının yükseltiye bağlı olarak genetik çeşitlilik gösterdikleri ($R_{ST} = \%4.97$, $P < 0.0655$) bulundu. Ayrıca, populasyon-içi aileler arasında da istatistiksel olarak önemli düzeyde genetik çeşitlilik ($R_{ST} = \%10.75$, $P < 0.0127$) olduğu belirlendi. Nei (1987)'nin ortalama genetik çeşitlilik katsayısına göre, kızılçam'da populasyon-içi genetik çeşitlilik, toplam genetik çeşitliliğin $\%92.83$ 'ü gibi yüksek bir oranını oluşturmaktadır. Elde edilen bu sonuçların uygulama açısından önemli anlamları bulunmaktadır. Bunlar:

- a) Morfolojik karakterler (boy, çap vb.) üzerinde daha önce yapılan genetik araştırmalarda kızılçamda populasyonlar-arası genetik çeşitliliğin nispeten az, fakat populasyonlar-içi genetik çeşitliliğin oldukça yüksek (yani $\%85$ ve üzeri) olduğu bulunmuştu. Moleküler düzeyde cpSSR belirteçleri ile yapılan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, morfolojik karakterlerden elde edilen sonuçları desteklemektedir. Başka bir deyişle, kızılçamda morfolojik karakterlere yansıyan çeşitlilik, moleküler düzeydeki genetik farklılıklardan kaynaklanmaktadır.
- b) Kızılçam ıslah stratejisinde potansiyel ağaçlandırma alanları için kitle seleksiyonu yapılırken, öncelikle tohum kaynağı olarak kullanılması düşünülen populasyonların doğal olarak yetiştiği yükselti kuşağı göz önünde bulundurulmalı ve uygun orijinler bu şekilde seçilmelidir.
- c) Populasyon-içi aileler-arası genetik çeşitliliğin yüksek olması, yükseltiye bağlı populasyon seçiminin yanı sıra, her bir populasyon içinde plus ağaç seçiminin de önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Kızılçam ıslah programında bir yandan populasyonların orijinlerinin yükseltilerine göre seçilmesi gerekirken,

bir yandan da bu populasyonlar içinde genetik olarak üstün genotipler belirlenmelidir. Böylece, elde edilebilecek genetik kazanç daha yüksek olacaktır.

- d) Populasyon-içi genetik çeşitliliğin yüksek olması, kızılçam'ın ağaç ıslahı çalışmaları için uygun bir tür olduğunun göstergesidir. Buradan da kızılçam'da ıslah amacıyla seleksiyon yapılırken, genetik kazancın daha fazla olması için, uygun populasyon belirlendikten sonra, populasyon-içi seleksiyona daha çok önem verilmesi gerekmektedir.
- e) Kızılçam'da populasyon içinde görülen yüksek genetik çeşitlilik, populasyonların ortak haplotiplerin yanı sıra kendilerine özgü haplotipleri bulundurmalarından kaynaklanmaktadır. Bu durum, populasyonların geçmişten bugüne mikrohabitat koşullarında yaşamlarını sürdürdüklerinin, lokal adaptasyon sağladıklarının ve küresel ısınma gibi gelecekte ortaya çıkma olasılığı yüksek çevresel değişimlere uyum sağlayacaklarının göstergesidir. Bundan dolayı, bu populasyonların genetik erozyona uğratılmadan yerinde korunması gereklidir.
- f) Bulgulara göre, populasyon-içi genetik çeşitliliği yüksek olan bir kızılçam populasyonu, yükselti kuşağı, ekolojik istekleri ve seçilen aileler göz önüne alınarak, ağaçlandırma amaçları için bugünkü coğrafik yayılış alanı içinde geniş alanlarda kullanılabilecek özelliktedir.
- g) Kızılçam'da gen kaynaklarının korunması stratejisinde, çalışılan her bir populasyonun nispeten yüksek düzeyde özel haplotip bulundurduğu göz önüne alındığında, genetik çeşitliliği yüksek olan birkaç büyük populasyon yerine her bir ekolojik bölgede çok sayıda küçük populasyonun seçilmesi uygun olacaktır. Böylece, lokal adaptasyondan kaynaklanan ve korunması arzu edilen genetik çeşitliliğin çok büyük bir bölümü, ayrılan bu populasyonlar içinde yakalanabilecektir.
- h) Bu tez çalışmasında, cpSSR belirteçlerinden elde edilen sonuçlar ile fidanlık (2. yaş) ve daha sonraki yaşlardaki (13., 17. ve 30.) morfolojik karakterlerden elde

edilen sonuçlar arasında benzerlik bulunmaktadır. Her iki durumda da, populasyonların çeşitliliği sahip oldukları yükselti kuşağı ile ilişkilidir.

Kızılçam'da da (nispeten uzun ömürlü diğer birçok canlıda olduğu gibi) cpSSR belirteçleri ile genetik çeşitlilik düzeyi çok kısa sürede, çevresel faktörlerin yol açtığı farklılıklardan arınmış olarak ve güvenilir bir şekilde ortaya konulabilmektedir. Buradan da gen kaynaklarının ve genetik çeşitliliğin korunmasında ve ıslah çalışmalarında izlenecek stratejilerin belirlenmesinde ilk adım olan genetik çeşitliliğin kısa sürede ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi için cpSSR analizlerinin önemli bir araç olduğu anlaşılmaktadır.

Bununla birlikte, bu tez çalışmasında ele alınan doğal populasyonlar, her ne kadar kızılçamın yayılış alanı içinde farklı iklimsel koşulları temsil etmiş olsalar da, yine de bu populasyonlar kızılçamın yayılış alanı içinde küçük bir alana (Antalya havzasına) karşılık gelmektedir. Bu nedenle, kızılçamın tüm yayılış alanını ve farklı yükselti kuşaklarını sistematik bir şekilde örnekleyerek elde edilen populasyonların ve ailelerin incelenmesi, kızılçam türünün farklı bölgelerdeki farklı populasyonlarının karşılaştırılması, tür içinde yeni ve ender haplotipler bulunup bulunmadığı hakkında bilgiler ortaya konulmasını sağlayacaktır. Yeni analizler yapılırken hem moleküler belirteçlerin hem de kantitatif karakterlerin birlikte kullanılması, evrimsel güçlerin populasyonlar üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında daha yararlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- AITKEN, S.N., YEAMAN, S., HOLLIDAY, J.A., WANG, T. A. and CURTIS-MCLANE, S. 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evol. Appl.* 1: 95-111.
- ALAN, M. and YILDIZ, M.A. 2006. Estimation of genetic parameters of *Pinus brutia* in the Aegean region of Turkey. p. 8. In: Proc. IUFRO Division 2 Joint Conference: Low input breeding and genetic conservation of forest tree species. 9-13 October, Antalya, Turkey.
- ALEMDAĞ, Ş. 1962. Türkiye'deki Kızılçam Ormanlarının Gelişimi, Hasılatı ve Amenajman Esasları. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi No:11, 160 s., Ankara.
- ALPACAR, K. 1981. Kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) fenolojisi ve bazı tohum özelliklerinin saptanması. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi No: 105, Ankara.
- ALTUN, Z.G. 2006. DNA işaretleyiciler (Markör) ve Türkiye'de orman ağaçları ıslahında kullanımı. Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Dergisi, Yayın No:295, ss:20-36, İzmir.
- AMOS, W. 1998. A comparative approach to the study of microsatellite evolution. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 66-79, Oxford University Press.
- ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., SPERISEN, B., ZIEGENHAGEN, B. and VENDRAMIN, G.G. 1999. Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. In: E.M. Gillet (Ed.). *Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>. Chapter 9.
- ARAVANOPOULOS, F.A., PANETSOS, P.K. and SKALTSOYIANNES, A. 2004. Genetic structure of *Pinus brutia* stands exposed to wild fires. *Plant Ecol.* 171: 175-183.
- AYDIN, S.Ö. 2004. RAPD (Rasgele artıtılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematığı. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Sayı:6, 113-130.
- BALDING, D. 1998. Forensic applications of microsatellite markers. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 198-210, Oxford University Press.

- BALLOUX, F. and LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 155-165.
- BANDELJ, D., JAKSE, J. and JAVORNIK, B. 2004. Amplification of fluorescent-labelled microsatellite markers in olives by a novel, economic method. *Acta agriculturae Slovenica*, 83(2): 323-329.
- BARBERO, M., LOISEL, R., QUEZEL, P., RICHARDSON, D.M. and ROMANE, F. 1998. Pines of the Mediterranean Basin. In: D.M. Richardson (Ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. pp.153-170. Cambridge University Press.
- BILIR, N., KANG, K.S. and LINDGREN, D. 2005. Fertility variation in six populations of Brutian pine (*Pinus brutia* Ten.) over altitudinal ranges. *Euphytica* 141: 163-168.
- BILIR, N., KANG, K.S. and OZTURK, H. 2002. Fertility variation and gene diversity in clonal seed orchards of *Pinus brutia*, *Pinus nigra* and *Pinus sylvestris* in Turkey. *Silvae Genet.* 51, 2-3: 112-115.
- BILIR, N., KANG, K.S., ZANG, D. and LINDGREN, D. 2004. Fertility variation and status number between a base population and a seed orchard of *Pinus brutia*. *Silvae Genet.* 53, 4-5: 161-163.
- BONNIN, I., PROSPERI, J.M. and OLIVIERI, I. 1996. Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. *Genetics* 143: 1795-1805.
- BOYDAK, M. 2004. Silvicultural characteristics and natural regeneration of *Pinus brutia* Ten.-a review. *Plant Ecol.* 171: 153 – 163.
- BOYDAK, M., DİRİK, H., ve ÇALIKOĞLU, M. 2006. Kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) Biyolojisi ve Silvikültürü, OGEM-VAK, 364 s.
- BRADSHAW, A.D. 1972. Some of the evolutionary consequences of being a Plant. In: M. Dobzhansky K. Hecht and W.C. Steere (Eds.). *Evolutionary Biology*. Appl. Century Crofts, 25-47, New York.
- BUCCI, G., ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., VENDRAMIN, G.G. 1998. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in Halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. *Mol. Ecol.* 7 :1-11.
- BUCCI, G., GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., LE PROVOST, G., PLOMION, C., RIBEIRO, M.M., SEBASTIANI, F., ALIA, R. and VENDRAMIN, G.G. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 16: 2137-2153.

- BURCZYK, J., DIFAZIO, S.P. and ADAMS, W. T. 2004. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? *Forest Genetics* 11 (3-4): 179-192.
- CALAMASSI, R., PUGLISI, S.R. and VENDRAMIN, G.G. 1988. Genetic variation in morphological and anatomical needle characteristics in *Pinus brutia* Ten.. *Silvae Genet.* 37(5-6): 199-206.
- CALISKAN, S. 2006. Genetic diversity of among and within the populations of natural Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten). İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Series A, Volume 56, Number 1, pp: 169-196, İstanbul.
- CARRINGTON, M., MARTI, D., WADE, J., KLITZ, W., BARCELLOS, L., THOMPSON, G., CHEN, J., TRUEDSSON, L., STURFELT, G., ALPER, C., AWDEH, Z. and HUTTLEY, G. 1998. Microsatellite markers in complex disease: mapping disease-associated regions within the human major histocompatibility complex. In: D.B. Goldstein and C. Schlotterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 225-237, Oxford University Press.
- CONKLE, M.T. 1980. Amount and distribution of isozyme variation in various conifer species. In: *Proceedings 7th Meeting, Canadian Tree Improvement Association, Part 2, Canadian For. Serv.*, pp: 109-117, Ottawa.
- CONKLE, M.T., SCHILLER, G. and GRUNWALD, C. 1988. Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *Pinus brutia* and closely related taxa. *System. Bot.* 13 (3):411-424.
- CORANDER, J., SIREN, J. and ARJAS, E. 2008. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computation. Stat.* 23: 111-129.
- CORANDER, J., WALDMANN, P. and SILLANPAA, M.J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163: 367-374.
- CUENCA, A., ESCALANTE, E. and PINERO, D. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Mol. Ecol.* 12: 2087-2097.
- ÇEVRE ve ORMAN BAKANLIĞI, 2005. <http://www.cevreorman.gov.tr>
- DANGASUK, O. G. and PANETSOS, K. P., 2004. Altitudinal and longitudinal variations in *Pinus brutia* (Ten.) of Crete Island, Greece: some needle, cone and seed traits under natural habitats. *New Forest* 27: 269-284.
- DAVIS, P. H. 1965. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol. 1, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- DROUZAS, S.D., ARAVANAPPOULOS, F.A. and PANETSOS, K.P. 2000. RAPD

- variation of natural hybrid population among *Pinus brutia* Ten. and *Pinus halepensis* Mill. Adaptation and Selection of Mediterranean Pinus and Cedrus for Sustainable Afforestation of Marjinal Lands. Proceedings of the Final Conference of the European Union Joint Research Project. FAIR CT 95 – 0097 (2 – 6 June, Mytilene), pp. 77 – 82, Greece.
- DYER, R.J. and SORK, V.L. 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill.. *Mol. Ecol.* 10, 859-866.
- ECHE, C.S., DEVERNO, L.L., ANZIDEI, M. and VENDRAMIN, G.G. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait.. *Mol. Ecol.* 7: 307-316.
- ECHE, C.S., VENDRAMIN, G.G., NELSON, C.D. and MARQUARDT, P. 1999. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Can. J. For. Res.* 29: 365-371.
- EISEN, J.A. 1998. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 34-48, Oxford University Press.
- ERTUĞRUL, M. 2005. Orman yangınlarının Dünya'daki ve Türkiye'deki durumu. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Bartın Orman Fakültesi Dergisi, Cilt: 7, Sayı: 7, 8 s. Bartın.
- ESTOUP, A. and CORNUET, J. M. 1998. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 49-65, Oxford University Press.
- ETTL, G. J. and PETERSON, D. L. 2001. Genetic variation of Subalpine fir (*Abies lasiocarpa* (Hook.) Nutt.) in the Olympic Mountains, WA, USA. *Silvae Genet.* 50: 145-153.
- EVANNO, G., CASTELLA, E. and GOUDET, J. 2006. Evolutionary aspects of population structure for molecular and quantitative traits in the freshwater snail *Radix balthica*. *J. Evolution. Biol.* 19: 1071-1082.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. and SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.
- FADY, B., SEMERCI, H. and VENDRAMIN, G.G. 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (*Pinus halepensis*) and Brutia pine (*Pinus brutia*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 p.
- FRANKIS, M. 1993. Morphology and affinities of *Pinus brutia*. In: Proceedings of international Symp. on *Pinus brutia* Ten. pp.11-18, October 18 to 23, Marmaris,

Turkey.

- FREEMAN, S. and HERRON, J.C. 2001. Evolutionary Analysis. Prentice-Hall, Inc. 2nd Edition.
- GILLET, E.M. 1999. DNA markers-concepts and characteristics. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>. Chapter 2.
- GOLDSTEIN, D.B., RUIZ-LINARES, A., CAVALLI-SFORZA, L.L. and FELDMAN, M.W., 1995. An evolution of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- GOMEZ, A., GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., COLLADA, C., CLIMENT, J. and GIL, L. 2003. Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1123-1131.
- GOMEZ, A., VENDRAMIN, G.G. GONZALEZ-MARTINEZ, S.C. and ALIA, R.. 2005. Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait.) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Divers. Distrib.* 11:257-263.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., ALIA, R. and GIL, L. 2002. Population genetic structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.): a comparison of allozyme markers and quantitative traits. *Heredity* 89: 199-206.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., MARIETTE, S., RIBEIRO, M.M., BURBAN, C., RAFFIN, A., CHAMBEL, M.R., RIBEIRO, C.A.M., AGUIAR, A., PLOMION, C., ALIA, R., GIL, L., VENDRAMIN, G.G. and KREMER, A. 2004. Genetic resources in maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton): molecular and quantitative measures of genetic variation and differentiation among maternal lineages. *Forest Ecol. Manag.* 197: 103-115.
- GRAHAM, L.E., GRAHAM, J.M. and WILCOX, L.W. 2003. Plant Biology. Prentice Hall, Inc. 1st Edition.
- GRUIES, R.R. 1984. Genetic variation and population differentiation in forest trees. In: Proceedings of 8th North American Forest Biology Workshop, pp: 119-131.
- GÜLBABA, A. G. ve ÖZKURT, N. 1998. Bolkar dağları doğal kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) populasyonlarının izoenzim çeşitliliği. Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten No:5, 27s., Tarsus.

- GÜLBABA, A. G. ve ÖZKURT, N. 2001. Bolkar dağları doğal kızılçamların da (*Pinus brutia* Ten.) genetik çeşitlilik ve gen koruma ve yönetim alanlarının belirlenmesi. Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten No:12, 38s., Tarsus.
- HAMANN, A., EL-KASSABY, Y.A., KOSHY, M.P. and NAMKOONG, G. 1998. Multivariate analysis of allozymic and quantitative trait variation in *Alnus rubra*: geographic patterns and evolutionary implications. *Can. J. For. Res.* 28: 1557-1565.
- HAMPE, A. and PETIT, R.J. 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol. Lett.* 8: 461-467.
- HAMRICK, J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In: D.E. Soltis and P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in Plant Biology*, Chapman and Hall, pp: 87-105, London.
- HANCOCK, J.M. 1998. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 1-9, Oxford University Press.
- HANSEN, O.K., KJAER, E.D. and VENDRAMIN, G.G. 2005. Chloroplast microsatellite variation in *Abies nordmanniana* and simulation of causes for low differentiation among populations. *Tree Genet. Genomes* 1: 116-123.
- HARTL, D.L and CLARK, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. (3rd Edition) Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, 542 pp., U.S.A..
- HOHN, M., ABRAN, P. and VENDRAMIN, G.G. 2005. Genetic analysis of Swiss stone pine populations (*Pinus cembra* L. subsp *cembra*) from the Carpathians using chloroplast microsatellite. *Acta Silv. Lign. Hung.* 1:39-47.
- ICGEN, Y. 2002. Genetic composition of *Pinus brutia* Ten. forests established with seeds from seed stands and orchards determined by using DNA markers. PhD. Thesis, Middle East Technical University, Department of Biology, 131p., Ankara.
- ICGEN, Y., KAYA, Z., CENGEL, B., VELIOGLU, E., OZTURK, H, and ONDE, S. 2006. Potential impact of forest management and tree improvement on genetic diversity of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) plantations in Turkey. *For. Ecol. Manag.* 225:328-336.
- IŞIK, F. 1998. Kızılçamda (*Pinus brutia* Ten.) Genetik Çeşitlilik, Kalıtım Derecesi ve Genetik Kazancın Belirlenmesi. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 231 s., Antalya, Türkiye.
- ISIK, F. and KAYA, Z. 1993. Genetic variation in *Pinus brutia* Ten. natural populations. In: *Proceedings of international Symp. on Pinus brutia* Ten.. pp.

243-253, October 18 to 23, Marmaris, Turkey.

- ISIK, F., ISIK, K. and LEE, S.J. 1999. Genetic variation in *Pinus brutia* Ten. in Turkey: I. Growth, biomass and stem quality traits. *Forest Genetics* 6 (2): 89-99.
- IŞIK, F., KESKİN, S., CENGİZ, Y., GENÇ, A., DOĞAN, B., TOSUN, S., ÖZPAY, Z., UĞURLU, S., ÖRTEL, E., DAĞDAŞ, S., KARATAY, H. ve YOLDAĞ, İ. 2002. Kızılçam orijin denemelerinin 10 yıllık sonuçları (Orijin – çevre etkileşimi ve tohum transferi üzerine etkisi). Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü, Teknik Bülten No: 14, 156 s., Antalya.
- ISIK, K. 1986. Altitudinal variation in *Pinus brutia* Ten.: Seed and seedling characteristics. *Silvae Genet.* 35(2-3): 58-67.
- IŞIK, K. 1988. Üç yinelemeli kenetlenmiş petek deseni ve kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) bir populasyon genetiği araştırmasında uygulanması. *Doğa, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 12 (3) : 377-386.
- ISIK, K. 1993. Genetic differences among the 60 open pollinated *Pinus brutia* Ten. families at four test sites in southern Turkey. In: Proceedings of international Symp. on *Pinus brutia* Ten.. pp. 235-242, October 18 to 23, Marmaris, Turkey.
- IŞIK, K. 1997. Karakter Kavramı ve Karakterlerin Genetik Temeli. Taksonomi Yaz Okulu Ders Notları. Editör: Battal Çıplak, ss. 73-106.
- IŞIK, K. 1999a. Orman Ağacı Türlerimizde Lokal Irkların Önemi ve Genetik Kirlenme Sorunları. Çevre Sorunları, Biyolojik Çeşitlilik ve Orman Gen Kaynaklarımız, T.E.M.A. Vakfı Yayın No:25, ss.137-150, İstanbul.
- IŞIK, K. 1999b. Bitki Gen Kaynaklarımız Niçin Korunmalı ve Planlanmalıdır? Çevre Sorunları, Biyolojik Çeşitlilik ve Orman Gen Kaynaklarımız, T.E.M.A. Vakfı Yayın No:25, ss.151-160, İstanbul.
- ISIK, K. and ISIK, F. 1999. Genetic variation in *Pinus brutia* Ten. in Turkey II. Branching and Crown Traits. *Silvae Genet.* 48(6): 293-302.
- ISIK, K. and KARA, N. 1997. Altitudinal variation in *Pinus brutia* Ten. and its implication in genetic conservation and seed transfers in southern Turkey. *Silvae Genet.* 46 (2-3): 113-120.
- IŞIK, K., SEMİZ, G. ve KURT, Y. 2005. Farklı doğal alanların, içerdikleri türler açısından UPGMA kümelendirme yöntemine göre karşılaştırılması. Korunan doğal alanlar sempozyumu, sözlü bildiriler kitabı, s. 505-512, Isparta.
- IŞIK, K., TOPAK, M. and KESKİN, A.C. 1987. Kızılçamda (*Pinus brutia* Ten.) Orijin Denemeleri (Altı Farklı Populasyonun Beş Ayrı Deneme Alanında İlk Altı Yıldaki Büyüme Özellikleri). Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Enstitüsü Yayını, No: 3, 139 ss., Ankara.

- KANDEMİR, G.E., KANDEMİR, I. and KAYA, Z. 2004. Genetic variation in Turkish Red Pine (*Pinus brutia* Ten.) seed stands as determined by RAPD markers. *Silvae Genet.* 53 (4):169-175.
- KARA, N., KOROL, L., ISIK, K. and SCHILLER, G. 1997. Genetic diversity in *Pinus brutia* Ten. : Altitudinal variation. *Silvae Genet.* 46(2-3): 155-161.
- KASAPLIGIL, B. 1978. Past and present pines of Turkey. *Phytologia* 40: 99-199.
- KASHI, Y. and SOLLER, M. 1998. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*, pp. 11-23, Oxford University Press.
- KAYA, N., ISIK, K. and ADAMS, W.T. 2006. Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. *New Forest* 31: 409-416.
- KAYA, Z. and NEALE, D.B. 1995. Linkage map based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Pinus brutia* Ten.. *Silvae Genet.* 44: 110-116.
- KAYA, Z., SKAGGS, A. and NEALE, D.B. 2008. Genetic differentiation of *Abies equi-trojani* (Asch.& Sint. ex Boiss) Mattf. populations from Kazdağı, Turkey and the genetic relationship between Turkish Firs belonging to the *Abies nordmanniana* Spach complex. *Turk. J. Bot.* 32: 1-10.
- KESKİN, S. 1999. Çameli-Göldağı orijinli kızılçam tohum bahçesinde çiçek ve kozalak verimi açısından klonal farklılıklar ve çiçeklenme fenolojisi. Orman Bakanlığı, Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Yayınları, Orman Bakanlığı Yayın No: 091, Teknik bülten no:9, 96s., Antalya.
- KLAUS, W. 1989. Mediterranean pines and their history. *Plant Syst. Evol.* 162: 133-163.
- KNOPP, T., CANO, J.M., CROCHET, P.A. and MERILA, J. 2007. Contrasting levels of variation in neutral and quantitative genetic loci on island populations of moor frogs (*Rana arvalis*). *Conserv. Genet.* 8: 45-56.
- KOROL, L., SHKLAR, G. and SCHILLER, G. 2002a. Diversity among circum-mediterranean populations of Aleppo pine and differentiation from Brutia pine in their isoenzymes: Additional results. *Silvae Genet.* 51 (1): 35-41.
- KOROL, L., SHKLAR, G. and SCHILLER, G. 2002b. Genetic variation within and among *Pinus brutia* Ten. seed stands in Turkey in their isoenzymes. *Forest Genetics* 9 (3): 233 – 242.
- KREMER, A., LE CORRE, V. and MARIETTE, S. 2000. Population differentiation for adaptive traits and their underlying loci in forest trees: theoretical predictions and experimental results. *Forest Genetics and Sustainability (Forestry sciences)*,

Vol.63, pp.59-74.

- KREMER, A., ZANETTO, A. and DUCOUSSO, A. 1997. Multilocus and multitrait measures of differentiation for gene markers and phenotypic traits. *Genetics* 145: 1229-1241.
- KRUPKIN, A.B., LISTON, A. and STRAUSS, S.H. 1996. Phylogenetic analysis of the hard pines (*Pinus subgenus Pinus*, *Pinaceae*) from chloroplast DNA restriction site analysis. *Am. J. Bot.* 83(4): 489-498.
- KUITTINEN, H., MATTILA, A. and SAVOLAINEN, O. 1997. Genetic variation at marker loci in quantitative traits in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 79: 144-152.
- LEINONEN, T., O'HARA, R., CANO, J.M. and MERILA, J. 2008. Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *J. Evolution. Biol.* 21: 1-17.
- LIBBY, W.J. 1973. Domestication strategies for forest trees. *Can. J. For. Res.* 2: 265-276.
- LIBBY, W.J. and COCKERHAM, C.C. 1980. Random non-contiguous plot in interlocking field layouts. *Silvae Genet.* 29(5/6): 183-190.
- LISE, Y. 2000. Impact of anthropogenic factors on the composition of genetic variation on *Pinus brutia* Ten. populations determined by DNA markers. M. Sci. Thesis, Middle East Technical University, Department of Biology, Ankara, 96p.
- LISE, Y., KAYA, Z., ISIK, F., SABUNCU, R., KANDEMIR, I. and ONDE, S. 2007. The impact of over-exploitation on the genetic structure of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) populations determined by RAPD markers. *Silva Fenn.* 41(2): 211-220.
- LITTLE, E.L. and CRITCHFIELD, W.B. 1969. Subdivisions of the genus *Pinus* (pines). United States Department of Agriculture, Forest Service, Washington, D.C. (Miscellaneous publication 1144).
- LONG, A.D. and SINGH, R.S. 1995. Molecules versus morphology: the detection of selection acting on morphological characters along a cline in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 74: 569-581.
- LYNCH, M., PFRENDER, M., SPITZE, K., LEHMAN, N., HICKS, J., ALLEN, D., LATTA, L., OTTENE, M., BOGUE, F. and COLBOURNE, J. 1999. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* 53(1): 100-110.
- MEDAIL, F. and DIADEMA, K. 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *J. Biogeogr.* 36, 1333-1345.

- METTLER, L.E. and GREGG, T.G. 1969. Population Genetics and Evolution. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- MITTON, J.B., STURGEON, K. B. and DAVIS, M. L. 1980. Genetic differentiation in ponderosa pine along a steep elevational transect. *Silvae Genet.* 29: 100-103.
- MORGANTE, M., FELICE, N. and VENDRAMIN, G.G. 1997. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: A. Karp P.G. Isaac and D.S. Ingram (Eds). Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals, pp. 407-412, Chapman and Hall, London.
- NAVASCUES, M. and EMERSON, B.C. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Mol. Ecol.* 14: 1333-1341.
- NAVASCUES, M., VENDRAMIN, G.G. and EMERSON, B.C. 2008. The effect of altitude on the pattern of gene flow in the endemic Canary Island Pine, *Pinus canariensis*. *Silvae Genet.* 57(6): 357-363.
- NAYDENOV, K.D., TREMBLAY, F.M., FENTON, N.J., ALEXANDROV, A. 2006. Structure of *Pinus nigra* Arn. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochem. Syst. and Ecol.* 34:562-574.
- NEI, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. 512 p. Columbia University Press, New York.
- NEALE, D. B. and ADAMS, W. T. 1985. Allozyme and mating-system variation in balsam fir (*Abies balsamea*) across a continuous elevational transect. *Can. J. Bot.* 63: 2448-2453.
- NEVO, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.* 13: 129-177.
- NEYİŞÇİ, T. 1987. Kızılçamın Doğal Yayılışı. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Muhtelif Yayınlar Dizisi, no:52, ss. 15-22, Ankara.
- OLIVEIRA, E.J., PADUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCOVSKY, R. and CARNEIRO-VIERIA, M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29(2): 294-307.
- OHSAWA, T. and IDE, Y. 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecol. Biogeogr.* 17, 152-163.
- ORMAN GENEL MÜDÜRLÜĞÜ. 2003. 2003 Yılı Değerlendirme Raporu. OGM, Koruma Dairesi, Ankara.

- ORMAN GENEL MÜDÜRLÜĞÜ. 2006. Orman Varlığımız. OGM, Orman İdaresi ve Planlaması Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- OUBORG, N.J., PIQUOT, Y. and VAN GROENENDAEL, J.M. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *The Journal of Ecology*, Vol.87, No:4. pp. 551-568.
- OZEL, E. E. 2001. The pattern of genetic variation in *Pinus brutia* populations in southern Turkey determined by nuclear SSR markers. M. Sci. Thesis, Middle East Technical University, Department of Biology, 163p., Ankara.
- OZER, H. 1997. The pattern of genetic variation in *Pinus brutia* Ten. seed stands: Implications for *in situ* gene conservation. M. Sci. Thesis, Middle East Technical University, Department of Biology, 60p., Ankara.
- ÖKSÜZ, H. 2003. Kadastro-Orman-Mera Kanunları. Kanun Metinleri Dizisi: 13, 414s., Seçkin Yayıncılık, Ankara.
- ÖZTÜRK, H. ve ŞIKLAR, S. 2000. Türkiye milli ağaç ıslahı ve tohum üretimi programı (özellikleri ve gerçekleştirilen çalışmalar). Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü dergisi, Sayı:1, 41 s., Ankara.
- PALMBERG, C. 1975. Geographic variation and early growth in south-eastern semi-arid Australia of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus brutia* Ten. species complex. *Silvae Genet.* Vol.24, No 5-6, 150-160.
- PANETSOS, K.P., ARAVANOPOULOS, F. A. and SCALTSOYIANNES, A. 1998. Genetic variation of *Pinus brutia* from islands of the northeastern Aegean sea. *Silvae Genet.* 47: 115-120.
- PANETSOS, K.P., SCALTSOYIANNES, A., ARAVANOPOULOS, F.A., DOUNAVI, K. and DEMETRAKOPOULOS, A. 1997. Identification of *Pinus brutia* Ten., *P. halepensis* Mill. and their putative hybrids. *Silvae Genet.* 46: 253-257.
- PETIT, J.R., DUMINIL, J., FINESCHI, S., HAMPE, A., SALVINI, D. and VENDRAMIN, G.G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* 14, 689-701.
- PROVAN, J., POWELL, W. and HOLLINGSWORTH, P. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 16 (3): 142-148.
- QUEZEL, P. 2000. Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinus halepensis* and *P. brutia*). In: G. Ne'eman and L. Trabaud (Eds.), Ecology, Biogeography and Management of *Pinus halepensis* and *P. brutia* Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin, pp.1-12, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

- RIBERIO, M.M., PLOMION, C., PETIT, R., VENDRAMIN, G. G. and SZMIDT, A. E. 2001. Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theor. Appl. Genet.* 102:97-103.
- RITLAND, K. 2000. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Mol. Ecol.* 9: 1195-1204.
- ROBINSON, J.P. and HARRIS, S.A. 1999. Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: A phylogenetic perspective. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>. Chapter 12.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., COLLADA, C., ALIA, R. and GIL, L. 2005. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *J. Biogeogr.* 32: 595-605.
- SAS. 1999. Sas user's guide: Statistics. Ver. 8.0, Cary, N.C: SAS Institute, Inc.
- SAENZ-ROMERO, C., GUZMAN-REYNA, R. R. and REHFELDT, G. E., 2006. Altitudinal genetic variation among *Pinus oocarpa* populations in Michoacan, Mexico, implications for seed zoning, conservation, tree breeding and global warming. *Forest Ecol. Manag.* 229: 340-350.
- SAENZ-ROMERO, C. and TAPIA-OLIVARES, B. L., 2003. *Pinus oocarpa* isoenzymatic variation along an altitudinal gradient in Michoacan, Mexico. *Silvae Genet.* 52: 237-240.
- SCALFI, M., PIOTTI, A., ROSSI, M. and PIOVANI, P. 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. *Eur. J. Forest Res.* 128: 377-386.
- SCHILLER, G. 1994. Diversity among *Pinus brutia* subsp. *brutia* and related taxa – a review. İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Seri A, Cilt 44, s. 133 – 147, İstanbul.
- SCHILLER, G. 2000. Inter- and intra-specific genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. and *P. brutia* Ten.. In: G. Ne'eman and L. Trabaud (Eds.), Ecology, Biogeography and Management of *Pinus halepensis* and *P. brutia* Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin, pp.13-35, Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- SCOTTI, I., PAGLIA, G., MAGNI, F. and MORGANTE, M. 1999. Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European

- SELİK, M. 1958. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)'ın botanik özellikleri üzerine araştırmalar ve bunların Halep çamı (*Pinus halepensis* Mill.) vasıfları ile mukayesesi. İ. Ü. Or. Fak. Dergisi, Seri: A, Sayı: 8-2, 161-198.
- SELİK, M. 1963. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)'ın botanik özellikleri üzerine araştırmalar ve bunların Halep çamı (*Pinus halepensis* Mill.) vasıfları ile mukayesesi. Orman Genel Müdürlüğü Yayını No: 353/36, İstanbul.
- SEMİZ, G. 2009. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)'da çam kese böceği (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams.)'ne karşı direncin genetik çeşitliliğinin terpenler bakımından araştırılması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 132 ss., Antalya.
- SGRO, C.M. and HOFFMANN, A.A. 2004. Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* 93 (3): 241-248.
- SHIBATA, D. 1998. Microsatellite analysis of human tumours. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). Microsatellites: Evolution and Applications, pp. 266-274, Oxford University Press.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- SNEATH, P.H.A. and SOKAL, R.R. 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. W.H. Freeman and Co., 573 pp., San Francisco.
- STOEHR, M.U., ORVAR, B.L., VO, T.M., GAWLEY, J.R., WEBBER, J.E. and NEWTON, C.H. 1998. Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 28: 187-195.
- STRICKBERGER, M.W. 1996. Evolution (2nd Edition). Jones and Bartlett Publishers, 670p, Sudburg, Massachusetts.
- ŞEFİK, Y. 1965. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) kozalak ve tohumu üzerine araştırmalar. Orman Genel Müdürlüğü yayınları, No: 420/41, Ankara.
- TUNÇTANER, K. 2007. Orman Genetiği ve Ağaç Islahı. Türkiye Ormancılar Derneği, Eğitim Dizisi: 4, 364 s.
- TURNA, I. and GUNEY, D. 2009. Altitudinal variation of some morphological characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 8(2): 202-208.

- VARSHNEY, R.K., GRANER, A. and SORRELS, M.E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* Vol.23, No.1, pp.48-55.
- VAXEVANIDOU, Z., GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., CLIMENT, J. and GIL, L. 2006. Tree populations bordering on extinction: A case study in the endemic Canary Island pine. *Biol. Conserv.* 129: 451-460.
- VELİOĞLU, E., İÇGEN, Y., ÇENGEL, B., ÖZTÜRK, H. and KAYA, Z. 2002. Moleküler belirteçler yardımıyla kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) tohum meşcerelerinde, tohum bahçelerinde ve ağaçlandırmalarında bulunan genetik çeşitliliğin karşılaştırılması. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Orman Ağaçları ve Tohumları Araştırma Müdürlüğü, Teknik Bülten No: 10, Orman Bakanlığı Yayın No: 189, 47 ss.
- VENDRAMIN, G.G., LELLI, L., ROSSI, P. and MORGANTE, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol. Ecol.* 5: 595-598.
- VIVEROS-VIVEROS, H., SAENZ-ROMERO, C., VARGAS-HERNANDEZ, J.J., LOPEZ-UPTON, J., RAMIREZ-VALVERDE, G. and SANTACRUZ-VARELA, A. 2009. Altitudinal genetic variation in *Pinus hartwegii* Lindl. I: Height growth, shoot phenology, and frost damage in seedlings. *Forest Ecol. Manag.* 257: 836-842.
- WEINSTEIN, A. 1989a. Provenance evaluation of *Pinus halepensis*, *P. brutia* and *P. elderica* in Israel. *Forest Ecol. Manag.* 26: 215-225.
- WEINSTEIN, A. 1989b. Geographic variation and phenology of *Pinus halepensis*, *P. brutia* and *P. elderica* in Israel. *Forest Ecol. Manag.* 27: 99-108.
- WEINTRAUB, S. 2002. Demystifying silica gel. Object specialty group postprints, Vol. 9, 1-24, Washington, D.C: American Institute for Conservation.
- WEIR, B.S. 1990. Genetic Data Analysis. 377 p., Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- WHITLOCK, M.C. 2008. Evolutionary inference from Q_{ST} . *Mol. Ecol.* 17: 1885-1896.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIC, A.K., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- WRIGHT, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4, Variability within and among Natural Populations, 590 p., University of Chicago Press, Chicago.

- YAHYAOĞLU, Z., AYAZ, F.A. and GENÇ, M. 1993. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) da izoenzim analizleriyle orijin ayırımı. Uluslararası Kızılçam Sempozyumu (18-23 Ekim, Marmaris), Orman Bakanlığı Yayını, s. 254-263, Türkiye.
- YANG, R.C., YEH, F.C. and YANCHUK, A.D. 1996. A comparison of isozyme and quantitative genetic variation in *Pinus contorta* ssp. *latifolia* by F_{ST} . *Genetics* 142: 1045-1052.

7. EKLER

EK-1: Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanındaki ağaçların yerleşim planı ve örneklenen ağaçlar (ayrıntılı plan, takip eden iki sayfada verilmiştir)

Sıra No'ları	Sütun No'ları									
		1	10	20	35	36	50	60	70	
	1	Bu sayfanın ayrıntılı planı sayfa 94'dedir.				Bu sayfanın ayrıntılı planı sayfa 96'dadır.				1
	10									10
	20									20
	30									30
	47									47
	48	Bu sayfanın ayrıntılı planı sayfa 95'dedir.				Bu sayfanın ayrıntılı planı sayfa 97'dedir.				48
	60									60
	66									66
	1	10	20	35	36	50	60	70		

Açıklama:

Ayrıntılı yerleşim planında sağ ve sol sütunda gösterilen 1-66 arası rakamlar, deneme alanında dikili ağaçların sıra numaralarını; üst ve alt sırada gösterilen 1-70 arası rakamlar da sütun numaralarını gösterir. Örneğin, K7 (K populasyonundan 7 numaralı aileye ait olan bireylerden biri) 10-18'de (10. sıra - 18. sütun) yer almaktadır. Deneme ilk kurulduğu zaman, deneme alanında her aileden 3 yineleme $\times$ 10 birey = 30 birey bulunmaktaydı [Deneme kurulurken, deneme alanının dış kenarlarında üç sıra halinde dikilen ayırım (izolasyon) zonu ağaçları hariç]. Ağaçların gelişimine ve tepe çatısının kapalılık derecesine bağlı olarak, sistematik biçimde iki aralama kesimi yapılmıştır (Işık 1988, Işık 1998). Deneme alanında Şubat 1995'den beri tek bir yineleme (m kodlu yineleme) bulunmakta ve bu yinelemedeki ağaçlar büyümelerine devam etmektedir. Bu tez çalışması için örneklenen ağaçlar (toplam 240 ağaç) ayrıntılı planda koyu olarak gösterilmiştir. Ayrıntılı planda her bir ağacın önünde bulunan m, k ve b harfleri, sırasıyla mavi, kırmızı ve beyaz replikasyonları simgeleyen harflerdir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
1	kD2		mD2				kS4		mS4				kS4		mS4				kS4		mS4						mS4								bS4	
2					mM3						mM3							bM3				mM3							mM3							
3	kD2							mK7						mK7					mK7								mK7							mK7		
4					*mD7						mD3						mM7							mD7					mM3					*		
5	kD2		mD2					mH14						mS7								mH3					mM2							mH12		
6					mB8						mK6							mM12							mD16				mS2							
7	kB8		mB8					mM6							mK5							mM2					mS3							mM9		
8					mK10						mH11							mD15							mD15				mS3							
9	kB8		mB8					mH4						mD4								mH11					mS11									
10					mM5						mB13							mK7							mM7				mH15							
11	kB8							mS4						mD16													mS1							mH11		
12					*mB14						mB11							mK5								mD13				mM10				*		
13	kB8		mB8					mS6							mK3												mM13							mK8		
14					mM7						mD7							mK8									mS8				mK3					
15	kB8							mD3							mB2												mS4							mK10		
16					mM10						mK1							mM3								mK10				mS9						
17	kB8		mB8					mH11							mM2													mK3				mK11				
18					mM2						mH5							mS3										mH12			mS3					
19	kH13		mH13					mM3							mD6													mD4			mH13			mS1		
20					mK3						mS4							mM10													mH4					
21	kH13		mH13					mD16							mS2													mS2			mH15			mD13		
22					mH3						mS6							mB9															mK9			
23			mH13					mB1							mB8														mM5			mD9			mD12	
24					*mD12						mB5							mD6										mK1				mK1		*		
25	kH13		mH13					mB12							mS8														mH12			mD2			mS4	
26					mH9						mB6							mS7											mM12			mD4				
27	kH13		mH13					mS11							mB9														mB6					mB5		
28					mD15						mK10							mB2											mB9			mK7				
29			mH13					mB13																					mB1						mS8	
30					mM9						mS10																			mS10				mB14		
31			mK3					mS10							mB14														mM6			mK12				
32					mM8													mH5											mK7			mM2				
33	kK3		mK3					mK6																						mS10					mM8	
34					mH12						mM12							mK6											mH9							
35	kK3		mK3					mD4							mD15																mK9				mD9	
36					*mK7						mM6							mS9											mD6			mM12		*		
37			mK3					mK8																						mM13			mH11			
38					mH13						mK9																			mK5			mH3			
39	kK3							mB11																						mD12			mH3		mS6	
40					mK1						mD2																			mD4				mB2		
41	kK3		mK3					mS3							mH9															mS11			mS9		mK5	
42											mH14																			mH15			mB11		mM7	
43	kB11		mB11					mK5							mM5															mB12			mS2		mK12	
44					mM13						mM7																				mB13			mH14		
45	kB11		mB11					mM12							mS9															mM8			mM8		mD6	
46					mB5						mM10																			mS8			mK8		mB9	
47			mB11					mS7																										mH15		mD9

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70		
kS4				bS4						bS4	kS4			mS4				kS4	mS4					kS4	mS4		mS4	bS4	kD2	mD2				1		
mM3					mM3	bM3				mM3							mM3							mM3					mD2			kD2		2		
		mK7					mK7				mK7									mK7						mK7					mD2			3		
mK9					mS10						mM8						mB5							mB2			*	mD2			kD2		4			
		mH12					mH4					mB14							mK9							mK5					mD2			5		
mS2					mM6						mS4								mH14						mM12				mD2					6		
		mS9					mB6					mB6								mH13						mS11					mH15			7		
mK3					mS4						mD3								mD12						mS10				mH15			kH15		8		
		mB6					mK1					mH3								mM13														9		
mM5											mM6								mD3						mD6				mH15			kH15		10		
		mB14										mK9								mH3							mH12				mH15			11		
mH4					mB1						mB5									mH4						mD13		*	mH15			kH15		12		
		mH3					mM8					mD12															mB12				mH15			13		
mM3					mD2						mB12									mB8									mH15			kH15		14		
		mD2					mB5					mH12																mK9				mH15		15		
mD4					mM2						mM9									mS11						mM5			mH15			kH15		16		
		mK11					mD6					mS6															mH9				mH15			17		
mS3											mM3									mS2						mK7			mH15			kH15		18		
		mS8					mS7					mH15														mS9			mK12			mK5		19		
mB8					mB12															mM5							mB11			mK5				20		
		mD7					mB2					mD7																mM13			mK5			21		
mK7					mH13															mH9							mD15			mK5			kK5	22		
		mK10					mK3																				mH15				mK5			23		
mM10					mK7						mK7																mH15		*	mK5				24		
		mM9										mD13															mH12			mB14			mK5	25		
mD15					mS6						mK11									mS4							mS2			mK5				26		
		mH5					mS8					mK5																mH11			mK5			27		
mH15					mH9						mD9																			mK5			kK5	28		
		mM8					mM5					mB2															mK12			mM6			mK5	29		
mS10					mM3						mH9									mB1								mD7			mK5			kK5	30	
							mM7													mB9	bB14							mD3				mM13		31		
mK1					mH12						mM2																			mM13			kM13		32	
		mK5					mK10				mB9																mM2	bS8			kM13	mM13		33		
mS11					mH14						mS1									mM8												kM13		34		
																												mH13			kM13	mM13		35		
mB12					mK12						mH11									mK8								*	mM13					36		
		mD13					mK6																						mS6			mM13		37		
mK8					mS2						mB1									mK3									mM13			kM13		38		
		mM13					mD3					mH14																mD16			mM13			39		
mB11					mB13															mM10								mM10			mM13			kM13	40	
		mS7					mD15					mH5																			mM13			41		
mK6											mD6																		mD9			mM13			kM13	42
		mH2					mD4					mM12																		mB6			mD16		43	
mM6					mH2						mD16									mB6										mD16			kD16	44		
							mD7																							mM3					45	
mB13					mM12						mK10																				mD16				46	
		mS6																														mD16			47	

mD3		mB9		mM13		mB14		mH5		*	mD16		48																					
	mB1			mM10		mM10		mS7		mH2	bH11		49																					
mH13		mK9				mK6		mS1	bH2				50																					
	mB9		mD16		mK12		mS3						51																					
mB5		mH15				mM9		mK10					kD16 52																					
	mD6		mD9		mS2		mD9		mK3	bM5		mD16	53																					
mD12		mH3		mB13		mB13		mM8			mD16		kD16 54																					
	mM2		mD12		mS10		mM7		mH4			mM8	55																					
				mB8		mD4		mK1			mM8		kM8 56																					
	mB2		mB8		mM5		mK10					mM8	57																					
mH9		mK11		mK6		mH5		mS3	bB13		mM8		kM8 58																					
	mM7		mB11		mK1		mB11		mB1			mM8	59																					
mD9				mS8		mD7		mK11			mM8		kM8 60																					
	mM12		mK5		mH13		mB12		mM9				61																					
mS4		mS3		mH4		mS6		mM2			mM8		kM8 62																					
	mK12		mM13		mS11		mH11		mS9	*			63																					
		mD7		mD7				mD7			mM8		kM8 64																					
	mB6		mB6		mB6		mB6						65																					
	bH4	mH4		kH4	mH4			kH4		kH4	mM8		kM8 66																					
36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70

EK-2: Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanında bulunan ailelere ait ağaçların (bireylerin) sıra-sütun konum listesi. Deneme alanından örneklenen ağaçlar, aile kodları ve deneme alanı içinde konuşlandıkları noktalar (örneklenen bireylerin konuşlandıkları noktalar sıra-sütun numaraları olarak koyu rakamlarla gösterilmiştir)

Aile No'su	Düzlerçamı Deneme Alanı (Sıra-Sütun)									
Sarılar Populasyonu										
S1	11-27	19-33	34-48	50-60	51-9	57-15	61-21			
S2	6-30	6-36	18-54	21-15	21-21	26-60	38-42	43-27	53-51	
S3	7-27	8-30	18-18	18-30	18-36	41-9	51-57	58-60	62-42	63-15
S4	6-48	8-42	11-9	15-27	20-12	25-33	26-54	39-63	55-21	62-36
S6	13-9	17-51	22-12	26-42	37-63	39-33	47-39	58-24	59-21	62-54
S7	5-15	19-45	26-18	41-39	47-9	49-57	54-24			
S8	14-24	19-39	25-15	27-45	29-33	34-60	45-57	46-18	60-48	63-9
S9	7-39	16-30	19-57	36-18	41-27	45-15	63-63			
S10	4-42	8-60	28-54	30-12	30-24	30-36	31-9	33-21	55-51	59-33
S11	7-63	9-27	16-54	27-9	34-36	41-21	55-15	63-51		
Murtbeli Populasyonu										
M2	5-27	7-21	16-42	17-15	18-6	32-30	32-48	33-57	55-39	62-60
M3	4-30	14-36	16-18	18-48	19-9	30-42	42-54	45-63	52-24	54-12
M5	10-6	10-36	16-60	20-54	23-21	29-45	43-15	57-33	57-51	59-27
M6	6-42	7-9	10-48	29-63	31-21	36-12	44-36	61-33		
M7	4-18	10-24	14-6	31-45	42-30	44-12	47-63	55-57	59-39	
M8	4-48	13-45	29-39	32-6	33-33	34-54	45-21	45-27	52-12	54-60
M9	7-33	16-48	25-39	30-6	49-21	49-27	51-15	52-54	61-63	
M10	12-30	16-6	20-18	24-36	40-54	40-60	46-12	49-45	49-51	50-24
M12	6-18	6-60	24-54	26-24	34-12	36-30	43-51	45-9	46-42	61-39
M13	9-57	13-27	21-63	37-21	39-39	44-6	48-48	55-33	61-15	63-45
Kapan Populasyonu										
K1	9-45	16-12	21-57	24-24	24-30	32-36	40-6	56-60	59-51	60-18
K3	8-36	13-15	14-30	17-21	20-6	23-45	38-54	53-63	57-27	
K5	5-63	7-15	12-18	27-51	33-39	38-24	41-33	41-57	43-9	61-45
K6	6-12	33-9	34-18	37-45	42-36	48-24	50-54	58-48		
K7	10-18	18-60	22-36	24-42	24-48	28-30	32-24	36-6		
K8	13-33	14-18	14-60	36-54	37-9	38-36	46-24			
K9	4-36	5-57	11-51	15-63	22-30	35-27	38-12	48-18	50-42	
K10	8-6	15-33	16-24	23-39	28-12	33-45	46-48	52-60	54-18	57-57
K11	17-27	17-39	26-48	27-57	50-12	52-6	53-21	53-33	58-42	60-60
K12	19-63	29-57	31-27	36-42	43-33	49-15	50-6	51-21	51-51	63-39

Devamı arka sayfada

Önceki sayfanın (Ek-2) devamı

Doyran Populasyonu										
D2	14-42	15-39	15-57	25-27	40-12	46-60	47-51	53-9	62-18	
D3	4-12	8-48	10-54	15-9	31-63	39-45	44-18	48-36	55-27	
D4	9-15	16-36	19-21	26-30	35-9	40-24	43-45	56-54		
D6	10-60	17-45	19-15	24-18	36-24	42-48	45-33	53-39	57-9	
D7	4-6	4-24	14-12	21-39	21-51	30-60	45-45	52-18	60-54	
D9	23-27	28-48	35-33	42-60	47-21	53-45	53-57	60-12	60-36	61-9
D12	8-54	13-51	23-33	24-6	38-60	39-21	54-36	55-45		
D13	12-24	12-60	21-33	25-51	37-39	43-57	59-9			
D15	8-18	8-24	22-60	26-36	28-6	32-54	35-15	41-45	54-30	
D16	6-24	11-15	21-9	39-57	40-18	44-48	44-60	51-45		
Bük Populasyonu										
B1	12-42	23-9	29-21	30-54	38-48	49-39	56-12	59-63	62-30	63-27
B2	4-60	15-15	21-45	28-18	29-51	40-30	47-57	57-39		
B5	4-54	12-48	15-45	24-12	27-33	46-6	52-36	57-21		
B6	7-45	7-51	9-39	26-12	27-21	43-63	44-54	56-24	58-30	62-6
B8	6-6	13-21	14-54	20-36	23-15	28-60	51-27	56-30	56-48	57-45
B9	22-18	27-15	28-24	31-57	33-51	46-30	48-42	51-39	55-9	
B11	12-12	20-60	39-9	40-36	42-24	58-18	59-45	59-57		
B12	13-63	14-48	20-42	25-9	36-36	43-21	51-33	53-15	61-27	61-57
B13	10-12	29-9	40-42	44-24	46-36	50-18	54-48	54-54		
B14	5-51	11-39	12-6	25-63	30-30	31-15	38-18	48-54	60-24	
Hacıbekar Populasyonu										
H2	25-57	43-39	44-42	49-63						
H3	5-21	9-51	11-57	13-39	17-57	22-6	38-30	39-27	54-42	
H4	5-45	9-9	12-36	12-54	15-21	20-30	55-63	59-15	62-48	
H5	18-12	27-39	32-18	41-51	48-60	49-9	58-54	62-24	63-33	
H9	17-63	22-54	26-6	28-42	30-48	34-24	41-15	48-30	56-18	58-36
H11	8-12	9-21	11-33	17-9	27-63	36-48	37-27	63-57		
H12	5-33	5-39	11-63	15-51	18-24	25-21	32-42	34-6	58-6	58-12
H13	7-57	11-21	19-27	22-42	29-15	35-63	38-6	50-36	61-51	
H14	5-9	6-54	34-42	39-51	42-12	44-30	63-21			
H15	10-30	19-51	21-27	23-57	24-60	28-36	42-18	47-15	52-42	54-6

EK-3: Çalışmada izlenen DNA izolasyon yöntemi

İzolasyon kit'inin muhafaza koşulları

The Invisorb® DNA Plant HTS 96 Kit/C oda sıcaklığında (18-25 °C) kuru olarak muhafaza edilmelidir. İzolasyon kiti, bu koşullar altında en az 12 ay dayanıklıdır. Proteinaz K ve RNAz A -20 °C'de muhafaza edilebilir. Her kullanımdan önce kit bileşenlerinin oda sıcaklığında bulunduğundan emin olunmalıdır. Kullanılan solüsyonlarda herhangi bir çökme varsa dikkatli bir şekilde ısıtılarak çökelmeler çözülebilir. Çözeltiler kullanılırken daima eldiven giyilmeli ve parmak veya vücut dokusu (ten) ile temastan kaçınılmalıdır.

Kristalize Proteinaz K 2-8 °C'de muhafaza edilmelidir. Seyreltilmiş (veya sulandırılmış) Proteinaz K -20 °C'de muhafaza edilmeli, fakat sürekli dondurma ve çözme aktivitesini önemli bir şekilde azaltacaktır. Bundan dolayı Proteinaz K'nın eşit parçalara bölünmesi ve -20 °C'de muhafaza edilmesi tavsiye edilir.

Kit bileşenleri	2 × 96 Örnek İzolasyonu
Özütleme tamponu P	2 × 40 mililitre (ml)
Bağlama tamponu P	1 × 80 ml
Ayrıştırma tamponu D	1 × 30 ml
Proteinaz K	2 × 2 ml
RNAz A	2 × 4 ml
Yıkama tamponu 1	1 × 75 ml (Son hacim 150 ml)
Yıkama tamponu 2	2 × 45 ml (Son hacim 2 × 150 ml)
Toplama plakası (2 ml)	1 × 4 adet
Toplama plakası (1 ml)	1 × 2 adet
Ön filtrasyon plakası	1 × 2 adet
DNA bağlama plakası C	1 × 2 adet
Kapatma folyosu	1 × 12 adet

Başlangıç basamağı

Yıkama tamponu-1 şişesine %99.8'lik etil alkolden 75 ml eklenir. Yıkama tamponu-2 şişelerinin her birine %99.8'lik etil alkolden 105 ml eklenir. Şişeler hafifçe karıştırılır ve daima sıkıca kapatılır. Proteinaz K tüplerinin her birine 2 ml ddH₂O eklenir, iyice karıştırılır ve - 20 °C'de muhafaza edilir veya kristalize Proteinaz K 2-8 °C'den alınarak doğrudan kullanılabilir.

1- Bitki materyalinin özütleme tamponunda inkübasyonu

Bitki materyalleri, homojenizasyon işleminden hemen sonra özütleme tamponu ile inkübe edilir. Bir şişe özütleme tamponu, bir tüp proteinaz K ve bir şişe RNAz A karıştırılır. İyice çalkalandıktan sonra 96'lık plakada bulunan her bir bitki örneği tüpüne 400 µl özütleme tamponu eklenir. Her bir tüpün kapağı iyice kapatılıp ve plaka birkaç kez sallanarak özütleme tamponunun iyice örnek ile karışımı sağlanır. Plakalar 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 60 dakika (1 saat) inkübe edilir. Inkübasyon sırasında su seviyesinin örneklerin bulunduğu plakaların seviyesini geçmemesi gerekmektedir. Her 20 dakikada plakalar kontrol edilir ve kapakları açılmış olan tüplerin kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra çalkalanıp tekrar su banyosuna konulur. Su banyosu bittikten sonra plakalar iyice kurutulur ve 3700 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

2- Ön filtrasyon

Ön filtrasyon plakası 2 ml'lik toplama plakasının üzerine yerleştirilir. Örneklerin bulunduğu plakadan 350 µl özüt dikkatli bir şekilde alınarak ön filtrasyon plakasına transfer edilir. Tüplerde bulunan özüt kısmı alınmalıdır, partiküllü kısım alınırsa DNA'da kirlenme görülme olasılığı yüksektir. Ön filtrasyon plakasının üstü kapatma folyosu ile kapatılır. Bütün blok (ön filtrasyon plakası / 2 ml toplama plakası) birlikte tutularak santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 500 rpm'de 10 saniye santrifüj edilir. Bütün blok santrifüjden alınır ve kapatma

foliyosu kaldırılır. Eğer özüt tamamen ön filtreden geçmişse tekrar santrifüj yapmaya gerek yoktur. Ön filtrasyon plakası çöp kutusuna atılır.

3- Genomik DNA'nın DNA bağlama plakası C'ye bağlanması

Toplama plakasında bulunan her bir kuyucuğa 350 µl bağlama tamponu eklenir ve çözelti çok kanallı pipet ile birkaç kez çok iyi bir şekilde karıştırılır. DNA bağlama plakası C yeni bir 2 ml'lik toplama plakasının üzerine yerleştirilir. Bütün süspansiyon DNA bağlama plakası C'ye aktarılır. DNA bağlama plakası C, kapatma foliyosu ile kapatılır ve oda sıcaklığında bir dakika inkübe edilir. Bütün blok (DNA bağlama plakası C / 2 ml toplama plakası) birlikte alınarak santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 3700 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra bütün blok alınır, kapatma foliyosu atılır ve filtre edilen kısım lavaboya dökülür. DNA bağlama plakası C tekrar 2 ml toplama plakasının üzerine yerleştirilir.

4- DNA bağlama plakası C'nin ilk yıkanması

DNA bağlama plakası C'nin her bir kuyucuğuna 500 µl yıkama tamponu-1 eklenir. DNA bağlama plakası C kapatma foliyosu ile kapatılır. Bütün blok (DNA bağlama plakası C / 2 ml toplama plakası) santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 3700 rpm'de 10 dakika* santrifüj edilir. Filtrasyon lavaboya dökülür ve DNA bağlama plakası C tekrar 2 ml toplama plakasının üzerine yerleştirilir.

5- DNA bağlama plakası C'nin ikinci yıkanması

DNA bağlama plakası C'nin her bir kuyucuğuna 700 µl yıkama tamponu-2 eklenir. DNA bağlama plakası C kapatma foliyosu ile kapatılır. Bütün blok (DNA bağlama plakası C / 2 ml toplama plakası) santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 3700 rpm'de 10 dakika* santrifüj edilir. Filtre edilen kısım

lavaboya dökülür ve DNA bağlama plakası C tekrar 2 ml toplama plakasının üzerine yerleştirilir. Bu yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanır.

6- Etanol'ün uzaklaştırılması

Bütün blok santrifüjden alınır ve kapatma folyosu atılır. DNA bağlama plakası temiz bir kurutma kağıdının üzerine konur, 2 ml toplama plakasında bulunan filtrasyon lavaboya boşaltılır ve toplama plakasının üst kısmı kurutma kağıdı ile kurutulur. DNA bağlama plakası C, 2 ml toplama plakasının üzerine yerleştirilir ve kapatma folyosu ile kapatılır. Bütün blok (DNA bağlama plakası C / 2 ml toplama plakası) santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 3700 rpm'de 25 dakika** santrifüj edilir. Blok santrifüjden alınır, kapatma folyosu atılır ve plaka temiz bir kurutma kağıdının üzerine konur. 2 ml toplama plakası çöp kutusuna atılır.

7- Genomik DNA'nın ayrıştırılması

DNA bağlama plakası C, 1 ml toplama plakasının üzerine yerleştirilir. Membranın üzerine doğrudan 60 µl ayrıştırma tamponu eklenir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. DNA bağlama plakası C, kapatma folyosu ile kapatılır ve bütün blok (DNA bağlama plakası C / 1 ml toplama plakası) santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 3700 rpm'de 10 dakika* santrifüj edilir. Santrifüj bittikten sonra bütün blok alınır ve membranın her bir kuyucuğuna tekrar 60 µl ayrıştırma tamponu eklenir. DNA bağlama plakası C, kapatma folyosu ile kapatılır ve bütün blok (DNA bağlama plakası C / 1 ml toplama plakası) santrifüjün rotor yuvasına yerleştirilir. Oda sıcaklığında 3700 rpm'de 10 dakika* santrifüj edilir.

Çapraz kontaminasyonları (cross-contaminations) önlemek için bütün blok santrifüjden çok dikkatli bir şekilde alınır. DNA bağlama plakası C dikkatli bir şekilde alınarak çöpe atılır. İçerisinde örnek DNA'larının bulunduğu 1 ml toplama plakası alınır ve üzeri kapatma folyosu ile kapatılarak analizlerde kullanılıncaya kadar -20 °C'de ve/veya -80 °C'de muhafaza edilir.

Not: Ayırıştırma tamponunun kullanılmadan önce ısıtılması (80 °C'ye kadar) ayırıştırma sonucunda elde edilecek ürün miktarını arttırmaktadır. Bu tez çalışmasında da izolasyon sırasında ayırıştırma tamponu önce ısıtılmış, sonra kullanılmıştır.

*DNA izolasyon kılavuzunda 4000 rpm'de 5 dakika olarak belirtilmektedir.

**DNA izolasyon kılavuzunda 4000 rpm'de 15 dakika olarak belirtilmektedir.

EK-4: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

1- Tris-Borat-EDTA (10X)

Trizma baz : 108.0 gr
Borik asit : 55.0 gr
EDTA (0.5 M, pH: 8): 40.0 ml
dH₂O : 1 litre içinde çözülür ve + 4 °C’de stoklanır.

2- Agaroz jel (%1’lik)

Boyut	Örnek sayısı	Agaroz (gr)	1X TBE (ml)	EtBr (µl)
Küçük	30	0.4-0.5	40-50	1.2
Orta	60	0.8	80	2.4
Büyük	120	1	100	3

3- Yükleme boyası (Loading dye)

Bromfenol mavisi : 0.1 gr
EDTA : 1.211 gr
Sukroz : 40 gr
ddH₂O : 100 ml

ddH₂O otoklav veya filtre sterilizasyonu ile steril edilir, hazırlanan bromfenol çözeltisi 1.5-2 ml’lik tüplere paylaştırılıp + 4-8 °C arasında muhafaza edilir.

4- Yükleme solüsyonu

EDTA (0.5 M, pH:8) : 2 ml
Formamid : 98 ml
Bromfenol mavisi : 0.06 gr
Ksilen siyanol : 0.06 gr

Li-Cor 4300 DNA Analyzer’da kullanılan belirteç floresan boyalı olduğu için Li-Cor’da analiz edilecek örnekler için formamid, ksilen siyanol kullanılmadan hazırlanır. Hazırlanan çözelti 1.5-2 ml’lik tüplere paylaştırılıp -20 °C’de muhafaza edilir.

5- Akrilamid Jel

Jel stok solüsyonu*	: 25 ml
TEMED**	: 15 µl
APS (%10)***	: 150 µl

*Jel stok solüsyonu

Akrilamid	: 36.0 ml
Urea	: 100.8 gr
TBE (10X)	: 24.0 ml
ddH ₂ O	: 250 ml

Çözelti hazırlandıktan sonra filtre sterilizasyonu yapılır ve + 4 °C'de muhafaza edilir.

**TEMED : N, N, N, N-Tetrametiletillen-diamin

***APS : Amonyum peroksit disulfat

EK-5: İstatistiksel hesaplamalara ait bilgiler ve ilgili formüller

Goldstein (1995)'in D_{sh}^2 değeri ve Nei (1987)'nin tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı

Populasyon içindeki bireyler arasındaki genetik uzaklık basamaklı mutasyon modeline göre hesaplandı. Bu modelde, kloroplast genomu tek bir lokus olarak alınıp Goldstein vd (1995)'in D_{sh}^2 değeri hesaplanır. İki birey arasındaki genetik uzaklık aşağıdaki şekilde bulunur.

$$D_{sh}^2(i, j) = K^{-1} \left[\sum_{k=1}^K |a_{ik} - a_{jk}| \right]^2$$

Formülde bulunan a_{ik} ve a_{ij} terimleri i ve j bireylerinin k lokusunda sahip oldukları allellerin büyüklüğünü göstermektedir (Goldstein vd 1995). Formüldeki K terimi ise çalışılan lokus sayısını ifade etmektedir. Örneğin, bu tez çalışmasında altı primer için mikrosatellit bölgelerine bakıldığı için $K=6$ olarak alınmaktadır.

Populasyonların genetik çeşitliliğini ortaya koymak için Nei (1987)'nin tarafsız haplotip çeşitlilik (unbiased haplotypic diversity) katsayısı aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$H_e = n(n-1)^{-1} (1 - \sum p_i^2)$$

Formülde p_i değeri i haplotipinin populasyon içindeki frekansını ve n ise örnek sayısını belirtmektedir.

Wright (1965)'in F-İstatistiği

Populasyonlarda gözlenen genotip frekanslarında ve heterozigotluk düzeyinde, Hardy-Weinberg şartlarında beklenen değerden sapma olup olmadığını belirlemek için yapılan bir istatistiksel işlemdir ve aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

$$F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$$

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Burada H_I bir popülasyonda gözlenen bireylerin heterozigotluk düzeyidir.

$$H_I = \Sigma H_{Oj} / n \quad H_{Oj} = J. \text{ popülasyonun gözlenen-heterozigotluk düzeyi}$$

n = popülasyon sayısı

H_S bir popülasyonda Hardy-Weinberg şartlarında bireylerin beklenen heterozigotluk düzeyidir.

$$H_S = \Sigma H_{ej} / n \quad H_{ej} = J. \text{ popülasyonun beklenen-heterozigotluk düzeyi}$$

n = popülasyon sayısı

H_T Hardy-Weinberg şartlarında beklenen toplam heterozigotluk düzeyidir.

$$H_T = 1 - \Sigma (X_{ia})^2 \quad X_{ia} = \text{Bütün popülasyonlar göz önüne alındığında i. allelin ortalama frekansıdır.}$$

Slatkin (1995)'in R_{ST} değeri

Mikrosatellit bölgeleri basamaklı mutasyon modeline göre mutasyona uğradıklarından dolayı, Slatkin (1995) bu modeli temel alarak Wright (1965)'in F_{ST} değerinin analoğu olan R_{ST} değerini aşağıdaki şekilde belirtmiştir:

$$R_{ST} = (S - S_w) / S$$

S = Allel çiftleri arasındaki allel büyüklüğü farklılığının kareler ortalaması

S_w = Her bir popülasyondaki allel büyüklüğü farklılığının kareler toplamının ortalaması.

F_{ST} değeri ile R_{ST} değeri karşılaştırıldığında, Wright (1965)'in F-istatistiğinin allel frekanslarındaki varyasyonu kullandığı, Slatkin (1995)'in R_{ST} değerinin ise allel

büyükluğündeki varyasyondan hesaplandığı görülmektedir. Böylece, Slatkin (1995)'in kullandığı modelde, mikrosatellit bölgeleri için basamaklı mutasyon modeli göz önüne alınmakta, Wright (1965)'in F-istatistiğinde ise mikrosatellit bölgeleri arasındaki mutasyon göz önünde bulundurulmamaktadır (Slatkin 1995).

Q_{ST} ve F_{ST} değerlerinin karşılaştırılması

Adaptif karakterler bir ve/veya iki allelli lokus tarafından kontrol edildiğinde ve seleksiyon tarafından etkilenmediğinde, adaptif karakterleri ve bu karakterleri kontrol eden lokusların farklılığını karşılaştırmak gerçekçi olmayan basit bir durumdur (Kremer vd 2000). İki allelli (L^a ve L^b) bir lokus tarafından kontrol edilen bir adaptif karakterde, L^a allelinin çeşitliliği Weir (1990)'ın ANOVA modeline göre şu şekilde gösterilir:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + Z_{ij} + G_{ijk} \quad (1)$$

Y_{ijk} = i. popülasyonda bulunan j. bireydeki k. allele ait gözlem

P_i, Z_{ij} ve G_{ijk} sırasıyla, popülasyon, popülasyon içindeki birey (zigot) ve bireyde bulunan gen bölgesine karşılık gelmektedir. Eğer Y_{ijk} değeri 1 ise, k alleli sadece L^a allelini, Y_{ijk} değeri 0 (sıfır) ise L^b allelini belirtmektedir. Bununla birlikte, L^a allelinin F_{ST} değeri şu şekilde hesaplanır:

$$F_{ST} = V_{PI} / (V_{PI} + V_{ZI} + V_{GI}) \quad (2)$$

Benzer şekilde, adaptif karakterin genotipik değeri allellerin etkilerine bölünerek gösterilebilir. Adaptif karakterleri kontrol eden lokusların genotipik değerinin X_{ijk} olduğu varsayılırsa (i: popülasyon, j: birey, k: allel), aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

$$X_{ijk} = \mu + P_i + Z_{ij} + G_{ijk} \quad (3)$$

P_i, Z_{ij} ve G_{ijk} bileşenleri gen bölgelerinin etkilerini belirtmelerinin yanı sıra, (1) no'lu formüldeki P_i, Z_i ve G_{ijk} bileşenleri ile benzer etkilere sahiptirler. Örneğin, G_{ijk}

bileşeni k . allelin j . bireydeki eklemeli gen etkisini belirtmektedir. Allel frekanslarında olduğu gibi, adaptif karakterlerin farklılığı F_{stq} ve/veya Q_{st} olarak gösterilebilir. Bu değer aşağıdaki şekilde ifade edilebilir:

$$F_{stq} = Q_{st} = V_{Pt} / (V_{Pt} + V_{Zt} + V_{Gt}) \quad (4)$$

Bununla birlikte, adaptif karakterler elektroforetik olarak analiz edilen belirteç lokusları gibi gametik düzeyde ölçülemezler. Fenotipik karakterler için sadece zigotik değer ($X_{ij} = X_{ij1} + X_{ij2}$) ölçülebilir. Bu değer, diploid bir bireyde bulunan iki allelin etkisini içermektedir. Gen bölgelerinin eklemeli etkisi göz önünde bulundurulursa, formül aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir:

$$X_{ij} = m + P_i + Z_{ij} + A_{ij} \quad (5)$$

$$P_i = 2P_{ti} \text{ ve } V_{Pt} = V_P / 4 \quad (6)$$

$$Z_{ij} = 2Z_{tij} \text{ ve } V_{Zt} = V_Z / 4 \quad (7)$$

$$A_{ij} = G_{tij1} + G_{tij2} \text{ ve } V_{Gt} = V_A / 2 \quad (8)$$

A_{ij} , ij lokusunda bireyin eklemeli etkisini, P_i populasyon değerini ve Z_{ij} zigotik değeri belirtmektedir. V_A eklemeli varyansı ifade etmektedir. Yukarıda verilen (4), (6), (7) ve (8) no'lu eşitliklerin kullanılması ile Q_{st} değeri aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$Q_{st} = V_P / (V_P + V_Z + 2V_A) \quad (9)$$

Her bir populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu varsayılırsa, Q_{st} aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$Q_{st} = V_P / (V_P + 2V_A) \quad (10)$$

Farklı populasyonların tek bir ortak atadan köken aldıkları göz önünde bulundurulursa, (5) no'lu formüldeki bireylerin genetik değerleri arasındaki kovaryans hesaplanabilir. Bireyler arasındaki olası durumlar, ortak ata parametrelerinin doğrusal

bir fonksiyonu ve bütün popülasyondaki fenotipik varyans bileşenlerinden kaynaklanabilmektedir. Toplam atasal popülasyonun eklemeli varyans değeri V_a olarak alınır, olası kovaryans değerleri aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$\begin{aligned} \text{Cov}(X_{ij}, X_{ij'}) &= V_P \\ \text{Cov}(X_{ij}, X_{ij'}) &= 2F_{st} V_a \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} V(X_{ij}) &= V_P + V_A \\ V(X_{ij}) &= (1 + F_{it}) V_a \end{aligned} \quad (12)$$

F_{st} ve F_{it} adaptif karakterleri kontrol eden lokuslardaki F-istatistiği değerleridir. Ayrıca, yukarıdaki durumda ortak ata katsayısını ifade etmektedirler. Yukarıda verilen eşitliklerden yola çıkılarak adaptif karakterler için farklılık aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$Q_{st} = F_{st} / (1 + F_{it} - F_{st}) \quad (13)$$

Popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu varsayılırsa, $F_{it} = F_{st}$ olacaktır. Bu durumda:

$$Q_{st} = F_{st}$$

Basit bir şekilde yukarıdaki eşitlikleri açıklarsak; sadece eklemeli etkilerin olduğu çift allelli nötral bir lokusta, popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olma koşulu ile beklenen Q_{st} değeri F_{st} değerine eşittir (Kremer vd 2000).

Populasyon çiftleri arasındaki Jaccard benzerlik katsayılarının hesaplanması

Populasyon çiftleri arasındaki Jaccard benzerlik katsayılarının nasıl hesaplandığı aşağıda çalışılan populasyonlardan iki tanesi (B ve D) ele alınarak, ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Populasyon çiftleri arasındaki Jaccard benzerlik katsayısının hesaplanması

Populasyonlar →		Doyran (D)	
↓		1 (var)	0 (yok)
Bük (B)	1 (var)	a = 13	b = 8
	0 (yok)	c = 10	d = 29

Burada:

a= Hem D hem de B populasyonunda bulunan (var olan) haplotip sayısı,

b= B’de var olup D’de bulunmayan haplotip sayısı,

c= B’de bulunmayıp D’de var olan haplotip sayısı,

d= Her iki populasyonda bulunmayıp çalışılan diğer populasyonlarda bulunan haplotip sayısıdır.

Bu değerlere dayanarak Jaccard benzerlik katsayısı (S_j) şu şekilde hesaplanır.

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

Burada, $a+b+c$ = karşılaştırılması yapılan iki populasyonda bulunan toplam haplotip sayısıdır. Kuramsal olarak bu eşitlikte $0.0 \leq S_j \leq 1.0$ ’dır. Buna göre, $a = 0$ olduğunda $S_j = 0.0$ olur. Ayrıca, $b+c=0$ olduğunda ise $S_j = 1.0$ ’dir. Sahip oldukları haplotip çeşidi ve sayısı bakımından, iki populasyon birbirine ne kadar benzer olursa, S_j değeri 1.00 değerine o kadar yakın olur. İki populasyonun ortak haplotip sayısı azaldıkça, benzerlik katsayısı (S_j) 0.00 değerine yaklaşır. Bu katsayıya göre, aynı populasyonun kendisi ile olan benzerlik değeri doğal olarak $S_j = 1.00$ olur (Sneath ve Sokal 1973, Işık vd 2005).

Eşitlik, yukarıdaki örnekteki B ve D populasyonları için uygulanırsa:

$$S_j = \frac{a}{a + b + c} = \frac{13}{31} = 0.419 \text{ bulunur.}$$

Yukarıda belirtilen hesaplama yöntemi izlenerek, diğer populasyon çiftleri arasındaki Jaccard benzerlik katsayıları bulunur. Elde edilen Jaccard katsayılarından fenogramın ortaya çıkarılabilmesi için UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) yöntemi kullanılmıştır (Sneath ve Sokal 1973). UPGMA yönteminin uygulanabilmesi ve ilgili fenogramın çizilebilmesi için gerekli olan işlemler, aşağıda adım adım açıklanmıştır. Açıklamalar, Çizelge 3.12'deki örnek veriler kullanılarak sürdürülmüştür.

(a) İlk aşamada Jaccard benzerlik katsayısı (JBK) matrisi oluşturulur (Bkz. Çizelge 3.12).

(b) JBK matrisinde, birbirine en çok benzeyen (en büyük S_j değerine sahip olan) iki populasyon (B ve D) ele alınır ve bu ikisi bir kümeye (BD kümesine) dâhil edilir.

(c) Tek bir kümeye giren bu iki populasyon, artık tek bir populasyonmuş gibi (yani, BD) kabul edilerek ikinci bir JBK matrisi oluşturulur. İkinci matris oluşturulurken, şunlara dikkat edilir: BD kümesinin, başka bir populasyon ile (örneğin M populasyonu ile) yaptığı S_j değerini bulmak için, ilk JBK matrisindeki 'MB' ve 'MD'nın S_j değerleri toplanıp ikiye bölünür (yani, MB ve MD'nın S_j değerlerinin aritmetik ortalamaları alınır). Örnek verilirse: $S_{jM(BD)} = \frac{1}{2} (0.343 + 0.370) = 0.357$.

Böylece M populasyonu ile BD kümesinin yeni S_j değeri elde edilir. Benzer şekilde $S_{jS(BD)}$, $S_{jK(BD)}$ ve $S_{jH(BD)}$ değerleri hesap edilip, elde edilen değerler ikinci matrise yerleştirilir.

(d) Üçüncü JBK matrisini elde etmek için yukarıdaki (a), (b) ve (c) maddelerindeki işlemler tekrar edilir. En son kümeyi temsil eden JBK matrisi elde edilene kadar bu işlemlere devam edilir (Işık vd 2005).

EK-6: Tanımlamalar

Epistasi	Bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında görülen baskılayıcı etkiler durumudur.
Gen havuzu	Bir popülasyondaki fertlerin taşıdığı bütün genlerin (kalıtsal materyalin) hepsinin birden ortaya konulmasıyla ve karıştırılmasıyla oluştuğu varsayılan teorik bir kavramdır.
Genetik sürüklenme	Bir popülasyonda iki ya da daha çok allel veya genotipin sıklıklarında meydana gelen rasgele değişimler.
Haplotip	Rekombine olmayan kloroplast genomundaki her bir allelin kombinasyonu sonucu oluşan yapı.
İzoenzim	Bir enzimin aynı katalitik aktiviteye sahip farklı formları.
Junk (hurda) DNA	Bir proteindeki amino asit dizisine karşılık gelen bilgi içermeyen DNA veya kodlamayan DNA.
Kantitatif karakter	Boy, kilo, tane ağırlığı vb. ölçülebilen ve en düşük değerden en yüksek değere doğru değişen karakterlerdir. Bu karakterler çoğunlukla normal dağılım eğrisi gösterir.
Meşcere	Ağaç yaşı, ağaç türü, ağaç türü kompozisyonu, büyüme ve kuruluş şekli, bunların hepsi veya bir kısmı ile kendisini çevresinden açık olarak ayıran ve en az bir hektar büyüklüğünde olan orman parçasıdır.
Mikrosatellit	Mikrosatellitler 1-6 nükleotidden oluşan tekrarlı DNA dizileridir ve genomda homojen olarak dağılmışlardır.

Monomorfik lokus	Bir popülasyondaki tüm bireylerin bir lokustaki allel ve/veya alleller bakımından aynı genotipe sahip olma durumu.
Nötral belirteç	Doğal seleksiyonun etkisinin görülmediği genetik markır.
Ortak Bahçe Deneme Alanı	Bir türün farklı orijin ve/veya coğrafik bölgelerden getirilen popülasyonlarının fidanları ile kurulan, popülasyonlar arasındaki benzerlik ve/veya farklılıkların belirlenmesi için kurulan özel alan.
Plus Ağaç	Fenotipik (boy, gövde düzgünlüğü, dal açıları vb.) özelliklerine dayanılarak seçilen üstün nitelikli ağaçlardır.
Polimorfik lokus	Bir popülasyondaki bireylerin bir lokustaki alleller bakımından farklı genotiplere sahip olma durumu.
Polimorfizm	Popülasyonda bir karakterin birden fazla alternatifinin bulunması durumu.
Popülasyon	Aralarında nesilden nesile gen alışverişi olabilen, aynı türden olup aynı gen havuzunu paylaşan, belirli bir orijinde yer alan ve bir ya da birden fazla meşcereden meydana gelen fertler topluluğudur.
Primer	Doğal ve/veya sentetik olarak sentezlenebilen kısa (genellikle 5 – 30 baz çifti), tek iplikli nükleotit dizisi.

ÖZGEÇMİŞ

Yusuf KURT 1981 yılında Şanlıurfa'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şanlıurfa'da tamamladı. Lisans öğrenimi için 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne girdi. Lisans öğrenimi sırasında Eylül 2001 - Haziran 2003 yılları arasında TÜBİTAK bursu (Üniversite Temel Bilimler Burs Programı-B) aldı. Aynı bölümden 2003 yılında Bölüm ve Fakülte Birincisi olarak mezun oldu. Eylül 2003'de Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı. Mayıs 2005'de yüksek lisansını (M. Sc.) tamamlayarak aynı yılın Eylül ayında doktora eğitimine başladı. Ekim 2005'de Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Doktora çalışmaları sırasında Yabancı Hükümetlerin Hükümetimiz emrine verdikleri burslardan Norveç Araştırma Konseyi'nin verdiği bursu kazandı. Bu burs kapsamında 2006 yılında üç ay (Ağustos – Kasım) Norveç Bilim ve Teknik Üniversitesinde (Trondheim, Norveç) bilimsel çalışmalarda bulundu. Ayrıca, doktora çalışmaları sırasında TÜBİTAK Yurtiçi – Yurtdışı Bütünleştirilmiş Doktora Burs Programı kapsamında Aralık 2008 – Aralık 2009 (bir yıl) tarihleri arasında Madrid Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü'nde (Unidad de Genetica Forestal, CIFOR-INIA, Madrid-SPAIN) doktora tezi ile ilgili bilimsel çalışmalarda bulundu. Doktora çalışmaları devam ettiği sürede, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.