

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

**KLOROPLAST SSR (cpSSR) BELİRTEÇLERİ YARDIMIYLA KIZILÇAMIN
(*Pinus brutia* TEN.) GÜNDOĞMUŞ-ESKİBAĞ (AKÇAGEDİK-TESPİHLİ)
ORİJİNLİ 38 NO'LU KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE POLEN
KİRLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

B. Banu BİLGİN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2012

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

**KLOROPLAST SSR (cpSSR) BELİRTEÇLERİ YARDIMIYLA KIZILÇAMIN
(*Pinus brutia* TEN.) GÜNDOĞMUŞ-ESKİBAĞ (AKÇAGEDİK-TESPIHLİ)
ORJİNLI 38 NO'LU KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE POLEN
KİRLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

B. Banu BİLGİN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2012

**KLOROPLAST SSR (cpSSR) BELİRTEÇLERİ YARDIMIYLA KIZILÇAMIN
(*Pinus brutia* TEN.) GÜNDOĞMUŞ-ESKİBAĞ (AKÇAGEDİK-TESPIHLİ)
ORİJİNLİ 38 NO'LU KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE POLEN
KİRLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

B. Banu BİLGİN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez, 2008.03.0121.005 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLOROPLAST SSR (cpSSR) BELİRTEÇLERİ YARDIMIYLA KIZILÇAMIN
(*Pinus brutia* TEN.) GÜNDOĞMUŞ-ESKİBAĞ (AKÇAGEDİK-TESPIHLİ)
ORİJİNLİ 38 NO'LU KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE POLEN
KİRLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

B. Banu BİLGİN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 27/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği /~~oy çokluğu~~ ile kabul / ~~red~~ edilmiştir.

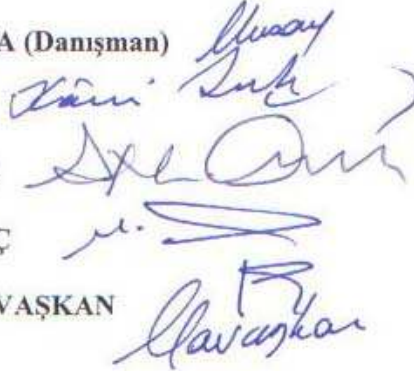
Doç. Dr. Nuray KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Kâni IŞIK

Prof. Dr. Naci ONUS

Prof. Dr. Musa GENÇ

Prof. Dr. Çiğdem SAVASKAN



ÖZET

KLOROPLAST SSR (cpSSR) BELİRTEÇLERİ YARDIMIYLA KIZILÇAMIN (*Pinus brutia* TEN.) GÜNDOĞMUŞ-ESKİBAĞ (AKÇAGEDİK-TESPIHLİ) ORİJİNLİ 38 NO'LU KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE POLEN KİRLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

B. Banu BİLGİN

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nuray KAYA

Haziran 2012, 125 sayfa

Kızılçam (*Pinus brutia* TEN.) ekolojik ve ekonomik değerinden dolayı Türkiye için önemli yerli bir orman ağacı türüdür. Ağaçlandırmalarda kullanılmak üzere genetik yönden üstün nitelikli tohum ve fidan elde etmek amacıyla tohum bahçeleri kurulmaktadır. Polen kirliliği *P. brutia* tohum bahçelerinde ciddi bir sorundur. Polen kirliliği düzeyini tahmin etmenin en etkin ve kullanışlı yollarından biri mikrosatellitler veya basit tekrarlı nükleotid dizileri (SSR) adı verilen genetik belirteçleri kullanmaktır. Şimdiye kadar polen kirliliği düzeyi ülkemizde sadece tek bir tohum bahçesinde (Kızılçamın Çameli-Göldağı orijinli Asar-Antalya klonal tohum bahçesinde) tahmin edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, Çıglık-Antalya'da kurulmuş bulunan 16 yaşındaki bir *P. brutia* klonal tohum bahçesine tohum bahçesi dışından gelen polen kontaminasyonu (kirliliği) oranını kloroplast mikrosatellit belirteçleri (cpSSR) yardımıyla tahmin etmektir. cpSSR analizleri, tohum bahçesinden toplanan tohumların megagametofit ve embriyo dokusunda, tohum bahçesine yakın doğal kızılçam popülasyonundan toplanan tohumların ise megagametofit dokusu veya ibrelerinde gerçekleştirildi. Analizler altı kloroplast mikrosatellit lokusunda (Pt1254, Pt30204, Pt41093, Pt87268, Pt15169 ve Pt71936) yapıldı.

Altı kloroplast SSR lokusundan, Pt41093 lokusu monomorfik, diğer lokuslar ise (Pt1254, Pt30204, Pt87268, Pt15169 ve Pt71936) polimorfik olarak saptandı. Analiz edilen örneklerde altı primer (lokus) için 23 allel bulundu. Kloroplast mikrosatellit allellerinin 36 farklı haplotip oluşturduğu gözlemlendi. Çalışılan altı kloroplast mikrosatellit bölgesinin sahip olduğu farklı büyüklükteki allellerin kombinasyonları sonucu elde edilen haplotiplere göre 38 no'lu kızılçam tohum bahçesine ait 30 klonun genetik kimlikleri belirlendi. Tohum bahçesindeki 30 klonda toplam 12 çeşit haplotip gözlemlendi. Tohum bahçesindeki 30 klondan rastgele seçilen beş klona ait beşer ramet incelendiğinde, bu beş klona ait rametlerin ait oldukları sanılan klonlara ait olmadıkları tespit edildi. Tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda 36 ve doğal popülasyona ait bireylerde 19 çeşit haplotip gözlemlendi.

Tohum bahçesindeki 300 embriyoda yapılan analizler sonucunda 87 embriyonun tohum bahçesi dışından gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuğu yani 87 gametin kontaminant olduğu belirlendi. Buna göre tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda kontaminantların (kirliliğin) gözlenen oranı (b) 0.29 olarak bulundu. Bu değer, polen kirliliğinin minimum tahminidir. Tohum bahçesinde tahmin edilen gerçek polen kontaminasyonu (m) ise 0.393 (%39.3) olarak hesaplandı. Polen kontaminasyonunun bu düzeyde olması sonucunda tohum bahçesi tohumlarından sağlanacak genetik kazancın (beklenen genetik kazanç) %20 oranında azalacağı belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: *Pinus brutia*, polen kirliliği, tohum bahçesi, gen göçü, kloroplast mikrosatellit belirteçleri

Jüri: Doç. Dr. Nuray KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Kni IşIK

Prof. Dr. Naci ONUS

Prof. Dr. Musa GENÇ

Prof. Dr. Çiğdem SAVAşKAN

ABSTRACT

DETERMINATION OF POLLEN CONTAMINATION IN A CLONAL SEED ORCHARD OF *Pinus brutia* TEN. IN ANTALYA WITH CHLOROPLAST SSR (cpSSR) MARKERS

B. Banu BILGEN

Ph. D. Thesis in Biology

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Nuray KAYA

June 2012, 125 Pages

Turkish red pine (*Pinus brutia* TEN.), because of its ecological and economic value, is one of the most important native forest tree species in Turkey. Seed orchards are established in order to obtain genetically high quality seeds and seedlings for reforestation and afforestation purposes. Pollen contamination is a serious problem in *Pinus brutia* seed orchards. Microsatellites, also known as simple sequence repeats (SSRs), are one of the most effective and useful ways of estimate pollen contamination level. So far, pollen contamination level has been estimated in only one seed orchard (*P. brutia* seed orchard in Asar-Antalya) in Turkey. The aim of this study is to estimate pollen contamination level in a 16 year-old *P. brutia* clonal seed orchard, located in Çıglık, Antalya, with the help of chloroplast microsatellite markers (cpSSRs). Microsatellite analysis was performed on both maternal and embryo tissues of seeds collected from Turkish red pine seed orchard and megagametophyte tissues of seeds or needles collected from close natural *P. brutia* population. Six cpSSR loci (Pt1254, Pt30204, Pt41093, Pt87268, Pt15169 and Pt71936) were analyzed.

Six chloroplast SSR loci were analyzed. All, except Pt41093, were found to be polymorphic. A total of 23 alleles were determined for the analyzed six loci. The chloroplast microsatellite alleles were combined in 36 different haplotypes. According to haplotypes, that will be composed of the combination of alleles found at each cpSSR locus, genetic identity of each of the 30 clones in *P. brutia* seed orchard were determined. Twelve different haplotypes were observed in clones of the seed orchard. Studied ramets of randomly selected five clones in the seed orchard were not belong to the clones that they are supposed to be. Thirty-six different haplotypes were observed in embryos that are produced by the seed orchard clones, they were whereas 19 in natural Turkish red pine population.

Eighty-seven embryos among the 300 analyzed had no compatible male parent within the seed orchard and their real male parents were considered to be located outside the seed orchard. Observed contamination (b) from external pollen sources was estimated as 0.29. This is minimum estimation of pollen contamination. Microsatellite-

based paternity analysis revealed that the contamination rate (m) is 0.393 (39.3%). This level of pollen contamination is expected to reduce predicted genetic gain in the seed orchard crop by 20%.

KEY WORDS: *Pinus brutia*, pollen contamination, seed orchard, gene flow, chloroplast microsatellite markers

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Nuray KAYA (Adviser)

Prof. Dr. Kâni IŞIK

Prof. Dr. Naci ONUS

Prof. Dr. Musa GENÇ

Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN

ÖNSÖZ

Dünyada ve Türkiye'de nüfus hızla artmakta, sanayi gelişmekte, yerleşim alanları genişlemekte ve hayat standardı gittikçe yükselmektedir. Bunlara paralel olarak orman alanlarının topluma sunduğu ekolojik hizmetlere ve odun hammaddesine olan talep de hızla artmaktadır. Kızılçam, Türkiye’de yayılış gösteren beş çam türünden (*Pinus brutia*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus pinea* ve *Pinus halepensis*) biridir. Bu hizmetleri sunan yerli orman ağacı türlerinden biri olan kızılçam, ekolojik ve ekonomik değerinden dolayı Türkiye için önemli bir orman ağacı türüdür. Bu nedenle, “Türkiye Milli Ağaç Islahı ve Tohum Üretimi Programı (1994-2003)” kapsamında öncelik verilen türlerin başında gelir. Türkiye’de Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinin kıyıya bakan yamaçlarında, nadiren de Batı Karadeniz bölgesinin Akdeniz iklimi görülen bazı kıyılarında doğal yayılış gösteren kızılçam odunu; kağıt endüstrisi, inşaat malzemesi, tarım aletleri, deniz taşıtlarının yapımı gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tohum bahçeleri, yeni kurulan ormanların genetik yapısını istenilen yönde değiştirmede ve doğadaki popülasyonları amacımıza göre evcilleştirmede büyük öneme sahiptir. Çünkü tohum bahçeleri ormancılık ve ağaçlandırma çalışmaları için gerekli olan, yeterli miktarda ve kaliteli tohum toplanmasını güvence altına alan tohum kaynaklarıdır. Tohum bahçelerinin amacına uygun yönde işletilebilmesi için birçok konuda yeni bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından ülkemizin değişik bölgelerinde, değişik orman ağaçları için 2010 yılına kadar 172 adet tohum bahçesi kurulmuştur. Bu 172 adet tohum bahçesinden 68 adeti kızılçam türüne aittir. Antalya’da yalnızca kızılçam türüne ait 12 adet tohum bahçesi bulunmaktadır. Tohum bahçesi dışındaki ağaçlardan gelip tohum bahçesindeki seçkin klonları dölleyen polenlerin oluşturduğu polen kontaminasyonu veya polen kirliliği, tohum bahçesinde istenmeyen genotipte tohumların oluşmasına ve bu tohumlarla kurulan ormanların genetik bakımdan düşük kaliteli olmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada, Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespikli) orijinli olan ve Antalya-Çıglık köyü yakınında kurulmuş olan 38 no’lu kızılçam klonal tohum bahçesinde polen kontaminasyonu oranını tahmin etmek amaçlanmıştır. Bu çalışmanın, kızılçamın

genetik ıslahı ve gen kaynaklarının korunması konusunda halen yapılan ve yapılması planlanan çalışmalara, ayrıca kızılçam ile yapılacak ağaçlandırma çalışmalarına yararlı olmasını ve benzer yöndeki diğer araştırmalara ışık tutmasını dilerim.

Bu tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesinde ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum, değerli hocam ve Akademik Danışmanım Doç. Dr. Nuray KAYA'ya (Ak. Ün., Fen Fak., Biyoloji Bölümü); tezin son şeklini almasında yapıcı eleştirileri ve önerileriyle değerli katkılarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. Kâni IŞIK (Ak. Ün., Fen Fak., Biyoloji Bölümü) ve Prof. Dr. Kenan TURGUT'a (Ak. Ün., Ziraat Fak., Tarla Bitkileri Bölümü), Tez Sınav Jüri Üyeleri Prof. Dr. A. Naci ONUS'a (Ak. Ün., Ziraat Fak., Bahçe Bitkileri Bölümü), Prof. Dr. Musa GENÇ'e (Süleyman Demirel Üni., Orman Fak., Orman Mühendisliği Bölümü) ve Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN'a (Süleyman Demirel Üni., Fen Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasının laboratuvar aşamaları sırasında yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM'a (Ak. Ün., Fen Fak., Biyoloji Bölümü), birbirimizin arazi ve laboratuvar çalışmalarına titizlikle yardım ederek, 'araştırmacı' olma niteliğinin bazı bölümlerini birbirimizden öğrendiğimiz, aynı dönem lisansüstü öğrenci arkadaşlarımdan Dr. Yusuf KURT'a (Ak. Ün., Fen Fak., Biyoloji Bölümü) ve Dr. Sezgi ŞEREF GÜN'e (Ak. Ün., Fen Fak., Biyoloji Bölümü), yine arazi çalışmaları sırasında örnek toplamada yardımlarını gördüğüm Öğr. Gör. İlker ÇİNBİLGEL'e (Ak. Ün., Akseki M.Y.O.) ve Dr. Eşref DEMİR'e (Ak. Ün., Fen Fak., Biyoloji Bölümü) çok teşekkür ederim. Ayrıca, bu tez projesini 2008.03.0121.005 proje numarası ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve çalışma süresince bölüm olanaklarını kullanmamı sağlayan Biyoloji Bölümü Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım. Son olarak araştırmanın başından sonuna kadar her türlü desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda bulunan sevgili aileme ve eşim Dr. Türker BİLGİN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kızılçam (<i>Pinus brutia</i> Ten.)’ın Sistematikteki Yeri, Doğal Yayılışı ve Ekonomik Önemi	3
1.2. Tohum Bahçesi Nedir?	5
1.3. Tohum Bahçelerine Neden İhtiyaç Duyulur?.....	6
1.4. Tohum Bahçelerinin Temel Özellikleri.....	9
1.5. Gen Akımı, Eşleşme Sistemi ve Polen Kirliliği (Kontaminasyonu).....	13
1.6. Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanımları	18
1.7. Çalışmanın Amacı	25
2. MATERYAL VE METOT	26
2.1. Tohum Bahçesinin Özellikleri.....	26
2.2. Analizler için Kozalak ve İbre Örneklerinin Toplanması	28
2.3. Kozalaklardan Tohumların Çıkarılması	30
2.4. İbre Örneklerinin Kurutulması ve Hazırlanması	32
2.5. DNA İzolasyonlarının Yapılması.....	33
2.6. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi	37
2.7. Kloroplast Mikrosatellit (cpSSR) Primerlerinin Belirlenmesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	39
2.8. Verilerin Değerlendirilme Yöntemleri	43
3. BULGULAR.....	47
3.1. Kloroplast Mikrosatellit (cpSSR) Primerlerine ait Allellerin ve Haplotiplerin Belirlenmesi.....	47
3.2. Tohum Bahçesinde Bulunan Klonların Genetik Kimliklerinin Tespiti.....	52

3.3. Tohum Bahçesindeki Klonlar (Rametler) Tarafından Üretilen Embriyoların Genetik Kimliklerinin Tespiti	56
3.4. Doğal Populasyona ait Ağaçların Genetik Kimliklerinin Tespiti	58
3.5. Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik	59
3.6. Tohum Bahçesinde Polen Kirliliğinin (Kontaminasyonunun) Tespiti.....	63
4. TARTIŞMA	67
4.1. Haplotip ve Allel Çeşitliliği	67
4.2. Klonların Genotipik Kimliklerinin Teşhisi	71
4.3. Tohum Bahçesinin ve Doğal Populasyonun Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi.....	74
4.4. Polen Kirliliği (Kontaminasyonu) Oranı	79
5. SONUÇ	86
6. KAYNAKLAR	93
7. EKLER.....	112
EK-1: Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespahli) orijinli 38 no’lu kızılçam tohum bahçesi krokisi-klonların ve klonlara ait rametlerin yerleşim planı....	112
EK-2: Kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışları	120
EK-3: Tanımlamalar	122
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Adenin
C	Sitozin
dk	Dakika
g	Gram
G	Guanin
ha	Hektar (10 000 m ²)
km	Kilometre
L	Litre
M	Molarite
m	Metre
m ³	Metreküp
mg	Miligram (10 ⁻³ g)
ml	Mililitre (10 ⁻³ Lt)
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶ Lt)
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ M)
µg	Mikrogram (10 ⁻⁶ g)
mm	Milimetre
mM	Milimolar (10 ⁻³ M)
n	Tekrar sayısı
ng	Nanogram (10 ⁻⁹ g)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
T	Timin
U	Ünite (enzim birimi)
Volt	Voltaj
%	Yüzde
°	Derece
°C	Santigrat derece
'	Dakika
"	Saniye

Kısaltmalar

AFLP	Arttırılmış fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
Ak. Ün.	Akdeniz Üniversitesi
AMOVA	Moleküler varyans analizi
b	Kontaminantların gözlenen oranı
bç	Baz çifti
Bkz.	Bakınız
cpSSR	Kloroplast basit dizi tekrarları
d	Bir yabancı polen taneciğinin belirlenebilir bir çok-lokuslu belirteci taşıma olasılığı
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksi ribonükleik asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
D.P	Doğal Populasyon
D ² _{sh}	Goldstein vd (1995)'in bireyler arasındaki genetik uzaklık değeri
E	Embriyo
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
f	Frekans
FAM	6-carboxyfluorescein
F _{ST}	Tüm populasyonların gametlerine oranla her bir populasyon içindeki rastgele gametler arasındaki korelasyon (Populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın derecesini gösterir).
G	Kontaminasyon olmadığında beklenen genetik kazanç değeri
G _a	Kontaminasyon olması halinde, beklenen genetik kazançtaki azalma
G _n	Net genetik kazanç değeri
GPS	Küresel konum belirleme cihazı
G _{ST}	Genetik farklılaşma katsayısı
HCl	Hidrojen Klorür
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluoro
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit

H _e	Nei'nin tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı
H _S	Populasyon-içi genetik çeşitlilik
H _T	Toplam genetik çeşitlilik
KAc	Potasyum asetat
I	Shannon sabiti
L	DNA Merdiveni (DNA Ladder)
m	Polen kontaminasyonu tahmini değeri
M	Megagametofit
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MS	Murashige ve Skoog besiyeri
M.Y.O.	Meslek Yüksek Okulu
N _a	Gözlenen allel sayısı
NaAc	Sodyum asetat
NaCl	Sodyum klorür
N _c	Etkili klon sayısı
N _e	Etkili allel sayısı
No	Numara
OATIAM	T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü
OGM	Orman Genel Müdürlüğü
P	Olasılık değeri
<i>P.</i>	<i>Pinus</i>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIC	Polimorfik bilgi içeriği
Primer F	Forward (ileri) primer
Primer R	Reverse (geri) primer
Pt	<i>Pinus thunbergii</i> Parl.
PVP	Polivinilpirolidon
<i>Q.</i>	<i>Quercus</i>
RAPD	Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)

RFLP	Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ribonükleik asit
s	Kendi-kendine döllenme oranı (Selfing)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SE ($\pm$)	Standart hata (Standart Error)
sp.	Species (Tür)
subsp.	Alttür
SMM	Basamaklı mutasyon modeli
SSRs	Basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats)
STR	Kısa bitişik tekrar (Short Tandem Repeat)
t	Kendinden-başka bireylerle döllenme oranı
Taq Poly.	<i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen ve yüksek sıcaklıklara (90-95 °C) dayanıklı DNA polimeraz enzimi
TBE	Tris-Borat-EDTA Tamponu
T.C.	Türkiye Cumhuriyeti
T _m	DNA'nın erime sıcaklığı
Var.	Varyete
vb.	Ve benzeri
vd	Ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kızılçamın doğal yayılış alanları	4
Şekil 2.1.	Kızılçam tohum bahçesinin kurulduğu alan (Çığlık) ve bahçedeki klonların getirildiği orijinin yeri (Gündoğmuş-Eskibağ)	27
Şekil 2.2.	Kızılçam tohum bahçesinin uydudan alınan görüntüsü	27
Şekil 2.3.	Doğal kızılçam populasyonunda ibre ve kozalak toplanması	29
Şekil 2.4.	Doğal kızılçam populasyonunda ibre toplanması ve etiketli torbalara konulması	29
Şekil 2.5.	Kozalakların etiketli file torbalar içinde güneşte kurutulması	30
Şekil 2.6.	Açılan kozalaklardan tohum çıkarılması	31
Şekil 2.7.	Çıkarılan tohumların kanatlarından temizlenmesi ve etiketli torbalara konulması	31
Şekil 2.8.	Silika jeli değiştirilmiş bir örnek (mavi silika jeli, solda) ile silika jelinin değiştirilme zamanı gelmiş olan bir örnek (pembe silika jeli, sağda)	32
Şekil 2.9.	Silika jel ile kurutulmuş (solda) ve sıvı azotla toz haline getirilmiş ibre örneği (sağda)	33
Şekil 2.10.	Yarı kuvvetli Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde çimlendirilen tohumlar	34
Şekil 2.11.	DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri	37
Şekil 2.12.	NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 ile miktar ve kalitesi ölçülmüş bir DNA örneği	38
Şekil 2.13.	DNA parça analizi sonuçlarının Peak Scanner Software v1.0 programı ile değerlendirilmesi	42
Şekil 3.1.	Çalışmada analiz edilen altı primerin (lokusun) her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan tüm örneklerdeki frekans dağılımları ...	48
Şekil 3.2.	Pt30204, Pt87268 ve Pt15169 no'lu primerlere ait allellerin Peak Scanner Software v1.0 programındaki görüntüsü	49
Şekil 3.3.	Çalışmada belirlenen haplotiplerin frekans dağılımları	50

Şekil 3.4.	Çalışmada belirlenen haplotiplerin tohum bahçesindeki klonlar (rametler), doğal populasyona ait ağaçlar ve tohum bahçesindeki klonlar (rametler) tarafından üretilen embriyolar arasındaki dağılımı	52
Şekil 3.5.	Çalışılan <i>P. brutia</i> klonal tohum bahçesindeki klonların haplotip kimliklerinin dağılımının şematik olarak gösterimi	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından ülkemizde tesis edilmiş tohum bahçeleri	9
Çizelge 2.1. Elde edilen DNA örneklerinin miktar ve kalite ölçüm sonuçları	38
Çizelge 2.2. Vendramin vd (1996) tarafından <i>Pinus thunbergii</i> genomundan geliştirilen cpSSR primerlerine ait bilgiler	40
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cpSSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları	41
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan cpSSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri	41
Çizelge 3.1. <i>P. brutia</i> tohum bahçesine (38 no'lu) ve tohum bahçesinin yakın çevresinde yer alan doğal popülasyona ait çalışılan örneklerde altı ayrı lokus (primer) için gözlenen 36 haplotip ve bu haplotiplerin baz çifti olarak sahip oldukları allel büyüklükleri	51
Çizelge 3.2. Tohum bahçesinden birer adet ramet olarak örneklenen 25 klona ait haplotip kimlikleri.....	54
Çizelge 3.3. Tohum bahçesinden beşer adet ramet olarak örneklenen 5 klona ait haplotip kimlikleri.....	54
Çizelge 3.4. Tohum bahçesindeki klonlara ait haplotiplerin frekansları	56
Çizelge 3.5. Tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolara ait haplotipler ve frekansları.....	57
Çizelge 3.6. Doğal popülasyona ait bireylerde gözlenen haplotipler ve frekansları.....	58
Çizelge 3.7. Tohum bahçesinin, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyoların ve doğal popülasyonun çalışılan lokuslar bakımından allel büyüklükleri ve frekansları	60
Çizelge 3.8. Tohum bahçesindeki klonlar, embriyolar ve doğal popülasyondaki bireylere ait genetik çeşitlilik parametreleri.....	61
Çizelge 3.9. Haplotip çeşitlilik parametreleri ve haplotipler arasındaki uzaklık	62
Çizelge 3.10. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları	63

Çizelge 3.11. Tohum bahçesindeki klonlara ait gözlenen kontaminant gamet sayısı ve kontaminant gametlerin haplotip kimlikleri	65
Çizelge 3.12. Antalya 38 no'lu kızılçam klonal tohum bahçesinde polen kirliliği (kontaminasyonu) parametreleri	66
Çizelge 4.1. Değişik orman ağacı türlerine ait populasyonlarda gerçek polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı (m) tahminleri	85

1. GİRİŞ

Rio de Janeiro’da 1992 yılında yapılan Birleşmiş Milletler Çevre ve Kalkınma Zirvesi’nde kabul edilen ve Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi’nde kullanılan biyolojik çeşitlilik tanımı şöyledir: "yaşayan organizmaların, o organizmaların yaşadıkları ekolojik ortamların ve o organizma ve ortamların desteklediği ekolojik süreçlerin çeşitliliğidir" (Anonim 1992). Biyolojik zenginlik, bir ülkede yayılış gösteren tüm bitki ve hayvan türlerini, özellikle tarımda, ormancılıkta, hayvancılıkta, tıpta, eczacılıkta ve sanayi alanında hem ekonomik hem de kullanım açısından çok önemli yere sahip türleri içerir. Fakat hızlı nüfus artışı, plansız kentleşme, sanayileşme, orman yangınları, hava kirliliği, tarım arazisi elde etme, küresel ısınma, erozyon, doğal kaynaklarımızın yanlış ve bilinçsiz kullanımı gibi nedenlerden dolayı canlı türlerinin yayılış alanları tehlikeye girmekte, gen havuzlarının yapısı değişmekte, evrimsel potansiyelleri kaybolmakta ve biyolojik zenginliklerimiz hızla tükenmektedir. Bunların sonucunda biyolojik çeşitliliğimiz zarar görmektedir. Biyolojik çeşitliliğin korunması, özellikle zengin biyoçeşitliliğe sahip orman ekosistemlerinin korunması, ekolojik, estetik ve ekonomik açıdan olduğu kadar, tehlike altındaki türlerin yok olmasının engellenmesi açısından da birincil önem taşımaktadır.

Ormanlarımız kendi kendini yenileyebilen biyolojik zenginliklerimizdendir. Orman ekosistemleri çok kısa mesafelerde değişiklik gösterebilen farklı doğa birimleridir. Türkiye’deki orman ekosistemlerinin bulunduğu dağlık bölgelerde özellikle iklim, toprak ve biyolojik kaynaklı çevre etmenleri kısa mesafelerde ve daha sık bir biçimde değişmektedir. Aynı türe ait ve komşu olan populasyonların içinde bulundukları farklı çevre etmenleri ve farklı seçim basıncından dolayı gen havuzları ve gen kombinasyonları birbirinden farklıdır. Bundan dolayı, kısa mesafelerde yaşayan birbirinden farklı uyum değerleri olan farklı ırklar ve alt ırklar meydana gelebilir. Bu kısa mesafelerde bulunan farklı ırklar veya alt ırkların varlığı yerli ve yabancı pek çok ağaç türünde sonuçlandırılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (Bradshaw 1972, Hamann vd 1998, Işık 1999a,b, Ohsawa ve Ide 2008).

Türkiye’de 2000-2009 yıllarını içine alan 10 yıllık sürede yaklaşık 110.000 hektar orman alanı yanarak yok olmuştur. Özellikle 2000 ve 2008 yıllarında (sırasıyla 26.353 ha ve 29.749 ha), yanan orman alanı en fazla düzeydedir. Ayrıca, Türkiye’de bu 10 yıllık dönemde toplam 20.908 adet orman yangını meydana gelmiştir (Anonim 2009). Orman yangınları sonucu zarar görmüş alanların yeniden ağaçlandırılması için kullanılacak türün seçimi önemlidir. Güney ve Batı Anadolu bölgelerimizde geniş alanların ağaçlandırılması amacıyla, kızılçam tohum ve/veya fidanları kullanılmaktadır. Yurdumuzda yıllık ortalama 42 bin hektar alan (yıllık toplam ağaçlandırma alanlarının %37’si) kızılçam ile ağaçlandırılmaktadır (Isik ve Kara 1997). Orman yangınları sonucu tahrip olan alanların yeniden ağaçlandırılması için ağaçlandırmalarda kullanılacak ağaç türüne ait populasyonların 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 ilgili canlı türünün genetik çeşitliliğinin araştırılması ve bilinmesi gerekir (Conkle 1980, Conkle vd 1988). Ormanların sürdürülebilir bir şekilde yönetilmesi gen seviyesinden ekosistem seviyesine kadar her basamakta yapılacak çalışmalarla mümkündür. Orman ağaçlarında verimliliği arttırmak için hızlı gelişen, biyotik ve abiyotik etkenlere karşı dirence sahip genotiplerin belirlenmesi ve ıslahı gerekmektedir. Genetik çeşitlilik genetik ıslah programlarının oluşturulması için temel kaynaktır. Islah çalışmalarının istenilen amaca ulaşması için yüksek genetik çeşitliliğe sahip olan türlerin belirlenmesi gerekmektedir. Yeni ormanların kurulmasında morfolojik verilere dayalı olarak veya moleküler düzeyde genetik çeşitliliği belirlenmiş doğal orman populasyonları, tohum meşcereleri, tohum plantasyonları ya da tohum bahçeleri kullanılmaktadır. Ağaçlandırma için tohum kaynağı çok önemlidir. Ağaçlandırmada kullanılacak tohumların üstün genetik özelliklere sahip olması bu tohumlarla kurulacak ormanlardan beklenen genetik kazancın yüksek olmasını sağlayabilir. Bu amaçla öncelikle en çok tohum bahçelerinden elde edilen tohumlar ağaçlandırmalarda kullanılmaktadır. Ormancılık ve ağaçlandırma çalışmalarında kullanılmak üzere gerek duyulan üstün özellikli tür ve ırkları elde edebilmek için, genetik bakımdan üstün olan bireyler seçilip bir araya getirilerek tohum bahçelerinin kurulması

büyük önem taşımaktadır. Türkiye’de ağaçlandırma çalışmalarında ve ağaç ıslahında öncelikli türlerden en başta geleni de kızılçam (*Pinus brutia*) türüdür.

1.1 Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)’ın Sistematikteki Yeri, Doğal Yayılışı ve Ekonomik Önemi

Pinus brutia TEN. (kızılçam), Tenore tarafından ilk olarak İtalya’da tanımlanmıştır (Nahal 1983). Kızılçam *Gymnospermae* şubesi, *Coniferae* sınıfı, *Pinaceae* familyası ve *Pinus* cinsine ait bir türdür. Kızılçam İngilizce kaynaklarda ‘*Calabrian pine*’, ‘*Brutian pine*’ veya özellikle ana yayılış alanının Türkiye’de bulunması nedeniyle son zamanlarda ‘*Turkish red pine*’ olarak adlandırılmaktadır (Kasaplıgil 1978, Frankis 1993, Fady vd 2003, Boydak 2004, Boydak vd 2006).

Türkiye’de yayılış gösteren beş çam türünden (*Pinus brutia*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus pinea*, *Pinus halepensis*) biri olan kızılçam, ekolojik ve ekonomik değerinden dolayı Türkiye için önemli orman ağaçlarındandır. Kızılçam “Türkiye Milli Ağaç Islahı ve Tohum Üretimi Programı (1994-2003)” kapsamında öncelik verilen türler arasına alınmıştır (Öztürk ve Şıklar 2000, Boydak vd 2006). Kızılçam doğal yayılış alanında farklı yetiştirme ortamlarına uyum sağlamış, hızlı büyüyen ve yüksek genetik çeşitliliğe sahip bir türdür (Işık vd 1987). Kızılçam, kalkerli topraktan dolomit’e ve hatta volkanik topraklara kadar uzanan değişik toprak tiplerinde yetişmektedir. Akdeniz havzası yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı olması ile karakterize edilmektedir. Kızılçam genellikle Akdeniz tipi iklim görülen, yıllık ortalama sıcaklığı 12 °C (Marmara bölgesi) ile 20 °C (Akdeniz bölgesi) arasında olan, yıllık ortalama yağış miktarı 400 mm ve 2000 mm olan bölgelerde görülmektedir (Boydak 2004). Kızılçam Türkiye’de özellikle Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinin kıyıya bakan yamaçlarında, nadiren de Batı Karadeniz bölgesinin Akdeniz iklim özellikleri gösteren bazı kıyılarında doğal yayılış göstermektedir. Türkiye dışında ise; Yunanistan’da (Girit, Rodos, Sisam ve bazı Ege adalarında), Kıbrıs’da, Suriye’de, Lübnan’da ve Kuzey Irak’da yayılış göstermektedir (Şekil 1.1). Bunun yanı sıra Akdeniz iklimi görülen, Fransa, Kuzey Afrika, İsrail,

Avustralya, Kaliforniya ve Meksika gibi bölgelerde de bulunduğu bildirilmiştir (Selik 1958, Panetsos 1981, Kara vd 1997, Kandemir vd 2004, Boydak vd 2006).



Şekil 1.1 Kızılcāmın doğal yayılış alanları (Fady vd 2003)

Kızılcāmın taksonomisinde *Pinus brutia* Ten., *P. brutia* Ten. subsp. *brutia*, *P. brutia* Ten. subsp. *stankewiczii*, *P. brutia* Ten. subsp. *pityusa* ve *P. brutia* Ten. subsp. *elderica* olmak üzere dört alt türe ayrılmaktadır (Boydak 2004, Boydak vd 2006, Genç 2012). Bunlar içerisinde en geniş yayılışa sahip olan subsp. *brutia*'dır. Ayrıca subsp. *brutia*'nın 5 adet varyetesi (var. *brutia*, var. *agrophiotii* Papaj, var. *pyramidalis* Selik, var. *pendula* Mere, var. *densifolia* Yalt. ve Boydak) bulunmaktadır. Bunlara ek olarak Muğla yöresinde *P. brutia* subsp. *brutia* var. *pendulifolia* Frankis adlı bir varyeteden daha bahsedilmektedir (Boydak vd 2006, Genç 2012).

Türkiye'nin sahip olduğu genel ormanlık alanının 2004 yılı sonu itibariyle yaklaşık 21.2 milyon hektar büyüklükte olduğu T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü tarafından tespit edilmiştir. Kızılcām 5.4 milyon hektarlık alanla ülkemizin en geniş alana yayılmış ağaç türlerinden biridir (Anonim 2006). Kızılcām ormanlarının %47'lik bölümü Akdeniz bölgesinde, özellikle kıyı kesimlerinde ve Aksu, Seyhan gibi

akarsu vadilerinde yer almaktadır. Deniz seviyesinden başlayarak 1300 m yükseltilere kadar orman oluşturabilmektedir. Ayrıca, deniz seviyesinden 1500-1600 m seviyelerine kadar farklı ekolojik ve iklimik faktörlerin etkili olduğu yükseltilerde yayılış göstermektedir (Barbero vd 1998, Boydak 2004, Boydak vd 2006).

P. brutia üzerinde bu güne kadar yapılan araştırma sonuçları; onun diğer yerli orman ağacı türlerine göre daha hızlı gelişen bir tür olduğunu göstermektedir (Alemdağ 1962, Isik 1986, Erkan 1996, Boydak 2004). Ekonomik ve ekolojik açıdan Türkiye'nin en önemli orman ağacı türlerinden biridir (Isik vd 2000, Boydak 2004). Kızılçam genellikle saf ormanlar oluşturmaktadır. Toprak stabilizasyonu ve vahşi hayata sağladığı habitatlar açısından çok değerli bir ağaç türüdür (Boydak 2004). Ayrıca, odununun kullanım alanı da diğer yerli türlerimize göre daha fazladır. Kızılçam odunu, uygun lif boyutlarına sahip olması nedeniyle kağıt endüstrisinde ve inşaat malzemesi, tarım aletleri, deniz taşıtlarının yapımı gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Erten ve Önal 1987). Bu kullanım alanları arasında tel, çit ve maden direği, yat/tekne, ambalaj sandığı, selüloz ve kağıt, reçine ve değişik bir çok kimyasal maddeler sayılabilir. Kızılçamın ülkemizde geniş yayılış alanına sahip olması, hızlı gelişmesi, odun ve gövde kalite özelliklerinin iyi olması, bu türün genetik ıslahının yapılması için teşvik edici olmaktadır (Isik vd 1999, Anonim 2006, Boydak vd 2006).

1.2 Tohum Bahçesi Nedir?

Tohum bahçeleri, ormancılık ve ağaçlandırma çalışmalarında kullanılmak üzere genetik yönden üstün nitelikli tohum ve fidan elde etmek amacıyla kurulmaktadır (Zobel ve McElwee 1964, Zobel ve Talbert 1984, Stewart 1994, Buiteveld vd 2001, Zhuowen 2002). Tohum bahçesi, seçilmiş klonlar ve kuşaklardan (generasyonların) oluşan, kolay ve bol orman ağacı tohumu üretmek için özel işletmeye tabi tutulan, bahçe dışından gelen polen akışının azaltıldığı veya yok edildiği bahçelere denir. Bu nedenle, doğal orman popülasyonlarından genotipik olarak üstün oldukları varsayılan ağaçlar anaç olarak kullanılarak tohum bahçeleri kurulmaktadır (Zobel ve Talbert 1984). Başka bir ifadeyle, tohum bahçeleri, genetik olarak üstün ağaçlardan oluşan ve genetik açıdan istenmeyen

polen kaynaklarından izole edilmiş, sık, bol, kolay, genetik ve fizyolojik değeri yüksek tohum elde edilen, özel bakım ve işletmeye tabi tutulan plantasyonlardır (Zobel vd 1958, Ürgenç 1982, Zobel ve McElwee 1964, El-Kassaby vd 1989, Di-Giovanni ve Kevan 1991, Kang vd 2004).

Tohum bahçeleri temelde 4 önemli amaca ulaşabilmek için kurulur. Bunlar;

- a) Üstün genetik özellikleri taşıyan ağaçların oluşmasını sağlayacak genetik ve fizyolojik değeri yüksek tohumları elde etmek,
- b) Üstün genetik özellikleri sayesinde belirli bölgelere adapte olabilen ağaçları elde etmek,
- c) İstenilen genetik özellikteki ağaçların oluşmasını sağlayan genetik bakımdan üstün nitelikli tohumları daha çok miktarda ve daha ekonomik olarak elde etmek,
- d) Üstün genetik özellikleri fazla olan tür veya ırklara ait olan bireylerin korunmasını sağlamaktır.

Orman popülasyonlarının genetik yapısını istenilen yönde değiştirmek ve doğadaki popülasyonları amacımıza göre evcilleştirmek konusunda, tohum bahçeleri ağaç ıslahçısının elinde çok önemli bir araçtır. Tohum bahçeleri ağaçlandırma çalışmaları için gerekli olan yeterli miktardaki kaliteli tohum toplanmasını güvence altına alan kaynaklardır. Bu şekilde, istediğimiz genleri taşıyan bireyler tohum bahçesinde bir araya getirilir ve bunlar arasına arzu edilmeyen genlerin karışması da engellenerek özel bir gen havuzu oluşturulur. Bunlardan üretilen tohumlarla istediğimiz özellikleri taşıyan yeni nesiller yetiştirilebilir.

1.3 Tohum Bahçelerine Neden İhtiyaç Duyulur?

Doğal orman ağaçlarının üstün genetiksel özelliklerinden faydalanarak yeni ormanlar kurmak, bu ormanlardan elde edilecek birim alandaki odun hammadde verimini kalite ve miktar olarak arttırmak ve bu ormanların çeşitli doğal afetlere, böcek, mantar gibi biyolojik zararlılara karşı daha dayanıklı olmalarını sağlamak ağaç ıslahının temel amaçlarıdır. Ağaçlandırma alanına adaptasyon, büyüme hızı, zararlılara karşı direnç,

hacim üretimi ve odun kalitesi gibi özellikler açısından tohum kaynağı çok önemlidir. Dünyada ve Türkiye’de nüfus hızlı bir şekilde artmakta, sanayi gelişmekte, yerleşim alanları genişlemekte ve hayat standardı gittikçe yükselmektedir. Bu değişimlere paralel olarak ekolojik hizmetlere (su kaynaklarının ve biyoçeşitliliğin korunması, erozyonun önlenmesi vb.) ve odun hammaddesine olan talep de hızla artmaktadır. Ayrıca, doğal orman alanlarımız, yanlış ve bilinçsiz kullanım sonucu hızla azalmakta ve ormanlarımız, ülkemizin odun hammaddesi ihtiyacını karşılayamayacak bir düzeye inmiş bulunmaktadır.

Dünyadaki hızlı nüfus artışı ve sanayileşme, doğal kaynaklar üzerinde yoğun baskılar oluşturmakta ve bu olumsuzluktan ormanlar ciddi şekilde etkilenmektedir. Dünya nüfusunun 2023 yılına kadar ortalama %2 artacağı, orman alanlarının tahribinin süreceği, endüstriyel odun hammaddesi açığının 800-900 milyon m³ olacağı öngörülmektedir (Anonim 2007). Türkiye’deki mevcut orman alanları içinde üretim yapılabilir alan 9.6 milyon ha, bu alanlardaki yıllık artım ise 26.8 milyon m³ tür. Ülkemizde 13 milyon m³’ü endüstriyel odun ve 9 milyon m³’ü yakacak odun olmak üzere toplam 26-27 milyon m³ odun tüketilmektedir. Toplam odun hammaddesi arzının 16-17 milyon m³’ü Orman Genel Müdürlüğü tarafından, 4.5-5 milyon m³’ü özel sektör tarafından, 2-2.5 milyon m³’ü ise ithalat yolu ile sağlanmıştır. Endüstriyel odunun %60-65’i, yakacak odunun ise yaklaşık %85’i devlet ormanlarından elde edilmektedir (Anonim 2007). Nüfusumuzun, 2020 yılına gelindiğinde 104 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Odun hammaddesi üretiminin 2020 yılında 22.5 milyon m³, talebinin ise 40.3 milyon m³/yıl düzeyinde olacağı belirtilmektedir. Bu durumda 2020 yılında odun hammaddeleri açığı yaklaşık 17.8 milyon m³/yıl olacaktır (Anonim 2001a).

Ülkemizdeki mevcut odun hammaddesi açığını ve gelecek yıllarda artacak olan talep açığını kapatmak, en azından biraz azaltmak için orman alanları genetik bakımdan üstün özellikli (yüksek verimli ve hızlı büyüyen) tür ve ırklar ile ağaçlandırılmalıdır. Ağaçlandırmada ıslah edilmiş tohum kullanılması birim alandaki odun hammaddesi verimi arttırmada önemli ölçüde etkiye sahiptir. Ağaçlandırmada kullanılacak tohumlar tohum meşcerelerinden, tohum plantasyonlarından ya da tohum bahçelerinden elde edilmektedir. Ağaçlandırma çalışmalarına yönelik olarak yapılacak ıslah programlarında devamlı bir

genetik kazanç sağlanmak isteniliyorsa tohum üretimi yapılır, fakat devamlı olarak tohum ihtiyacını karşılayacak tohum bahçelerinin kuruluşuna kadar en yaygın olarak kullanılan geçici tohum kaynakları tohum meşcereleridir (Tunçtaner 2007). Tohum elde edilen tohum kaynaklarından en büyük kazancı tohum bahçeleri sağlamaktadır.

Tarım ve ormancılık ile ilgili kaynaklarda, tohum bahçelerine ve vejetatif üretme çalışmalarına sıkça rastlanmaktadır. İlk tohum bahçeleri kurma düşüncesi Almanya'da Berlin Akademisi Müdürü olan Friedrich August Ludwing von Burgsdorf'un 1787 yılında yazdığı "Yerli ve Yabancı Meşe Türleri" adlı eserinde rastlanmıştır. Yazar bu eserinde her yıl belirli belirsiz yerlerden tohum toplanması yerine, bu iş için ayrılmış ve özel bakıma tabi tutulmuş meşe ormanlarından tohum toplanması gerektiğini önermiştir. Daha sonraları çeşitli yazarlar klonal tohum bahçeleri kurma düşüncesi üzerinde yazılar yazmışlardır. Aşılı fidanlar ile tohum bahçesi kurulması ise, ilk defa 1934 yılında Danimarka'da Syrach Larsen tarafından gerçekleştirilmiştir (Şimşek 1993). Orman ağacı türleri içinde ilk tohum bahçesi 1931 yılında İskoçya'da *Larix eurolepis* fidanları ile kurulmuştur. İlk çam tohum bahçesi ise 1949 yılında *Pinus sylvestris* (sarıçam) ile İsveç'te kurulmuştur. Ülkemizde ise ilk tohum bahçeleri, 1964 yılında İstanbul-Belgrad Ormanında karaçam ve sarıçam türleri ile İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Silvikültür ve Ağaçlandırma Anabilim Dalı tarafından kurulmuştur (Tunçtaner 2007).

T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından ülkemizin değişik bölgelerinde, değişik orman ağaçları için 2010 yılına kadar 172 adet tohum bahçesi kurulmuştur (Bkz. Çizelge 1.1). Bu 172 adet tohum bahçesinden 68 adeti kızılçam, 55 adeti karaçam ve 21 adeti ise sarıçam türüne aittir (OATIAM, 2010). Ülkemizdeki tohum bahçelerinin tamamı birinci kuşak fenotipik tohum bahçesidir. Kızılçam da 6 adet döl denemelerinin ilk sonuçlarına göre kurulmuş tohum bahçeleri mevcuttur. Döl denemesinin ilerleyen sonuçlarına göre bu tohum bahçelerinin genetik tohum bahçesine dönüştürülmesi planlanmaktadır (Alan et al. 2007). Ayrıca çoğunlukla Akdeniz bölgesinde olmak üzere ülkemizin değişik bölgelerinde kızılçama ait 82 tohum meşceresi, 57 gen koruma ormanı ve 5 klon parkı mevcuttur (OATIAM, 2010).

Çizelge 1.1 T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından ülkemizde tesis edilmiş tohum bahçeleri (2010 yılı itibariyle)

AĞAÇ TÜRÜ	ADEDİ	ALANI (ha)
FISTIKÇAMI (<i>Pinus pinea</i>)	4	47.2
HALEPÇAMI (<i>Pinus halepensis</i>)	2	8.2
KARAÇAM (<i>Pinus nigra</i>)	55	446.2
KIZILAĞAÇ (<i>Alnus glutinosa</i>)	1	5
KIZILÇAM (<i>Pinus brutia</i>)	68	479.1
LADİN (<i>Picea orientalis</i>)	9	31.1
SARIÇAM (<i>Pinus sylvestris</i>)	21	109.4
SEDİR (<i>Cedrus libani</i>)	10	58.8
SIĞLA (<i>Liquidambar orientalis</i>)	1	2.2
ÜVEZ (<i>Sorbus torminalis</i>)	1	1.7
TOPLAM	172	1188.9

1.4 Tohum Bahçelerinin Temel Özellikleri

Tohum bahçelerinin temel olarak 2 çeşidi vardır. Bunlardan birincisi vejetatif bahçe veya klonal tohum bahçesi, diğeri ise tohum plantasyonu veya aşısız tohum bahçesidir. Klonal tohum bahçeleri aşı kalemi, çelik veya doku kültürü gibi vejetatif materyal ile kurulurken, tohum plantasyonları tohumdan yetiştirilen fidanların bir desen dahilinde dikilmesi ile kurulur (Tunçtaner 2007).

Tohum bahçeleri oluşturmak için:

- a) Fenotipik seleksiyona (görünüş özelliklerinin seçimine) dayanılarak, istenilen karakterler bakımından arzu edilen özellikte ağaçlar seçilir. Bu ağaçlara "plus ağaç" denir. Plus ağaçlar özellikle boy artışı yüksek; gövde kalitesi, tepe formu ve doğal budanması iyi ve boğumlarında az sayıda dal olan ağaçlar içinden seçilir. Plus ağaçlardan alınan vejetatif materyal klonları temsil etmektedir (Kang vd 2001b, Tunçtaner 2007).
- b) Bu plus ağaçlardan alınan çelikler, ya da bu ağaçların açık veya kontrollü tozlaşma ürünü olan tohumlarından elde edilen fidanlar kullanılarak tohum bahçeleri kurulur. Alınan çelikler ya köklendirilerek ya da ülkemizde yaygın bir şekilde yapıldığı gibi sıradan fidanlara aşılanarak tohum bahçelerine aktarılır. Bu şekilde kurulan tohum bahçeleri "birinci kuşak" tohum bahçeleri adını alır. Bunların arasında, genetik yönden değerli olmayan bireyler de bulunabilir.
- c) Birinci kuşak tohum bahçelerindeki plus ağaçlar döl denemeleri veya klonal testlere tabi tutulur ve bu yolla her birinin genotipik değerleri saptanır.
- d) Genotipik değerleri saptanan plus ağaçlar ikinci bir seçime tabi tutulurlar. Genetik bakımdan istenmeyen özellikleri taşıyan klonlar ve bireyler programdan elenir. Geri kalanların genetik üstünlüğü ispat edilmiştir. Bunların her biri "elit ağaç" adını alır.
- e) Bu elit ağaçlardan vejetatif olarak üretilen fidanlarla kurulan tohum bahçelerine ise "elit ağaç tohum bahçeleri", "ikinci kuşak tohum bahçeleri" veya "ileri generasyon tohum bahçeleri" denir. Genetik kazancın en yüksek olduğu tohum bahçeleri elit ağaç tohum bahçeleridir. Bu tohum bahçelerinden elde edilecek genetik kazancın %30-40'a çıkabileceği ileri sürülmektedir (Işık 1991).

Potansiyel olarak genetik kazançları yüksek tohum kaynakları olan tohum bahçeleri, erken tohum verimi, sık, bol ve kolay tohum toplayabilme imkanları bakımından da önemlidir. Tohum bahçelerinde tohum oluşumu doğal ormanlara göre daha erken başlar

ve daha sık periyotlar ile devam eder (Şimşek 1993). Tohum bahçelerinden genetik ve fizyolojik kalitesi yüksek tohumun, kısa zamanda, bol ve ucuz olarak elde etmek için tohum bahçesinin yeri ve kuruluş şekli önemlidir (Tunçtaner 2007). Tohum bahçelerinin kurulması zaman, para, beceri ve konu ile ilgili birimlerin işbirliğini gerektirir. Ayrıca tohum bahçesinin kurulması sırasında, bahçenin kurulacağı yerin seçimi, dizaynı, fidanların dikim aralığı ve dikim şekli, bitkilerin korunması ve tohumun hasat edilmesi gibi birçok faktörün de dikkate alınması zorunludur. Kısacası bir tohum bahçesinin kurulması, bakımı ve işletilmesi zaman, para ve yetişmiş iş gücü gerektirir. Üstelik bu tohum bahçelerinden elde edilen tohumların, genetik bakımdan güvenilir olması oldukça önemlidir (Di-Giovanni ve Kevan 1991). Genellikle tohum bahçeleri türün yayılışının en güney sınırı yakınında veya yayılışının daha alt zonlarında tesis edilir. Böylece sıcaklığın artması sonucu tohum verimi de artmaktadır. Tohum bahçesi kurulacak bölgenin toprak yapısı ve iklim koşulları türün yetiştirme şartlarına uygun olmalıdır. Tohum bahçelerindeki klonlara ait fidanlar geniş dikim aralığı ile dikilmelidir. Böylece bol miktarda ışık alan ağaçların tepe tacı iyi gelişmekte ve tohum üretimi fazla olmaktadır. Ayrıca tohum bahçelerinden elde edilen tohumların çimlenme kabiliyeti de yüksektir (Ürgeç 1982).

Tohum bahçelerinin kurulmasında kullanılacak klon sayısı genetik çeşitliliğin sağlanmasında önemli yere sahiptir. Kullanılacak klon sayısı fazla olursa genetik çeşitlilik yüksek olabilir. Eğer az sayıda klon kullanılırsa örnekleme etkisinden dolayı kaynak popülasyondaki nadir alleller kaybedilebilir ve bu genetik çeşitliliğin azalmasına neden olabilir (Bilir vd 2004). Tohum bahçelerinde bulunması gereken klon sayısı genellikle 20 ile 50 klon arasında değişir. Birinci kuşak tohum bahçelerinin kurulmasında ortalama 30 klon kullanılmaktadır (Anonim 2001b). Ayrıca tohum bahçesinin sahip olduğu klon sayısının yanı sıra bahçedeki her bir klona ait ramet sayısı da tohum bahçelerinin işlevleri açısından önemli yere sahiptir. Çünkü her bir klona ait ramet sayısındaki farklılıklar bahçedeki klonlar tarafından dişi çiçek, erkek çiçek ve gamet üretimine eşit olmayan katkıya neden olabilmektedir (Kang vd 2001b). Klonlara ait ramet sayısı, klonların tohum ürünündeki gen havuzuna katılım oranı ve ürün miktarı bakımından önemlidir. Tohumda yüksek oranda gen çeşitliliği elde etmek için her bir klona ait eşit sayıda veya mümkün

olduğunca birbirine yakın sayıda ramet kullanılarak tohum bahçelerinin kurulması tercih edilmelidir.

Tohum bahçeleri çevrelerinde bulunan aynı türün istenmeyen polenleri ile döllenmelerini engelleyecek, bu polenlerden izole edilecek şekilde kurulmaktadır. Tohum bahçeleri türün doğal populasyonlarındaki ağaçlardan gelen polenlerle döllenmesinin engellenebilmesi ve istenmeyen polen kaynaklarından izole olması için komşu ağaçlardan en az 300-400 m uzak bir yerde kurulmalıdır (Şimşek 1993). Geleneksel orman ağacı ıslah programları, ağaçlandırmalarda kullanılmak üzere ıslah edilmiş tohum üretimi için, tipik olarak açık tozlaşan tohum bahçelerine bağımlıdır. Seleksiyon sonucu elde edilecek genetik kazanç hesaplamaları da, tohum bahçesi dışındaki bireylerden polen karışımı olmadığı ve tam panmiksiz (tohum bahçesi içindeki bireylerin birbirleriyle rastgele eşleşmesi) olduğu varsayımlarıyla, ideal açık tozlaşan tohum bahçelerine dayalı olarak yapılır. Tohum bahçelerinden yüksek oranda genetik kazancın garantilenmesi için tam panmiksiz ve bütün klonların tohum üretimine eşit katkısı gerekmektedir (Stoehr vd 1998, Kang vd 2001a, Funda vd 2009). Eğer tohum bahçelerinde panmiktik şekilde üreme yoksa beklenen genetik kazancın bir kısmı kaybolacaktır. Açık tozlaşma olan tohum bahçelerinde, genetik kazancın beklenen düzeyde olması için şu koşullar gerçekleşmelidir:

- 1) Tohum bahçesi, tohum bahçesini çevreleyen doğal populasyonlardan yani istenmeyen polen kaynaklarından tamamıyla izole olmalı,
- 2) Tohum bahçesi yeterli derecede büyüklüğe ve bahçedeki klonlar mümkün olduğu kadar eşit sayıda ramete sahip olmalı,
- 3) Klonlar dişi ve erkek çiçekler bakımından eşit üretim yapmalı,
- 4) Polenlerin saçılma dönemi ile dişi çiçeklerin polen kabul dönemi çakışmalı,
- 5) Bütün klonlar birbiriyle çaprazlandığında eşit eşleşme uyumuna sahip olmalı,
- 6) Kendi kendine döllenme veya yakın akrabalar arası bir eşleşme sonucu birey oluşmamalıdır veya bunların oranı çok az olmalıdır (Fast vd 1986, El-Kassaby vd 1989, Kang vd 2001a, Tunçtaner 2007).

Tohum bahçesi dışında bulunan bireylerden polen kirliliği (kontaminasyonu) ve kendi kendine dölleme olayı tohum bahçelerinde tozlaşma ile ilgili potansiyel sorunlar olarak bilinir. Tozlaşmayla ilgili sorun olursa yukarıdaki koşullardan biri veya bir kaç olumsuz yönde etkilenebilir. Tohum bahçelerinde eşleşme sisteminin belirlenmesi ve polen kirliliği (kontaminasyonu) oranının tahmin edilmesi üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Adams ve Birkes 1989). Polen kirliliğinin doğru bir şekilde tahmin edilmesi, tohum bahçesinde genetik kazancın belirlenmesi, polen kirliliğini azaltmak için tohum bahçesi yönetim stratejilerinin geliştirilmesi ve tohum bahçelerinin etkinliğinin değerlendirilmesi için büyük önem taşımaktadır (Torimaru vd 2009).

1.5 Gen akımı, Eşleşme Sistemi ve Polen Kirliliği (Kontaminasyonu)

Bireylerin veya bireylere ait gametlerin hareketi sonucunda populasyonlar arasında genetik materyalin transferine gen akımı (gen göçü) denir. Diğer bir deyişle, gen akımı, bir populasyonun gen havuzundan diğer bir populasyonun gen havuzuna allel transferidir. Bitki populasyonlarında gen akımı iki şekilde meydana gelir. Birincisinde, dölleme öncesinde bir populasyona farklı bir populasyondan polen göçü olur. Sonuçta dışarıdan gelen polenlerin alıcı populasyondaki dişi çiçekleri döllemesi ile alıcı populasyonda tohum meydana gelir. İkincisinde ise dölleme sonrasında, verici populasyondaki tohumların alıcı populasyonun bulunduğu alana yayılıp yetişmesi ve bunlardan oluşan polenlerin yerli bireyleri döllemesi meydana gelir (Ennos 1994).

Bitki populasyonlarında, yeni bir bireyi oluşturmak için dişi ve erkek bireye ait gametlerin bir araya gelme şekillerine eşleşme sistemi denir. Orman ağacı populasyonlarında eşleşme sistemi iki şekilde görülür. Birincisi kendi-kendine dölleme (selfing), diğeri ise kendinden-başka-bireylerle döllenmedir (outcrossing). Eğer bir bireyin dişi çiçeği aynı bireyin (ya da aynı klona ait başka bir rametin) poleni tarafından döllenir ise bu olaya kendi-kendine dölleme denir. Tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle dölleme iki şekilde meydana gelebilir. Birincisi tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin yine tohum bahçesindeki diğer klonlara ait polenlerle döllenmesi, ikincisi ise

tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin tohum bahçesi yakınında bulunan doğal populasyonlardaki bireylere ait polenlerle döllenmesidir (Kaya 2005).

Eşleşme sistemi, populasyon içindeki genetik yapıyı ve soy-içi üremenin düzeyini etkilediğinden dolayı, bitki populasyonlarının genetik yapısının önemli bir belirleyicisidir (Neale ve Adams 1985). Eşleşme sistemi populasyonların seleksiyon ve genetik sürüklenme sonucunda genetik olarak alt gruplara ayrılma derecesini de etkiler (Adams ve Birkes 1989). Doğal populasyonlardaki eşleşme şeklinin bilinmesi, doğal populasyonlardan toplanan tohumların genetik yapısının değerlendirilmesi bakımından önemlidir (Adams 1992). Tohum bahçelerinde eşleşme sisteminin bilinmesi ise, tohum bahçesinin işletilmesi için önem taşır. Doğal populasyonlardaki bireylerden gelen yabancı polenlerin (gen göçü) tohum bahçesindeki bireyleri dölleme oranı ile bahçe içindeki bireylerin birbirlerini dölleme oranı, tohum bahçesinde eşleşme sisteminin temel belirleyicileridir. Tohum bahçesinin eşleşme sistemini belirlemek için elde edilen bu bilgiler, ıslah edilmemiş yabancı polen kaynaklarından gelen polen kirliliğini (kontaminasyonunu) sınırlandırmak ve tohum bahçesi içindeki bireyler arasındaki eşleşme oranını yükseltmek için kullanılır (Adams ve Birkes 1991). Tohum bahçelerinin, hem genetik olarak kaliteli, hem de bahçedeki klonların genetik çeşitliliğini yansıtan tohumlar üretmesi beklenir. Bu beklentinin gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini belirlemek için tohum bahçesinde eşleşme sisteminin üç önemli ögesi olan, bahçe içindeki klonların kendi-kendine döllenme oranı, bahçe dışındaki doğal ağaçlardan gelen polenler nedeniyle oluşan tohumların oranı, bahçe içindeki farklı klonların birbirlerini dölleme oranı kullanılır.

Orman ağaçlarının doğal populasyonlarında birbirine yakın olan ağaçlar genellikle birbirlerinin akrabasıdır. Çünkü ormanda tek bir ağaçtan etrafa saçılan tohumların veya polenlerin çoğu sınırlı mesafelere taşınır ve populasyondaki yakın bireyler arasında genetik akrabalık artar. Bunun sonucunda doğal populasyonlarda yakın akrabalar arasında eşleşmeler meydana gelir. Bu akrabalar (ebeveyn ve oğul döl, tam kardeşler ve yarım kardeşler) arasındaki eşleşmeler sonucu orman ağacı türlerinin doğal populasyonlarında önemli derecede soy-içi üreme oluşabilir ve bu soy-içi üreme de eşleşme sisteminin bir parçasıdır (Fast vd 1986). Her bir kuşakta kendi-kendine döllenme

(selfing) (s) ve kendinden-başka-bireylerle döllenme (outcrossing) ($t=1-s$) sonucu oluşan bireylerin oranı eşleşme sistemini tanımlamak için en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir.

Gen akımının, popülasyonların genetik yapısının şekillenmesinde, mutasyon, genetik sürüklenme ve seleksiyon kadar önemli bir yeri vardır. Orman ağaçları popülasyonlarında polen hareketi, popülasyonlar arasındaki ve içindeki genetik çeşitliliği etkilemektedir. Popülasyonlar arasındaki ve içindeki genetik çeşitliliğin dağılımı ve etkili popülasyon büyüklüğü, soy-içi üremenin (inbreeding) düzeyini etkilemektedir. Ayrıca popülasyonun küçük olması ve soy-içi üreme, genetik sürüklenme yolu ile popülasyon içi çeşitliliği azaltmaktadır. Soy-içi üremenin seviyesini sadece üreme sisteminin doğası değil aynı zamanda polen ve tohum dağılımının şekli, popülasyonlar arasındaki gen akımı ve farklı üreme başarısı da etkiler (Adams ve Birkes 1991, Burczyk ve Prat 1997, Burczyk vd 2004a, Sharma ve Khanduri 2007).

Kendi-kendine dölleme (selfing) tohum bahçelerinde en muhtemel soy-içi üreme şeklidir (Fast vd 1986). Kendi-kendine döllenme sonucu oluşan tohumların oranı önemlidir. Çünkü kendi-kendine döllenme, oluşan oğul döllerin yaşama kabiliyetinin düşük olmasına ve tohum sayısının azalmasına yol açar. Çoğu orman ağaçlarının doğal popülasyonlarında kendi-kendine döllenmeyi takiben hem yaşayabilir nitelikteki tohumların oranının düşük olması hem de az sayıda tohum oluşması beklenir (Erickson ve Adams 1990, Adams vd 1992). Tohum bahçelerinde ise (özellikle klonal tohum bahçelerinde) aynı klonun rametleri arasındaki eşleşmeler sonucu etkin kendileme nedeniyle, kendi-kendine döllenme oranının doğal popülasyonlara göre daha yüksek olması beklenir. Bununla birlikte tohum bahçesindeki klonların sayısının yüksek (örneğin >25) olması ve ayrıca aynı klonun rametleri arasındaki fiziksel mesafenin bahçede planlama ve dikim yapılırken yeteri kadar aralıklı olması, kendileme ürünü tohumların oranını azaltmaktadır. Bu şekilde iyi planlanan klonal tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenerek oluşmuş tohum oranının genel olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

İğne yapraklı orman ağacı türleri açık tozlaşan türlerdir ve bu nedenle oldukça zengin bir genetik çeşitlilik gösterirler (Furnier ve Adams 1986). Bununla birlikte orman ağacı türlerinde, eşleşme sisteminin değişken olduğu bulunmuştur. Kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı (outcrossing) türler arasında, tür içindeki populasyonlar arasında, populasyonlar içindeki bireyler arasında ve hatta incelenen lokuslar arasında bile değişmektedir. Bu değişim hem genetik kaynaklı olabilir hem de populasyonun yoğunluğu, populasyonun yaşı, yabancı veya lokal polenlerin varlığı gibi ekolojik etkilerden kaynaklanır (Burczyk 1998).

Tohum bahçesindeki bir klona ait bir bireyin (rametin) dişi çiçeklerinin aynı tohum bahçesindeki farklı bir klona ait bir bireyin erkek çiçeklerinden yayılan polenlerle döllenmesi arzu edilir. Tohum bahçesi dışındaki düşük genetik özellikli ağaçlardan gelen polenlerin üstün özellikli ağaçlardan oluşan tohum bahçesindeki dişi çiçekleri döllenmesine polen kirliliği (kontaminasyonu) denir. Polen yoluyla genetik kirlenme sonucunda, tohum bahçesine, tohum bahçesi kaynaklı olmayan polenlerin karışması yüzünden istenmeyen genotipteki tohumlar oluşabilmekte ve bu tohumlarla kurulan ormanlar genetik bakımdan düşük kaliteli olmaktadır (Wheeler ve Jech 1986). Ayrıca polen kirliliği her ne kadar genetik çeşitliliğe katkı sağlasa da seleksiyon sonucu tohum bahçesinden elde edilecek genetik kazancı azaltmaktadır (Kang vd 2001a, Fernandes vd 2008). Eğer bir tohum bahçesi istenmeyen özellik gösteren (daha düşük kaliteli) populasyonlara yakın ise veya tohum bahçesi aynı türe ait ormanların baskın olduğu bölgeye kurulmuş ise çiçeklenme zamanında havadaki polen yoğunluğunun fazla olmasından dolayı polen kirliliği oranı çok daha yüksek olacaktır (Snieszko 1981, Greenwood ve Rucker 1985, Pakkanen vd 2000). Ayrıca iki kaynağın gen havuzları farklılaşır ve dolayısıyla gen frekanslarındaki fark artarsa polen kirliliğinin sonuçları beklenenden daha şiddetli olacaktır (Snieszko 1981).

Yapılan çalışmalar orman ağacı türlerinin tohum bahçelerinde genetik kirlenme düzeyinin genellikle %5 ile %90 arasında değişen değerlerde olduğunu göstermiştir (Wheeler ve Jech 1986, El-Kassaby vd 1989, Di-Giovanni ve Kevan 1991, Caron ve Leblanc 1992, Harju ve Nikkanen 1996, Adams vd 1997, Pakkanen vd 2000, Buiteveld vd 2001, Burczyk vd 2004b, Hansen ve Kjaer 2006, Kaya vd 2006, Fernandes vd 2008,

Torimaru vd 2009, Feng vd 2010). Örneğin, Harju ve Nikkanen (1996) bir *P. sylvestris* tohum bahçesinde, tohum bahçesinin en yakın sarıçam popülasyonuna 2 km uzakta olmasına rağmen, polen kirliliği oranını %48 olarak bildirmiştir. Pakkanen vd (2000) tarafından *Picea abies* tohum bahçesinde yapılan çalışmada polen kontaminasyonu %70 olarak belirlenmiştir. Hansen ve Kjaer (2006) tarafından *Abies nordmanniana* klonal tohum bahçesinde maksimum polen kontaminasyonu %4.3 olarak bildirilmiştir. Kaya vd (2006) tarafından Antalya-Asar *P. brutia* tohum bahçesinde yapılan çalışmada polen kirliliği %85 olarak saptanmıştır. Polen kirliliği hakkında yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler, ıslah popülasyonlarının kontrolü ve etkili gen koruma stratejilerinin geliştirilmesi için önem taşımaktadır (Adams ve Birkes 1991, Burczyk 1996).

Tohum bahçesi ile doğal popülasyonlar veya genetik açıdan istenmeyen özelliklere sahip (daha düşük kaliteli) popülasyonlar arasındaki mesafe, tohum bahçesinin büyüklüğü, bahçedeki rametler tarafından üretilen polen miktarı ve yakın doğal popülasyonlardaki çiçeklenme ile tohum bahçesindeki çiçeklenmenin zamanlarındaki çakışmalar polen kirliliği oranını etkileyen faktörler arasındadır (Di-Giovanni vd 1996). Tohum bahçelerinde polen kirliliği (kontaminasyonu) oranını belirlemek için; polen tuzaklarının kurulması, tohum bahçesindeki bireylerin oluşturduğu erkek çiçeklerin kesilmesi (emaskülasyon) yönteminin uygulanması ve genetik belirteçlerin kullanılması gibi farklı yollar kullanılmaktadır. Polen tuzakları ve emaskülasyon yöntemlerinin genetik belirteçlere göre bazı dezavantajları vardır. Emaskülasyon yöntemi, polen kirliliğinin belirlenmesinde kullanılmasına rağmen, kirlilik oranının belirlenmesinde tam olarak yeterli değildir; ayrıca pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. Polen tuzaklarının kurulması ise emaskülasyon yöntemine göre biraz daha ucuzdur. Polen tuzakları toplam kontaminasyon oranını belirlemede kullanışlıdır, fakat kontaminasyonun nereden kaynaklandığı hakkında tam bir bilgi vermez (Lowe ve Wheeler 1993). Bu nedenle polen göçü ve genetik kirliliğin derecesinin belirlenmesinde genetik belirteçler son yıllarda daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Pakkanen vd 2000, Buiteveld vd 2001, Goto vd 2002, Burczyk vd 2004b, Hansen ve Kjaer 2006, Kaya vd 2006, Fernandes vd 2008, Torimaru vd 2009, Feng vd 2010).

Bitki türlerinin doğal populasyonları ve tohum bahçelerinde eşleşme sisteminin incelenmesinde de genetik belirteçler yaygın olarak kullanılmaktadır (Greenwood ve Rucker 1985, Lowe ve Wheeler 1993). Başlangıçta bu amaçla monoterpenler kullanılmıştır. Daha sonraları kullanılmaya başlanan elektroforetik metotlar, polen kontaminasyonunu ve eşleşme sistemini belirlemek için daha çok tercih edilmiştir. Elektroforetik bir yöntem olan izoenzimler sayesinde polen kontaminasyonu ve eşleşme sisteminin doğrudan belirlenebilmesi 1980'lerin başında mümkün hale gelmiştir (Smith ve Adams 1983, Friedman ve Adams 1985, Wheeler ve Jech 1986). Tohum bahçesi klonlarında belirlenebilir eşsiz/özgü izoenzim genotiplerinin az sayıda olması, izoenzimlerin rutin araştırmalarda kullanılmasını kısıtlamaktadır (Stoehr ve Newton 2002). DNA düzeyinde yapılan bir analizin, olaylar dizisinin diğer basamaklarındaki etkilerden arınmış halde bireyin genotipi hakkında daha sağlıklı bilgiler vereceğinden dolayı DNA tabanlı moleküler belirteçler polen kontaminasyonu ve eşleşme sisteminin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ennos 1994, Ouborg vd 1999, Varshney vd 2005, Altun 2006). Ayrıca tohum bahçelerindeki klonlara ait rametlerin genetik kimliklerinin belirlenmesinde moleküler belirteçlerin, özellikle kloroplast mikrosatellitlerinin, önemli rolü bulunmaktadır (Dzialuk ve Burczyk 2004).

1.6 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanımları

Günümüzde populasyon genetiği çalışmalarında bilim adamları tarafından çeşitli moleküler genetik belirteçlerinin geliştirilmesi sonucu, morfolojik ve protein (izoenzim) belirteçleri yerine DNA tabanlı genetik belirteçler (RFLP, PCR-RFLP, AFLP, RAPD, SSR, STR gibi) kullanılmaktadır. Genetik çeşitliliğin, eşleşme sisteminin ve polen kontaminasyonunun belirlenmesi için DNA düzeyinde yapılan çalışmalarda kullanılan en hızlı ve etkili metotlardan birisi mikrosatellitlerin veya basit dizi tekrarlarının (SSRs) çeşitliliğini kullanmaktır. Mikrosatellitler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı genetik belirteçler olup araştırılan gen-içi ve/veya genler-arası bölgelerdeki tekrar sayısındaki farklılıkların belirlenmesine dayanmaktadır. Mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesinde, çalışılan tekrarlı bölgenin veya lokusun yan bölgelerine (flanking) komplementer primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır ve elde edilen parçalar

(fragmentler) elektroforetik olarak analiz edilir (Anzidei vd 1999, Scotti vd 1999, Bandelj vd 2004, Varshney vd 2005).

Yüksek dereceli organizmaların genomlarında bulunan basit tekrarlı diziler; satellit DNAlar, minisatellitler ve mikrosatellitler olmak üzere 3 çeşittir. Mikrosatellitler bu basit tekrarlı dizilerin en küçük sınıfıdır. Mikrosatellitler, protein kodlayan veya kodlamayan herhangi bir genom bölgesinde bulunabilen (genellikle kodlanmayan bölgelerde), 1-6 nükleotidin tekrarlanması ile oluşan genom içinde dağılmış kısa DNA dizileridir. Mikrosatellitler hem ökaryotik hem de prokaryotik genomlarda yaygın olarak bulunur (Toth vd 2000, Semagn vd 2006). Tekrarlanan dizin genellikle $(CA)_n$, $(TG)_n$, $(AG)_n$, $(CAG)_n$, $(TAT)_n$, $(AAT)_n$ tekrarlarıdır. Burada, 'n' toplam tekrar sayısını ifade eder ve toplam tekrarlanan dizin sayısı en az ondur. Mikrosatellit tekrarları TATATATATATATA örneğinde olduğu gibi herhangi bir farklı baz ile bölünmemiş yani mükemmel, TATATATACTATATA örneğinde olduğu gibi diğer bir bazın araya girmesi sonucu kusurlu veya TATATACGTGTATATATATA örneğindeki gibi tekrarlayan dizide başka bir kısa dizinin varlığı sonucu bölünmüş olabilmektedir. Bunun yanında bileşik mikrosatellitler (örneğin, TATATATATAGTGTGTGTGTGT) iki farklı tekrarlayan dizi içermektedirler. Ayrıca, bu 3 tip arasında her türlü kombinasyon görülebilir (Hancock 1998, Navascues ve Emerson 2005, Oliveira 2006, Semagn vd 2006). Bitki genomlarında daha sık görülen mikrosatellitler genellikle $(AT)_n$ ve $(GT)_n$ dinükleotit tekrarları iken, hayvanlarda $(AC)_n$ tekrarları daha yaygındır. Trinükleotit dizinlerde ise $(TAT)_n$ tekrarları çok sık görülmektedir. Mikrosatellitlerin bazı tipleri belirli bir tür ve/veya grup için yaygın ve özgün olmasına karşın analiz edilen bütün organizma genomlarında mikrosatellitlere rastlanmıştır. Mikrosatellitlerin genomda nötr (yansız) etkileri olabildiği gibi belirli türlerde önemli görevleri de olabilmektedir (Hancock 1998, Varshney 2005, Oliveira vd 2006). Mikrosatellitler genellikle seleksiyon ve çevre baskısı tarafından direkt olarak etkilenmezler (Scotti vd 1999).

Mikrosatellitler başlangıçta insan türü için dizayn edilmiş olsa da zamanla bitki ve hayvan türleri ile yapılan moleküler araştırmalarda güçlü bir araç olmuştur. Mikrosatellitler birçok canlı çeşidinin genetik haritalarının oluşturulmasında, genetik

çeşitliliğin belirlenmesinde, genetik hastalıkların belirlenmesinde, populasyon genetiği çalışmalarında, bağlantı (linkaj) analizlerinde, parmak izi analizlerinde, genotipleme ve ebeveyn tayininde sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca gen akımı şekillerinin ve genetik sürüklenmenin oranının belirlenmesinde de yararlı bilgiler sağlamaktadır (Echt ve May-Marquardt 1997, Balding 1998, Carrington vd 1998, Dow ve Ashley 1998, Shibata 1998, Stoehr vd 1998, Anzidei vd 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Buiteveld vd 2001, Balloux ve Lugon-Moulin 2002, Heywood ve Iriondo 2003, Bandelj vd 2004, Slavov vd 2004, Varshney vd 2005, Oliveira vd 2006).

Mikrosatellitler ökaryotik genomda çekirdek, mitokondri ve kloroplast olmak üzere üç farklı yerde bulunmaktadır. Kloroplast mikrosatellitleri sahip oldukları bazı özelliklerden dolayı çekirdek mikrosatellitlerinden farklılık gösterirler. Kloroplastlar yavru döllerde tek ebeveyn tarafından kalıtılırlar. Başka bir deyişle, bazı taksonlarda sadece anne (maternal), bazı taksonlarda da baba (paternal) tarafından kalıtılırlar. Örneğin, kloroplastlar yavru döllerde angiospermelerde anne, konifer türlerinde baba tarafından aktarılır. Böylece, kloroplast basit dizi tekrarları (cpSSR) kullanılarak koniferlerde babaya ait soy hattı hakkında bilgi elde edilebilir (Ennos 1994, Anzidei vd 1999, Goto vd 2002, Ribeiro vd 2002, Stoehr ve Newton 2002, Cuenca vd 2003, Navascues ve Emerson 2005, Semerikova ve Semerikov 2007). Kloroplast genomu haploiddir ve rekombinasyon geçirmez. Bu nedenle bütün kloroplast lokusları bağlantılıdır ve tek bir lokus olarak ele alınır. Haplotip olarak belirlenen basit dizi tekrarları, her bir cpSSR lokusunda bulunan allellerin kombinasyonu şeklinde ifade edilmektedir (Ribeiro vd 2002, Stoehr ve Newton 2002, Austerlitz vd 2004, Navascues ve Emerson 2005, Terrab vd 2006).

Mikrosatellit belirteçleri diğer belirteçler ile karşılaştırıldığında (izoenzimler, AFLP, RAPD, RFLP, STR vb.) polimorfizmin yüksek derecede olduğu, yani allel çeşitliliğinin fazla olduğu görülür. Bu sadece bitki populasyon genetiğindeki gen akımı ve ebeveyn tayini gibi çalışmalarda değil aynı zamanda doğal bitki populasyonları ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda da mikrosatellitlerin avantajlı olmasını sağlar. Ayrıca, genetik çeşitlilik düzeyinin düşük olduğu canlı türleri için de mikrosatellitler rahatlıkla kullanılabilirler.

Mikrosatellitlerin genomda dağınık olarak bulunması, mikrosatellit analizlerinin tekrarlanabilirlik düzeyinin çok yüksek olması ve analizler için az miktarda (1.5-50 ng) DNA örneğinin yeterli olması mikrosatellitlerin güvenli belirteçler olduğunun göstergesidir (Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006, Semagn vd 2006). Mikrosatellitler kodominant olarak kalıtılırlar, yani mikrosatellitler sayesinde genetik çaprazlamalar gerektirmeksizin homozigot ve heterozigot genotipler kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (Gillet 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Bandelj vd 2004). Mikrosatellit analizleri sırasında farklı PCR ürünleri karıştırılarak aynı jele yüklenebilir veya aynı anda birkaç mikrosatellit belirteci kullanılarak multipleks PCR kurulabilir. Böylece, zaman, işgücü ve maddi açıdan büyük kazanç sağlanır. Bu özelliklerinin yanı sıra, bir tür için bulunan ve/veya tasarlanan belirteçlerin yakın türler için de kullanılabilmesi en büyük avantajlarından biridir (Anzidei vd 1999, Echt vd 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006). Mikrosatellit lokuslarındaki mutasyon oranı canlı türlerine göre değişiklik (10^{-2} - 10^{-6} nükleotid/lokus/nesil) göstermektedir. Aynı canlı türündeki ve/veya aynı genomdaki diğer lokuslara göre daha yüksektir (Eisen 1999, Hancock 1998, Estoup ve Cornuet 1998, Amos 1998, Li vd 2002, Ribeiro vd 2002, Oliveira vd 2006). Mikrosatellit lokuslarındaki yüksek mutasyon oranını ve dolayısıyla mikrosatellit dizilerindeki varyasyonları (tekrar sayısındaki değişimlerin) açıklayan temelde iki mutasyonel süreç vardır; (1) "Slipped-strand mispairing (SSM)" (kaymış iplikle eşleşme hatası) ve (2) DNA zincirleri arasındaki eşit olmayan rekombinasyon (unequal recombination). "Slipped-strand mispairing (SSM)" DNA basit dizi tekrarlarının (mikrosatellitlerin) evrimini ve kökenini açıklayan DNA sentezi sırasında meydana gelen mutasyonel bir süreçtir. "Slipped-strand mispairing (SSM)" ile mikrosatellit dizisinde, DNA sentezi sırasında bir veya daha fazla sayıda tekrar bölgesinin kazanılması (insersiyon) veya kaybedilmesi (delesyon) ile varyasyonlar meydana gelir (Eisen 1999, Li vd 2002, Semagn vd 2006).

Mikrosatellit analizlerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. SSR analizleri sırasında "null" allellere rastlanması bu dezavantajlardan biridir. Bu alleller amplifiye olmaz, bu nedenle jelde görünmezler. Bunun sonucunda ise heterozigotların eksik değerlendirilmesine neden olabilirler. Ancak, bu durum sıklıkla rastlanılan bir durum

değildir (Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Varshey vd 2005). SSR analizlerindeki bir diğer önemli sorun da mono- ve di-nükleotid tekrarların analizinde amplifikasyon sırasında DNA polimerazın yanlışlıkla farklı büyüklüklerdeki ürünler vermesidir. Bu ürünler çoğunlukla istenilen veya çalışılan bölge ürününden daha az yoğun olmakta ve göz ardı edilmektedir. Bununla birlikte, heterozigot bireylere ait farklı ürünlerde (istenilen ve yanlışlıkla çoğaltılan) çakışma olursa istenilen bölge ürününün ayrıştırılması zorlaşmaktadır. Daha önce çalışılmış ve bant büyüklüğü bilinen iç standart kullanılması bu problemi çözülebilir (Robinson ve Harris 1999, Scotti vd 1999, Oliveira vd 2006).

Mikrosatellit bölgelerinin belirlenmesi, izolasyonu, dizi analizleri ve belirteçlerin denenmesi, zaman ve uzmanlık gerektiren pahalı bir işlemdir. Yeni primerlerin elde edilmesinin en etkili yöntemlerini şöyle sıralayabiliriz: a) kaynakların taranarak uygun primerlerin tespit edilmesi, b) veri bankalarındaki dizilerden yararlanarak yeni primerlerin dizayn edilmesi ve c) primer geliştiren alanında uzman bir araştırma laboratuvarı ile birlikte çalışılmasıdır (Scotti vd 1999, Varshney vd 2005). Örneğin; Vendramin vd (1996) tarafından *P. thunbergii* Parl. kloroplast genomundan elde edilen 20 çift primer kullanılarak, bu türe yakın birçok ağaç türünde farklı amaçlarla moleküler genetik analizleri yapılmıştır (Bucci vd 1998, Echt vd 1998, Cuenca vd 2003, Gomez vd 2005, Hansen vd 2005, Höhn vd 2005, Navascues vd 2006, Naydenov vd 2005a, Naydenov vd 2005b, Naydenov vd 2006, Terrab vd 2006, Vaxevanidou vd 2006, Bucci vd 2007, Myers vd 2007, Fady vd 2008, Kaya vd 2008, Navascues vd 2008, Dzialuk vd 2009, Gaspar vd 2009, Scalfi vd 2009, Heuertz vd 2010, Soto vd 2010).

Kloroplast mikrosatellit belirteçleri (cpSSR) genetik parmak izi ve gen akımının analizinde kullanışlıdır. Eşleşme sisteminin ve babalık tayini ile polen dağılımının belirlenmesi için anne ağacın ve anne ağacın farklı tohumlarının (oğul döllerinin) genotipinin ve hatta onları çevreleyen polen kaynaklarının (babanın) genetik yapısının bilinmesi gerekir. Bu amaçla yüksek derecede polimorfizm gösteren genetik belirteçlerin seçilmesi önemlidir (Austerlitz vd 2004). Eğer uygun genetik belirteç seçilmiş ise

polenlerin populasyon içinden (lokal) mi yoksa populasyon dışından (yabancı) mı, hangi polen kaynağından hangi oranda geldiği belirlenebilir (Ennos 1994).

Eşleşme sistemi ve polen kirliliğinin belirlenmesinde öncelikle kendi kendine döllenme yoluyla oluşan canlı bireylerin oranının belirlenmesi gerekir. Tek bir lokus bakımından ve birden fazla lokusa dayalı olarak belirlenen oğul döl genotipleri kullanılarak birçok eşleşme sistemi tahmin yöntemi geliştirilmiştir. Fakat bunların hepsi aynı basit modele dayanarak yapılır. Bu model "karışık eşleşme modeli" dir. Bu model, eşleşmeyi iki bileşene ayırır: Rastgele eşleşme ve kendi kendine döllenme (Helgason ve Ennos 1991). Karışık eşleşme modeli şu varsayımlar üzerine kurulur: a) Her eşleşme olayı rastgele kendinden-başka-bireylerle döllenme (t) veya kendi-kendine döllenme ($s=1-t$) sonucudur ve bütün embriyolar eşit uyuma sahiptir, b) Polen havuzundaki allellerin frekansı anne ebeveyn bitkilerin tümününkiyle benzerdir, c) Bir kendinden-başka-bireylerle döllenmenin meydana gelme olasılığı anne ebeveyn genotipinden bağımsızdır. Sonuçlar genellikle tahmin edilen kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı (t) terimiyle bildirilir. Yukarıdaki modele dayanarak, kendinden-başka-bireylerle döllenme (outcrossing) sonucu oluşmuş bireylerin oranını hesaplamak için Shaw vd (1981) tarafından tanımlanan çok-lokusa dayanan tahmin kullanılır. Çok-lokusa dayanan tahmin yöntemi, kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının tahminini yapmak için birden fazla lokusdan elde edilen bilgileri kombine etmektedir. Bir tohum bahçesinde çok sayıda klon olması (örneğin >25) ve bahçenin deseninin oluşturulmasında aynı klonun rametlerinin belirli aralıklarla yerleştirilmesi, genel olarak kendileme ürünü tohumların oranını azaltmada etkili olmaktadır. Ortalama olarak klonal tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme sonucu oluşmuş tohumların bireylerin oranının yüksek olduğu ($> \%90$) bulunmuştur (Adams ve Birkes 1989).

Kloroplast mikrosatellit analizleri ile belirli bir tohum bahçesinde polen kirliliği (kontaminasyonu) düzeyinin belirlenmesinde, tohum bahçesindeki her bir klonun kloroplast mikrosatellit (cpSSR) lokusları bakımından haplotip kimliklerini, ayrıca tohum bahçesi dışındaki doğal populasyondaki bireylerin haplotip kimliklerini ve haplotiplerin frekanslarını belirlemek önemlidir. Anne-baba bireylerin (ebeveynlerin) genotipleri

saptandıktan sonra tohum bahçesindeki bireyler üzerinde oluşan belirli sayıda tohumun embriyolarının çalışılan bütün lokuslar bakımından genotipleri belirlenir ve ebeveynlerin genotipleri ile karşılaştırılır. Burada amaç bir tohumun tamamen tohum bahçesi içindeki bireylerin gametlerinin döllenmesiyle üretilip üretilmediğini belirlemektir. Eğer bir tohumun embriyosunun genotipinde tohum bahçesi içinde bulunmayan bir allel tespit edilmiş ise o zaman bu tohum açıkça bir yabancı polen (yabancı baba, kontaminasyon) ürünüdür. Bu bilgiye dayanarak genetik kirliliğin minimum tahmini yapılır.

Gerçek kirlilik (kontaminasyon) oranını belirleyebilmek için, çalışılan lokuslar bakımından, tohum bahçesi gen havuzundaki allellerin frekanslarıyla yakın doğal populasyonların gen havuzundaki allellerin frekanslarının karşılaştırılması gerekir. Çünkü tohum bahçesi dışındaki doğal populasyonun gen havuzundaki allellerin bazıları tohum bahçesi gen havuzunda da olabilir. Yani tohum bahçesi dışından gelen bir allel, dışarıdan gelmemiş olsa bile, ortak bir türe ait oldukları için tohum bahçesi içindeki bireylerin genotipinde de bulunabilir. Fakat aynı allelin tohum bahçesi gen havuzunda ve tohum bahçesi dışındaki komşu populasyonların gen havuzunda frekansı farklı olabilir. Bu durumda tohum bahçesi gen havuzuna tohum bahçesi dışından gelen bir polen ile farklı bir allelin girişi söz konusu olmayabilir, fakat dışarıdan gelen polenin taşıdığı allel o allelin tohum bahçesi gen havuzundaki frekansını değiştirdiğinden bu da bir genetik kirlilik (kontaminasyon) olarak değerlendirilir. Tohum bahçesinden elde edilen tohumlarda tohum bahçesinde bulunmayan farklı bir allele rastlanırsa ve ayrıca hem tohum bahçesi gen havuzu hem de yakın doğal populasyonun gen havuzundaki ortak allellerin frekansındaki farklılıklar bilinirse gerçek kirlilik (kontaminasyon) düzeyi tahmin edilebilir. Bu nedenle birçok tohum bahçesinde gerçek kirlilik düzeyinin, tahmin edilen minimum kirlilik düzeyinin muhtemelen iki katı olduğu ileri sürülmektedir (Harju ve Muona 1989).

Polen kirliliği (kontaminasyonu) ve eşleşme şekillerinin incelenebilmesi için iğne yapraklı (konifer) ağaç türleri model organizma olarak kabul edilirler. Çünkü çeşitli belirteçlerle yapılan (izoenzim, RAPD, mikrosatellit belirteçleri vb.) çalışmalarda koniferlerin yüksek düzeyde genetik çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca embriyoya

katkıda bulunan anasal ve babasal gametlerin genotipleri ayrı ayrı saptanabilmesi bu tür çalışmalar için önemli yere sahiptir (Burczyk 1996).

1.7 Çalışmanın Amacı

Bu çalışma ile Çığlık-Antalya mevkiinde kurulmuş bulunan Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespikli) orijinli 38 no'lu kızılçam klonal tohum bahçesinde ve bu tohum bahçesinin yakın çevresinde yer alan doğal kızılçam populasyonunda kloroplast basit dizi tekrarları (cpSSR) primerleri kullanılarak, DNA düzeyinde analizler yapılmıştır. Çalışmada;

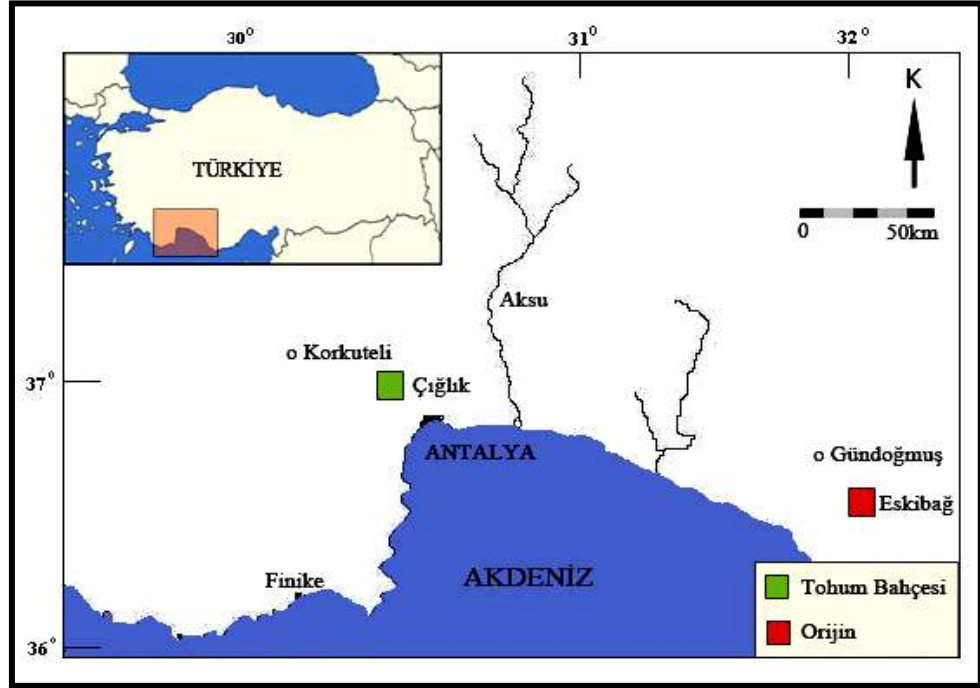
- 1) Kızılçam (*P. brutia* Ten.) türüne ait populasyonlarda populasyon genetiği ile ilgili çalışmalarda kullanılabilecek, DNA düzeyindeki varyasyonları gösteren kloroplast SSR (cpSSR) belirteçlerini belirlemek ve optimize etmek,
- 2) 38 no'lu kızılçam klonal tohum bahçesindeki klonlardan ve bu tohum bahçesinin yakın çevresinde yer alan doğal populasyondan toplanacak örneklerde cpSSR belirteçlerinin polimorfizm düzeyini belirlemek,
- 3) Çalışmaya konu olan tohum bahçesindeki her bir klonun optimize edilebilen her bir primer çifti için cpSSR haplotip kimliklerini belirlemek,
- 4) Tohum bahçesi dışındaki doğal populasyondaki bireylerin DNA'ları üzerinde yapılan cpSSR analizleri ile haplotipleri ve haplotiplerin frekanslarını belirlemek, böylece doğal populasyonun polen gen havuzu hakkında bilgi edinmek,
- 5) Kloroplast SSR (cpSSR) belirteçlerini kullanarak adı geçen kızılçam tohum bahçesinde komşu populasyondan gelen polenlerle gerçekleşen döllenme oranını (polen kirliliği düzeyini) tahmin etmek amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 Tohum Bahçesinin Özellikleri

Araştırma için seçilen 38 no'lu tohum bahçesi, Antalya Orman İşletme Müdürlüğü, Düzlerçamı Şefliğine bağlı, Çıgılık-Antalya mevkiinde yer alan, Antalya'da kızılçam türüne ait olan 12 tohum bahçesinden birisidir (Şekil 2.1, Şekil 2.2). Bu tohum bahçesi T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığının Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü (OATIAM) tarafından Şubat 1992 yılında kurulmuştur. Tohum bahçesinin orijini, Antalya il sınırları içinde, 132.1 ha'lık alana sahip ve denizden 1000 m yükseklikte yer alan Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespikli) tohum meşceresidir. Başka bir deyişle, tohum bahçesini oluşturan klonların aşı çelikleri Gündoğmuş-Eskibağ'daki (kuzey enlemi 36° 44' 13" ve doğu boylamı 32° 08' 00") doğal popülasyonda belirlenen plus ağaçlardan alınmıştır. Belirli karakterler bakımından (boy, gövde çapı, odun kalitesi gibi) bu popülasyonda iyi görünüşlü (fenotipi iyi) olan 30 ayrı ağaçtan (ortet) aşı kalemleri alınmıştır. Aynı ortetten alınan aşı kalemleri genotip olarak tıpatıp aynıdır ve bunlar kendi aralarında belirli bir klonu oluştururlar.

Tohum bahçesinin kuruluş yeri Antalya Orman İşletme Müdürlüğü, Düzlerçamı Şefliği olup, küresel konum belirleme (GPS) aleti ile yapılan ölçümlere göre 37° 01' 30" kuzey enlemi ile 30° 32' 54" doğu boylamı arasında yer almaktadır. Tohum bahçesinin kuş uçuşu denize uzaklığı yaklaşık 20 km ve denizden yüksekliği yaklaşık 320 metredir. Tohum bahçesi 17.8 ha'lık bir alan üzerinde, toplam 30 klon ve bu klonlara ait toplam 2790 rametle (aşılı birey) 8 m x 8 m dikim aralığı ile kurulmuştur (OATIAM 2010). Ancak günümüzde bu tohum bahçesinde, tohum bahçesinin tesisinden (1992 yılı) çalışmanın başlangıç yılına kadar geçen sürede (2008) bazı klonlara ait rametlerin ölmesi ve kaçak kesimler sonucu, 30 klona ait 2163 ramet bulunmaktadır. Tohum bahçesinin kuzey batısından başlayarak kuzeyi boyunca bir yol uzanmaktadır. Tohum bahçesinin kuzey ve kuzey batısında yaklaşık 170 m uzaklıkta *Pinus brutia* doğal popülasyonu yer almaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.1 Kızılcām tohum bahçesinin kurulduğu alan (Çıglık) ve bahçedeki klonların getirildiği orijinin yeri (Gündoğmuş-Eskibağ) (Gün 2010)



Şekil 2.2 Kızılcām tohum bahçesinin uydudan alınan görüntüsü [Klonlara ait her bir ağaç (rametler), resmin ortasındaki sıra ve sütunlarda birer nokta halinde görülmektedir, tohum bahçesinin kuzeyindeki yerleşim alanı, Çıglık köyüdür.] (Google Earth 2010)

2.2 Analizler için Kozalak ve İbre Örneklerinin Toplanması

Tohum bahçesinde örnekleme için ilk olarak, tohum bahçesinde yaşayan ağaçlar saptandı ve kroki üzerinde işaretlendi. Sonra, çalışma alanının yerleşim planı hazırlandı (EK-1). Çalışmada, tohum bahçesindeki 30 klonun 25 tanesinden birer adet olmak üzere toplam 25 ağaç (ramet) seçildi. Otuz klonun geri kalan 5 klonu için ise her birinden 5 ramet olmak üzere (aynı klona sahip olduğu varsayılan rametlerin, gerçekten aynı klondan olup olmadığını ve herhangi bir etiketleme hatası olup olmadığını belirlemek için) toplam 25 ağaç alındı. Böylece, tüm tohum bahçesinden toplam 50 ağaç rastlantısal olarak seçildi. Her birinden 5'er ramet alınan klonlar 9282, 9289, 9290, 9294, 9295 numaralı klonlardır. Tohum bahçesi içerisinde seçilen ağaçların konumları, EK-1'deki tohum bahçesine ait kroki üzerinde ayrıca gösterildi.

Polen kirliliği oranını tahmin edebilmek için tohum bahçesinden rastlantısal olarak seçilen 30 klona ait toplam 50 ağaçtan Nisan 2008'de tohum taşıyan iki yaşını tamamlamış kozalaklar toplandı. Kozalaklar toplanırken her bir ağacın alt, orta ve üst kısmından ve her yönünden en az birer kozalak toplanmasına dikkat edilerek, her bir ağaç için yaklaşık 15-20 kozalak alındı. Her bir anaç ağaçtan toplanan kozalaklar ayrı ayrı torbalara konuldu ve torbaların üzerine ağacın kimliğini belirten bir etiket yapıştırıldı (Kaya 2001). Böylece tüm tohum bahçesinde seçtiğimiz 50 adet bireyden toplam yaklaşık 1000 kozalak toplandı. Ayrıca, Mayıs 2008'de tohum bahçesine en yakın doğal popülasyona ait (tohum bahçesine uzaklığı yaklaşık 170 m) 47 ağaç, rastlantısal olarak aralarında en az 30 m mesafe olacak şekilde seçildi. Bu 47 ağaca ait kozalak ve ibre örnekleri toplandı (Şekil 2.3). Doğal popülasyona ait her bir ağacın kozalakları ve ibreleri ayrı ayrı torbalara konuldu ve torbaların üzerine ağacın kimliğini belirten bir etiket yapıştırıldı (Şekil 2.4). Her bir ağaçtan toplanan ibreler DNA izolasyonları yapılncaya kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 2.3 Doğal kızılçam populasyonunda ibre ve kozalak toplanması (Foto: Banu Bilgen, Mayıs 2008)



Şekil 2.4 Doğal kızılçam populasyonunda ibre toplanması ve etiketli torbalara konulması (Foto: Banu Bilgen, Mayıs 2008)

2.3 Kozalaklardan Tohumların Çıkarılması

Tohum bahçesinden ve en yakın doğal popülasyondan toplanan kozalaklar laboratuvara getirildikten sonra, açılan kozalaklardan çıkan tohumların rüzgar v.b. etkilerle karışmaması için, her ağaca ait kozalaklar, ayrı ayrı etiketlenmiş file şeklindeki torbalara konuldu [Fileler kozalaklar açılıp tohum serbest kaldığında tohumlar dökülmeyecek ve file içinde kalacak şekilde gözeneklere sahiptir] (Kaya 2001). Fileler, binanın çatısında düz bir zemine, aralarında yaklaşık bir metre mesafe olacak şekilde yerleştirildi (Şekil 2.5). Kozalakların açılmasını hızlandırmak için fileler sabah ve akşamüstü olmak üzere günde 2 kez yağmurlama ıslatıldı. Böylece doğal koşullarda, güneş sıcaklığı altında kozalakların daha kısa sürede açılması sağlandı. Kozalaklar her gün kontrol edildi. Fileler elle sallanarak açılan kozalaklardan serbest kalan tohumlar; tohumların kimlikleri (Popülasyon adı, Anaç kodu, Ramet kodu) ile etiketli torbalara aktarıldı (Şekil 2.6). Çıkarılan tohumlar kanatlarından temizlendi ve yine kimliklerini belirten etiketli torbalara konuldu (Şekil 2.7). Tohumlar DNA izolasyonları yapılmıncaya kadar +4°C’de saklandı.



Şekil 2.5 Kozalakların etiketli file torbalar içinde güneşte kurutulması (Foto: Banu Bilgen, Nisan 2008)



Şekil 2.6 Açılan kozalaklardan tohum çıkarılması (Foto: Banu Bilgen, Nisan 2008)



Şekil 2.7 Çıkarılan tohumların kanatlarından temizlenmesi ve etiketli torbalara konulması (Foto: Banu Bilgen, Haziran 2008)

2.4 İbre Örneklerinin Kurutulması ve Hazırlanması

Doğal popülasyona ait ibre örnekleri önce silika jelde kurutuldu. Silika jel nemi çekme özelliğine sahip granül yapıda bir maddedir ve nemin çekilmesi sonucu renk değiştirmektedir. Silika jel ile kurutma yönteminde, örnekler önce kağıt poşet içine, kağıt poşet de daha geniş bir kilitli plastik poşet içine konuldu. Plastik poşetin içine silika jel konulup örnekteki nemin çekilmesi ve silika jelin renk değiştirmesi beklendi (Şekil 2.8). Kullanılan silika jelin rengi başlangıçta mavi olup nemli ortamlarda içine nem çektikten sonra rengi pembeye dönüşmektedir (Weintraub 2002). Silika jel değiştirme işlemi 5 kez tekrarlandı. Örneklerin silika jel ile kurutulma süreleri örneğin miktarına, silika jelin kalitesine ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Kızılçam ibre örneklerinden ortalama 30 gram (g) materyalin kurutulması için dört-beş günde bir silika jel değiştirilerek yaklaşık bir ay içinde kuru bitki materyali elde edildi. Kuru bitki materyali silika jel içeren poşette oda sıcaklığında aylarca hatta yıllarca rahatlıkla saklanabilmektedir (Şekil 2.8). Kurutulan ibre örnekleri, DNA izolasyonu yapılmadan önce porselen havan içerisinde sıvı azot yardımı ile toz haline gelinceye kadar ezildi (Şekil 2.9). Toz haline getirilmiş ibre örnekleri kimlikleri etiketli 2 ml tüplere konuldu ve DNA izolasyonları yapılınca kadar bitki genetiği laboratuvarında derin dondurucuda (-20 °C’de) saklandı.



Şekil 2.8 Silika jeli değiştirilmiş bir örnek (mavi silika jelli, solda) ile silika jelinin değiştirilme zamanı gelmiş olan bir örnek (pembe silika jelli, sağda) (Foto: Yusuf Kurt, Şubat 2009)



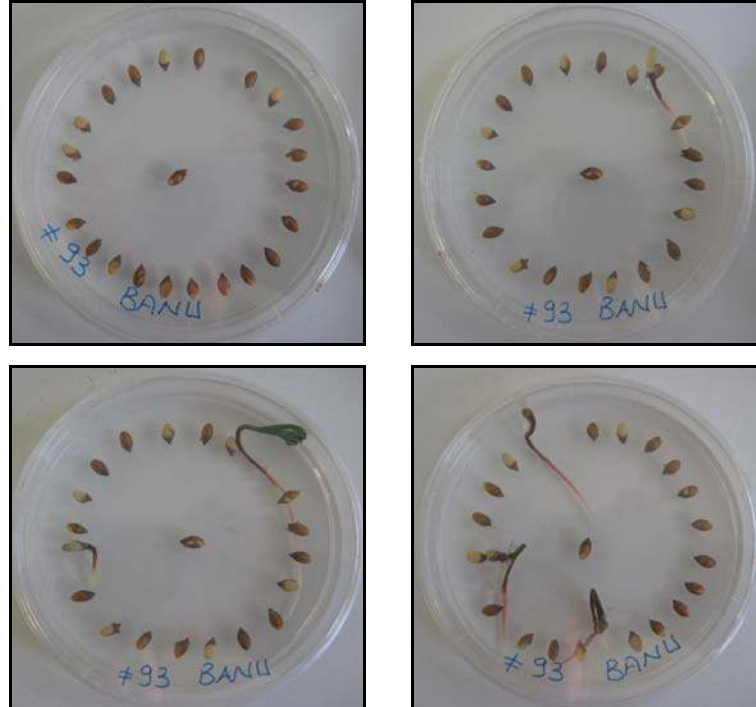
Şekil 2.9 Silika jel ile kurutulmuş (solda) ve sıvı azotla toz haline getirilmiş ibre örneği (sağda) (Foto: Banu Bilgen, Aralık 2009)

2.5 DNA İzolasyonlarının Yapılması

Bu çalışmada, tohum bahçesindeki 30 klondan toplam 50 ağaçtan (rametten) toplanan tohumların haploid megagametofitik (endosperm) dokusundan ve embriyo dokusundan DNA izolasyonu yapıldı. Tohum bahçesi içerisindeki her bir klona ait her bir bireyden (rametten) haploid megagametofit dokudan ve 10 tohumun embriyo dokusundan (toplam 300 embriyo), tohum bahçesi dışından toplanan 47 ağaçtan ise, tohumların megagametofitik (endosperm) dokusundan veya kozalak toplanamayan ağaçların ibrelerinden DNA izole edildi.

Tohumların megagametofitik ve embriyo dokularına ait DNA izolasyonlarına başlanmadan önce, embriyoları elde etmek amacıyla her bir klona ait bireyin tohumları çimlendirildi. Tohumlar önce %1'lik H_2O_2 (Hidrojen peroksit) içerisinde 30 dakika bekletildi; sonra da birbirine değmeyecek şekilde, içerisinde Whatman kağıdı konmuş, klon numarası ile etiketlenmiş steril petri kaplarına dizildi. Nemliliği sağlamak için petri kaplarının içerisinde bir miktar distile su ilave edildi ve gerek duyuldukça distile su ilavesi yapıldı. Petri kapları günlük 12 saat aydınlatma ve 24°C sıcaklıktaki iklim odasına yerleştirildi (Kara 1996, Krugman vd 1974). Yaklaşık 8-10 günde tohumlar çimlenmeye başladı. Çalışmamızda yeterli olacak DNA miktarını elde etmek için çimlenen tohumlardan yaklaşık 1-2 cm embriyoya sahip olanlar DNA izolasyonunda

kullanılmak üzere seçildi. Çimlenen tohumların testası bir bistüri yardımıyla uzaklaştırıldı. Tohumun megagametofit ve embriyo dokusu yine bir bistüri yardımıyla birbirinden ayrıldı. Her bir tohuma ait megagametofit ve embriyo dokusu klon numarası ile etiketlenmiş 2 ml'lik tüplere ayrı ayrı konuldu. Çeşitli nedenlerle (besi dokunun az olması, kontaminasyon problemi vb.) çimlenme yüzdesi çok düşük olan klonlara ait tohumlar *in vitro* olarak çimlendirildi. Bu ağaçlara ait tohumlar öncelikle %100'lük çamaşır suyunda 20 dakika bekletildi; daha sonra 5'er dakika steril distile su ile yıkandı. Steril edilen tohumların testaları bir bistüri yardımıyla steril kabin içinde ayrıldı. Testaları uzaklaştırılmış tohumlar yarı kuvvetli Murashige ve Skoog (MS) besiyeri içeren petrilere yerleştirildi ve petri kapları günlük 12 saat aydınlatma ve 24°C sıcaklıktaki iklim odasına yerleştirildi (Murashige ve Skoog 1962). Yaklaşık 5-6 günde tohumlar çimlenmeye başladı (Şekil 2.10). Her bir tohuma ait embriyo dokusu klon numarası ile etiketlenmiş 2 ml'lik tüplere ayrı ayrı konuldu. Hazırlanan megagametofit ve embriyo doku örnekleri DNA izolasyonları yapılmaya kadar bitki genetiği laboratuvarında derin dondurucuda (-20°C'de) saklandı.



Şekil 2.10 Yarı kuvvetli Murashige ve Skoog (MS) besiyerinde çimlendirilen tohumlar
(Foto: Banu Bilgen, Şubat 2010)

DNA izolasyonunda farklı metotlar bazı modifikasyonlarla denendi (Dellaporta vd 1983, Doyle ve Doyle 1990, Ostrowska vd 1998, Ozel 2001, Içgen 2002, Crowley vd 2003, Ceuca vd 2008, Kaya vd 2008, Palomera-Avalos vd 2008). Ayrıca Nucleospin Plant (Genomik DNA from plant Kit) DNA izolasyon kiti ve Vivantis GF-1 Plant DNA Ekstraksiyon Kiti denendi. Bu denemeler sonucunda, DNA miktarı, DNA kalitesi ve saflığı açısından cpSSR çalışması için en uygun DNA, Dellaporta vd (1983)'den modifiye edilmiş metot kullanılarak elde edildi. Bu nedenle DNA izolasyonlarında bu metot kullanıldı.

DNA izolasyonlarında kullanılan yöntemin basamakları şöyle özetlenebilir:

- 1) 2 ml tüplerde bulunan ve önceden ayrı ayrı hazırladığımız megagametofit, embriyo ve sıvı azotla ezilmiş halde saklanan ibre örnekleri -20 °C'den alındı.
- 2) Her bir örnek 200 µl 65 °C'de ısıtılmış özütleme tamponu ile cam baget kullanılarak ezildi.
- 3) Daha sonra her bir tüpe 800 µl özütleme tamponu eklendi, megagametofit, embriyo ve ibre örneklerinin iyice ezilmesi sağlandı (son hacim 1000 µl).
- 4) Her bir tüpe %1'lik Polivinilpirolidon (PVP) eklendi ve karıştırıldı.
- 5) 130 µl %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi ve karıştırıldı.
- 6) Örnekler 65 °C su banyosunda 45 dakika bekletildi ve ara sıra nazikçe karıştırıldı.
- 7) Örnekler su banyosundan alındıktan sonra üzerine 350 µl soğuk 5 M Potasyum asetat (KAc) eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
- 8) Daha sonra örnekler buzlu kap içerisinde +4 °C'de 30 dakika bekletildi.
- 9) +4°C'den alınan tüpler 13000 rpm'de +4 °C'de 25 dakika santrifüj edildi [Eğer üstteki sıvı kısım (supernatant) kirli ise yeni tüpe alındı ve basamak tekrarlandı].
- 10) Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı kısım (supernatant) temiz 1.5 ml tüplere aktarıldı.
- 11) Üzerine 0.8 ml soğuk İzopropanol (İzopropil alkol) eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
- 12) Tüpler +4°C'de bir gece veya -20 °C'de 2 saat bekletildi.

- 13) Daha sonra +4°C’de 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım döküldü.
- 14) Kalan isopropanolü iyice uzaklaştırmak için kısa süreli santrifüj edildi.
- 15) Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine konuldu ve bir süre bekletilerek pelletin (DNA çökeltisinin) kuruması sağlandı.
- 16) 100 µl 50 mM Tris/10 mM EDTA çözeltisi eklendi.
- 17) Pelletin iyice çözülmesi için 37°C’de 30 dakika bekletildi.
- 18) Her bir tüpe 11 µl 3 M Sodyum asetat (NaAc) eklendi ve karıştırıldı.
- 19) Daha sonra 100 µl isopropanol eklendi ve nazıkçe karıştırıldı.
- 20) -20 °C’de 30 dakika bekletildi.
- 21) +4°C’de 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım döküldü.
- 22) Kalan isopropanolün iyice uzaklaştırılması sağlandı.
- 23) Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine konuldu ve bir süre bekletilerek pelletin kuruması sağlandı.
- 24) Pellete 1 ml soğuk %70’lik Etil alkol eklendi.
- 25) +4°C’de 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi, üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- 26) Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerine konuldu ve bir süre bekletilerek pelletin kuruması ve etil alkolün iyice uzaklaştırılması sağlandı.
- 27) Pellete 100 µl saklama tamponu eklendi.
- 28) Pelletin çözünmesini sağlamak için 30 dakika 37°C’de bekletildi.
- 29) Her bir örnek, 2.5 µl DNA ve 0.5 µl yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılarak %1’lik agaroz jellerinde 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponunda 80 Voltta 15 dakika yürütüldü.
- 30) Elektroforez işleminden sonra jeller 5 µg/ml’lik Etidyum bromid (EtBr) solüsyonu ile 20 dakika boyandı ve DNR Mini BIS Pro Bio-Imaging Systems jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Şekil 2.11).
- 31) Elde edilen DNA’lar -20 °C’de saklandı.

Kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışları EK-2’de ayrıntılı olarak belirtilmiştir. DNA izolasyonundaki özütleme tamponunun bileşenlerinden 2-merkaptotanol, antioksidan olarak görev yapar ve polifenollerin oksidasyonunu engeller; NaCl, polisakkaritleri uzaklaştırmada rol oynamaktadır. EDTA, hücrede bulunan DNazların

çalışmasında kofaktör olarak görev yapan Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi bivalent metal iyonlarını bağlayarak DNazların DNA'ya zarar vermesini engeller. Tris-HCl, hücre zarının dış kısmında bulunan lipopolisakkaritlerle etkileşerek hücre zarının geçirgenliğine yardımcı olur. PVP, fenolik bileşiklerle kompleks hidrojen bağları oluşturur ve bu bileşiklerin santrifüj esnasında DNA'dan ayrılmasını sağlar. SDS, zar lipidlerini uzaklaştırarak hücre zarının parçalanmasını sağlayan bir deterjandır. Potasyum asetat ve Sodyum asetat ise DNA'ya bağlı olan hücresel veya histon proteinlerini uzaklaştırmak için kullanılır. İsoopropanol, DNA'nın çökmesini sağlar, çünkü soğuk isopropanol veya etanol gibi alkollerde DNA çözünmez ve bir araya gelerek santrifüj sonucunda pelleti (DNA çökeltisi) oluşturur. Saklama tamponu bileşenlerinden RNaz ise RNA'nın parçalanarak uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır (Semagn vd 2006).



Şekil 2.11 DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri (L: DNA Merdiveni (Ladder), E: Embriyo, M: Megagametofit, D.P: Doğal Populasyon)

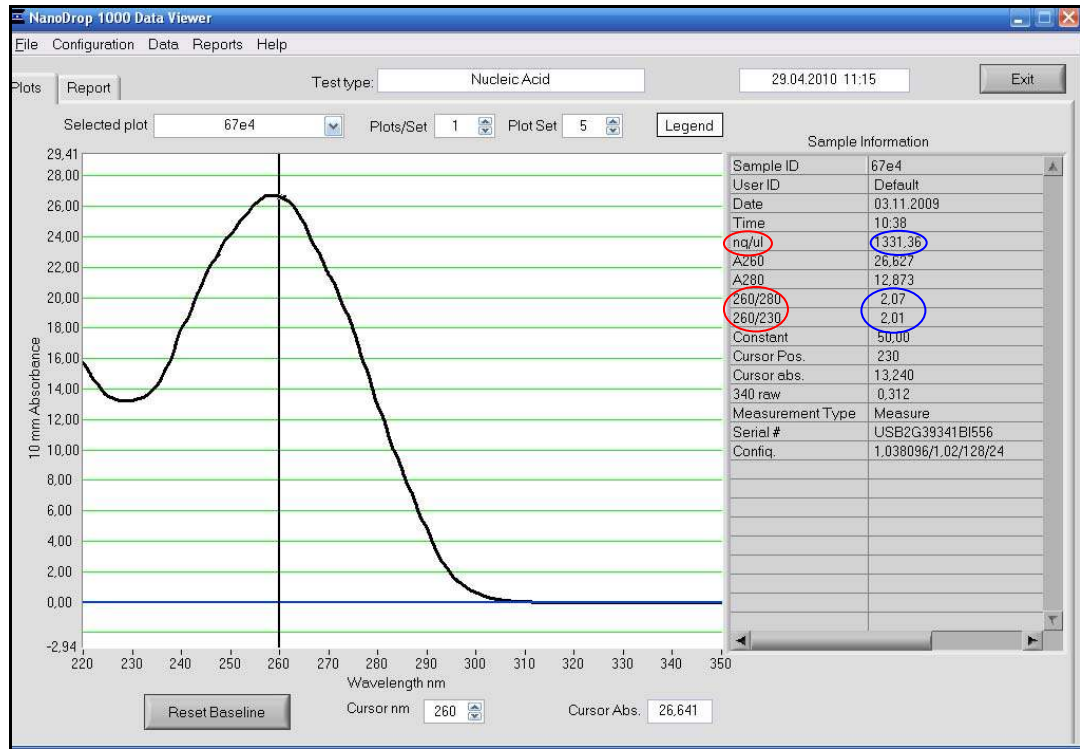
2.6 DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

Elde edilen DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi (UV ışığı altında 260nm/280nm ve 260nm/230nm absorbans oranları) NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 cihazı ile ölçüldü (Çizelge 2.1 ve Şekil 2.12). DNA'nın miktarı ve kalitesi, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerler ile belirlenir. DNA'nın temizliği

için $A_{260/280}$ ve $A_{260/230}$ değerleri önemlidir. Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlar da 230 nm dalga boylarında en yüksek değeri vermektedir. Temiz bir DNA'da $A_{260/280}$ değeri 1.80 ile 2.00 arasında; $A_{260/230}$ oranı ise 2.00'den büyük olmalıdır. Tohum bahçesindeki her bir klona ait en iyi DNA miktarına ve kalitesine sahip 10 adet embriyo ve 1 adet megagametofit, doğal popülasyona ait her bir ağaçtan 1 adet megagametofit veya ibre örneği seçildi ve DNA'ları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi için 50 ng/μl olacak şekilde seyreltilti.

Çizelge 2.1 Elde edilen DNA örneklerinin miktar ve kalite ölçüm sonuçları (Minimum ve maksimum değerler)

Kullanılan doku	Örnek sayısı	Elde edilen DNA miktarı (ng/μl)	DNA kalitesi	
			$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Megagametofit	223	103.8 – 536.1	1.97 - 2.17	1.45 - 2.15
Embriyo	544	220 – 1363.8	1.89 - 2.16	1.73 - 2.40
İbre	6	266.4 - 1156.3	1.81 - 1.95	1.30 - 1.47



Şekil 2.12 NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 ile miktar ve kalitesi ölçülmüş bir DNA örneği

2.7 Kloroplast Mikrosatellit (cpSSR) Primerlerinin Belirlenmesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Elde ettiğimiz DNA örnekleri üzerinde Vendramin vd (1996) tarafından *Pinus thunbergii* Parl. genomundan geliştirilen 20 çift cpSSR primerleri *P. brutia* DNA'ları üzerinde denendi (Çizelge 2.2). *Pinus nigra*, *Pinus uncinata*, *Pinus sylvestris*, *Pinus canariensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus thunbergii*, *Picea abies*, *Pseudotsuga menziesii* ve *Abies* türleri ile yapılan farklı çalışmalardaki Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) koşulları da dikkate alınarak en uygun PCR koşulları belirlendi (Vendramin vd 1996, Dzialuk ve Burczyk 2004, Vaxevanidou vd 2006, Afzal-Raffi ve Dodd 2007, Kaya vd 2008, Dzialuk vd 2009). PCR optimizasyonu için değişik DNA miktarı (20ng, 30ng, 40ng, 50ng ve 100ng), primer (0.2µM, 0.4µM, 0.5µM ve 0.6µM), MgCl₂ (2.5mM, 3mM ve 4mM) ve Taq DNA polimeraz (1U ve 1.5U) konsantrasyonları denendi. Optimum reaksiyon koşulları Çizelge 2.3'de verilmiştir. Ayrıca, çalışma için belirlenen cpSSR primerleri kullanılarak kızılçamdaki cpSSR lokuslarını çoğaltmak için uygun olan PCR döngüleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

PCR işlemi için karışım hazırlanırken öncelikle seyreltilmiş olan DNA'dan 1 µl (50 ng/µl) tüplere konmakta ve daha sonra ise hazırlanan karışımdan (master mix) 24 µl koyulup toplam hacim 25 µl olarak ayarlanmaktadır. DNA amplifikasyonları Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'de verilen koşullarda Nyxtechni Amplitronyx 6 Thermal Cycler with 0.2 ml Gradient Block kullanılarak sağlandı. DNA amplifikasyonlarını kontrol etmek için elde edilen PCR ürünleri (her biri için 5 µl), 1 µl yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılarak %2'lik agaroz jellerinde yürütüldü. Jeller 1X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu bulunan ortamda 70 Voltta 2 saat yürütüldükten sonra 5 µg/ml'lik etidyum bromid solusyonu ile 20 dakika boyandı ve DNR Mini BIS Pro Bio-Imaging Systems jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi. Denenen 20 cpSSR primer çiftinden *P. brutia* için optimize edilebilen 6 primer çifti tohum bahçesindeki polen kirliliği düzeyinin belirlenmesi için kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Vendramin vd (1996) tarafından *Pinus thunbergii* genomundan geliştirilen cpSSR primerlerine ait bilgiler

Primer kodu	Primer Dizisi (5'-3') [F:Forward (ileri) primer, R:Reverse (geri) primer]	Tm** (°C)
*Pt1254	F: 5'-FAM-CAATTGGAATGAGAACAGATAGG-3' R: TGC GTTGC ACTTC GTTATAG	57.8
Pt9383	F: AGAATAAACTGACGTAGATGCCA R: AATTTTCAATTCTTTCTTTCTCC	58.0
*Pt15169	F: 5'-FAM-CTTGATGGAATAGCAGCC-3' R: GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA	58.3
Pt26081	F: CCCGTATCCAGATATACTTCCA R: TGGTTTGATTTCATTCGTTTCAT	58.0
*Pt30204	F: 5'-HEX-TCATAGCGGAAGATCCTCTTT-3' R: CGGATTGATCCTAACCATAACC	58.0
Pt36480	F: TTTTGGCTTACAAAATAAAAAGAG R: AAATTCCTAAAGAAGGAAGAGCA	58.1
*Pt41093	F: 5'-HEX-TCCCGAAAATACTAAAAAAGCA-3' R: CTCATTGTTGAACTCATCGAGA	58.0
Pt45002	F: AAGTTGGATTTTACCCAGGTG R: GAACAAGAGGATTTTTTCTCATACA	58.0
Pt48210	F: CGAGATTGATCCGATACCAG R: GAGAGAACTCTCGAATTTTTTCG	58.1
Pt51873	F: AATCTTTCTACGGAACGGAAA R: ATCATTTTGTGCTATGCAATGA	57.9
Pt63718	F: CACAAAAGGATTTTTTTTCAGTG R: CGACGTGAGTAAGAATGGTTG	57.9
*Pt71936	F: 5'-HEX-TTCATTGGAAATACACTAGCCC-3' R: AAAACCGTACATGAGATTCCC	58.1
Pt79951	F: CTTTTGTTTTTCAACAATTGCA R: ACATCTATCTCCCATATCGGC	57.9
*Pt87268	F: 5'-FAM-GCCAGGGAAAATCGTAGG-3' R: AGACGATTAGACATCCAACCC	58.1
Pt100783	F: ATACGTATGTATCCCCTAACTGTCA R: TCAATTTTTTGCCATATCCTGA	58.0
Pt102584	F: TTCATGTAATTCCCAGATCCA R: CATTATGTGCGCGATAATTTC	57.9
Pt107148	F: GTTCATTTCGGGATCCTTAAAA R: GTACTTTCCTTCAGCCAATCTG	58.0
Pt107517	F: AAAGCTTTTATTGCGGCC R: ATGGCAGTTCCAAAAAAGC	58.0
Pt109567	F: TATTATCGAACAACGAGAATAATCC R: TCACTGTCACTCTACAAAACCG	57.8
Pt110048	F: TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA R: TTCGATATTGAACCTTGGACA	58.3

*Polen kirliliği düzeyinin belirlenmesi için kullanılan primerler

** Tm = DNA'nın erime sıcaklığı

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cpSSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları

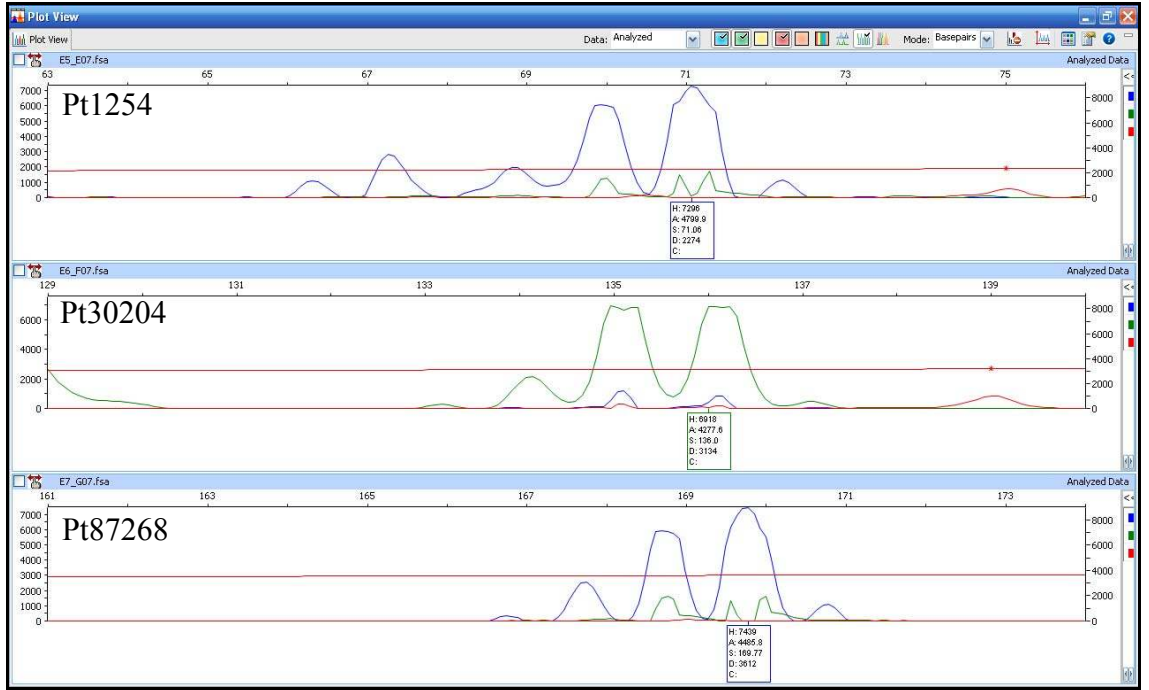
PCR Karışımı	Kullanılan Miktar 1X (µl)	Son Konsantrasyon
10X PCR Tamponu	2.5	1X
MgCl₂ (25 mM)	2.5	2.5 mM
dNTP karışımı (10 mM)	0.5	0.2 mM
Primer F* (5 µM)	1	0.2 µM
Primer R (5 µM)	1	0.2 µM
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	0.3	1.5 U
DNA	1	50 ng/µl
dH₂O	16.2	-
Total	25	-

* Kullanılan primer 5' ucundan floresan boya ile işaretlidir.

Çizelge 2.4 Çalışmada kullanılan cpSSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
1	95 °C	5 dk	1
2	94 °C 55 °C 72 °C	1 dk 1 dk 1 dk	30
3	72 °C	8 dk	1

Polen kirliliğinin belirlenmesi için seçilen primer çiftlerinden forward primerler 5' uçlarından FAM (6-carboxyfluorescein) veya HEX (Hexachloro-6-carboxyfluor) floresan boya ile işaretli olarak, hizmet alımı yoluyla Metabion International AG'ye sentezletirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin DNA parça (fragment) analizleri, hizmet alımı yoluyla REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne yaptırıldı. DNA parça (fragment) analiz sonuçları, Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems) programı ile tarafımızdan değerlendirildi ve her bir primerin oluşturduğu parçaların (fragmentlerin) baz büyüklükleri belirlendi (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 DNA parça analizi sonuçlarının Peak Scanner Software v1.0 programı ile değerlendirilmesi

2.8 Verilerin Değerlendirilme Yöntemleri

Kloroplast DNA'sı haploid genoma sahip olduğu için her bir primer çiftinin çoğalttığı bölge bir lokus, her bir primerin çoğalttığı farklı nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları bir allel olarak değerlendirildi. Bu ilkeye dayanarak, analiz edilen her bir primer için, tohum bahçesindeki klonlara ait bireylerin ve tohum bahçesi yakınındaki doğal populasyondaki bireylerin her birinin sahip olduğu allellerin büyüklüğü belirlendi ve frekansları ayrı ayrı hesaplandı.

Tohum bahçesindeki klonlara ait rametler, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolar ve doğal populasyondan örneklenen bireyler olmak üzere 3 grup ele alındı. Tohum bahçesindeki polen kirliliği düzeyini tahmin edebilmek için tohum bahçesindeki bütün klonların, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyoların ve doğal populasyondaki bireylerin çalışılan lokuslar bakımından genetik çeşitlilik parametrelerinin belirlenmesi için veriler düzenlendi. Tohum bahçesindeki 30 klonun ve doğal populasyondan örneklenen 47 bireyin genotipleri belirlendi. Genetik çeşitliliği belirleyebilmek için her bir grupta, polimorfik lokuslar, polimorfik lokuslardaki ortalama allel sayısı ve allel frekansları, etkili allel sayısı ve Shannon sabiti hesaplandı. Polimorfizm ölçütü olarak, bütün bireyler göz önüne alındığında iki ve/veya daha fazla allele sahip olan mikrosatellit bölgesi polimorfik lokus olarak değerlendirildi. Çalışılan altı kloroplast mikrosatellit bölgesi bakımından her bir bireydeki farklı büyüklükteki allellerin kombinasyonları haplotip olarak değerlendirildi. Her bir grubun genetik çeşitliliği, Nei (1987)'nin tarafsız haplotip çeşitliliği (H_e) hesaplanarak belirlendi. Nei (1987)'nin tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı aşağıdaki şekilde hesaplandı;

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

Formülde f_i değeri i haplotipinin frekansını; n ise, örnek sayısını belirtmektedir.

Gruplar içindeki bireyler arasında bulunan genetik mesafe, basamaklı mutasyon modeline göre hesaplandı (stepwise mutation model – SMM). Bu modelde, rekombine olmayan kloroplast genomu tek bir lokus olarak alınır ve Goldstein vd (1995)'in genetik

uzaklık değeri (D_{sh}^2) hesaplanır. İki birey arasındaki genetik uzaklık aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır;

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

Formülde bulunan a_{ik} ve a_{jk} 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 çalışmada altı kloroplast mikrosatellit bölgesine ait lokuslara bakıldığı için $K=6$ olarak alınmaktadır.

Polimorfik bilgi içeriği (PIC), bir belirtecin popülasyondaki polimorfizmi belirlemekteki değerini göstermektedir. PIC değeri bir belirtece (lokusa) ait allel sayısına ve allellerin popülasyondaki dağılımına bağlıdır. Tohum bahçesindeki klonlarda, embriyolarda ve tohum bahçesi yakınındaki doğal popülasyondaki bireylerde çalışılan her bir cpSSR lokusu için polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Formülde, " n " bir cpSSR lokusundaki allel sayısını ve " p " bir cpSSR lokusundaki her bir allelin frekansını belirtmektedir (Botstein vd 1980).

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Genetik çeşitlilik parametrelerinin [allel frekansı, polimorfik lokuslardaki gözlenen allel sayısı, etkili allel sayısı, Shannon sabiti, Nei'nin (1973) genetik çeşitlilik katsayısı] hesaplanmasında BIOSYS-2 (Black 1997), GENALEX [(version 6.3) (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>)] (Peakall ve Smouse 2006) ve POPGENE (Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis, Version 1.32) (Yeh vd 1999) istatistik programlarından, haplotip zenginliğinin hesaplanmasında CONTRIB 1.02 (Petit vd 1998) istatistik programından, tohum bahçesinde, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda ve doğal popülasyonda gözlenen haplotip sayısının ve frekansının hesaplanmasında, basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizinde (AMOVA) ARLEQUIN [(versiyon 3.11) (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>)] (Excoffier vd 2005) istatistik programından

yararlanıldı. Böylece tohum bahçesinin, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyoların ve doğal populasyonun gen havuzu ve genetik çeşitliliği hakkında bilgiler edinildi.

Bir tohum bahçesindeki klonların sahip olduğu ramet sayısındaki farklılıklara dayalı olarak hesaplanan etkili klon sayısı (N_c) değeri, tohum bahçesinin gen havuzunu tanımlamada bahçedeki klon sayısından daha fazla öneme sahiptir. Tohum bahçesinde etkili klon sayısı (N_c) tahmini aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

$$N_c = \frac{n_{total}^2}{\sum_{i=1}^N n_i^2}$$

Formülde, " n_{total} " tohum bahçesindeki toplam ramet sayısını, " n_i " i . klonun ramet sayısını ve " N " tohum bahçesindeki klon sayısını belirtmektedir (Kang vd 2001b).

Polen kontaminasyonu oranının tahmini için ilgilenilen tohum bahçesindeki bütün klonların çalışılan lokuslar bakımından genotipinin ve tohum bahçesi içerisindeki bireyler tarafından oluşturulan tohumların embriyolarına katkıda bulunan polen gametlerinin genotipinin bilinmesi gerekir. Ayrıca tohum bahçesi civarındaki doğal populasyonlarda, çalışılan lokusların allel frekanslarının bilinmesi gerekir. Tohum bahçesi içindeki bir ağaca gelen polenlerin gametik çok-lokuslu genotipleri, o bireyin tohumlarında megagametofit ve embriyo dokunun analizi ile belirlenmiştir. Megagametofit doku embriyo oluşumuna katkıda bulunan anasal gametin genotipini (Stewart 1994), embriyo doku ise kloroplast DNA koniferlerde paternal (babasal) kalıtım gösterdiği için polen gametinin genotipini yansıtır.

Polen kontaminasyonu tahmini için geliştirilen model tohum bahçesindeki olası tüm çok-lokuslu polen genotipleriyle analiz edilen her bir embriyonun oluşumuna katkıda bulunan çok-lokuslu polen genotipinin karşılaştırılmasına dayanır. Tohum bahçesi tarafından üretilmeyen bütün polen gametleri "belirlenebilir" kontaminantlardır (b). Belirlenebilir kontaminantların oranı polen kontaminasyonunun "minimum tahmini"dir. Bunun "minimum tahmin" olmasının nedeni, bazı kontaminantların muhtemel olarak

tohum bahçesi klonları tarafından üretilenlerinkinden ayırt edilemeyen çok-lokuslu genotiplere sahip olmasındandır. Gerçek polen kontaminasyonu oranını (m), "belirlenebilir" kontaminantların oranının (b) doğal popülasyondaki bir polen taneciğinin belirlenebilir birçok-lokuslu marker genotipi taşıyabilme olasılığına (d) bölünmesiyle hesaplanır (Smith ve Adams 1983).

$$m = b/d$$

m: Gerçek polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı tahmini,

b: Kontaminantların (kirliliğin) gözlenen oranı (minimum tahmin),

d: Doğal popülasyondaki bir polen taneciğinin belirlenebilir bir çok-lokuslu belirteci genotipi taşıyabilme olasılığıdır.

Tohum bahçesine dışarıdan (tohum bahçesi kaynaklı olmayan) polen karışım karışmadığı (polen kontaminasyonu) eğer karışmışsa ne ölçüde karıştığının belirlenmesinde Turbo Basic'de yazılan bir bilgisayar programı olan GENFLOW (Adams ve Burczyk 1993) ve POLLEN FLOW (PFL) (Slavov 2004, Slavov vd 2005b) istatistik paket programları kullanıldı.

Tohum bahçesi tarafından üretilen dişi çiçekler ıslah edilmemiş ağaçlardan gelen polenlerle döllendiği zaman, bu dişi çiçeklerden oluşan tohumlardan elde edilecek genetik kazanç, kontaminasyonun olmadığı durumda elde edilecek kazancın yarısı kadar olacaktır. Polen kontaminasyonunun genetik kazanç üzerine olabilecek olumsuz etkisini, yani genetik kazançtaki azalmayı ve elde edilecek net genetik kazancı hesaplamak için, aşağıdaki formül kullanılmıştır (Squillace ve Long 1981).

$$G_a = [(m \times G)/2]$$

$$G_n = G - G_a$$

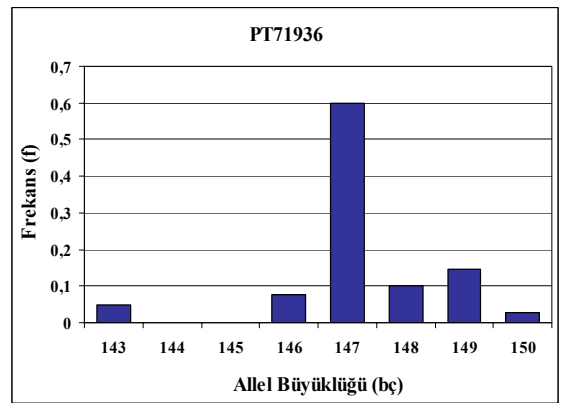
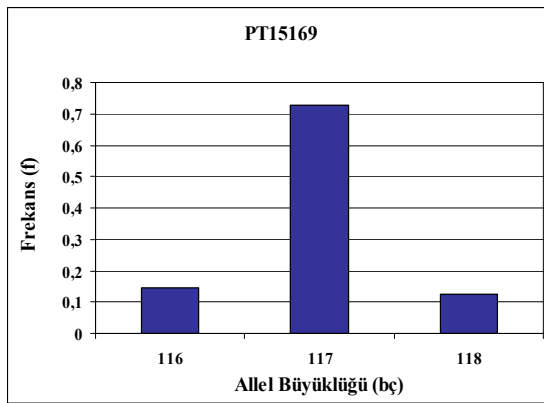
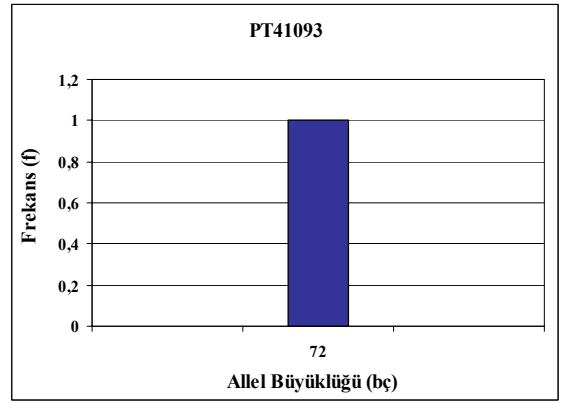
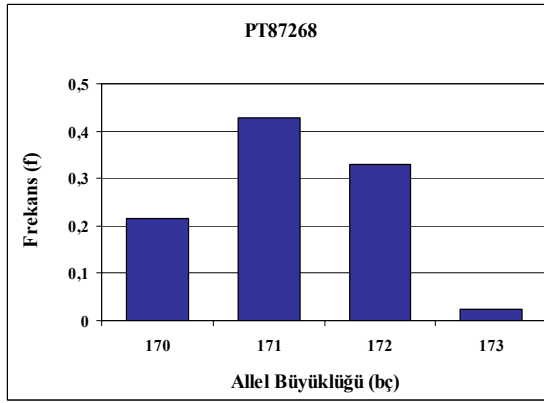
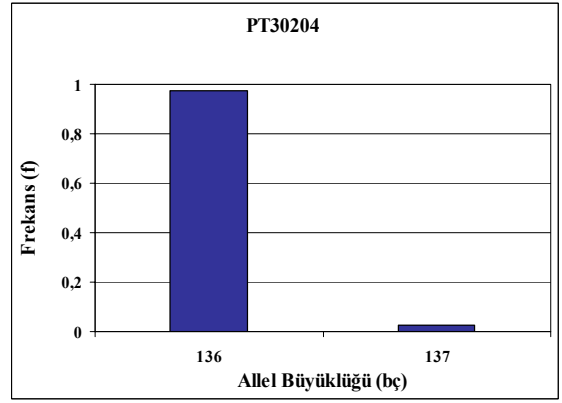
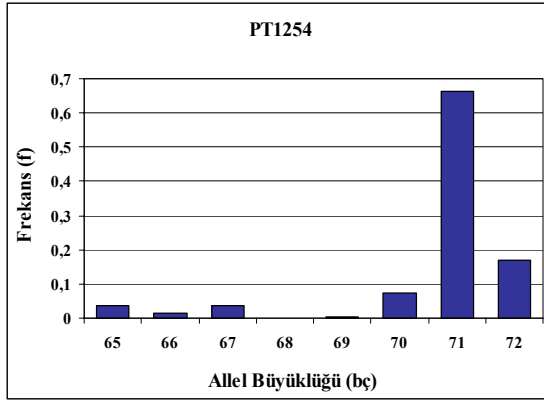
Burada; "G_a" Kontaminasyon olması halinde, beklenen genetik kazançtaki azalmayı, "G_n" net genetik kazancı, "G" kontaminasyon olmadığında beklenen genetik kazancı, "m" polen kontaminasyonu oranını belirtmektedir.

3. BULGULAR

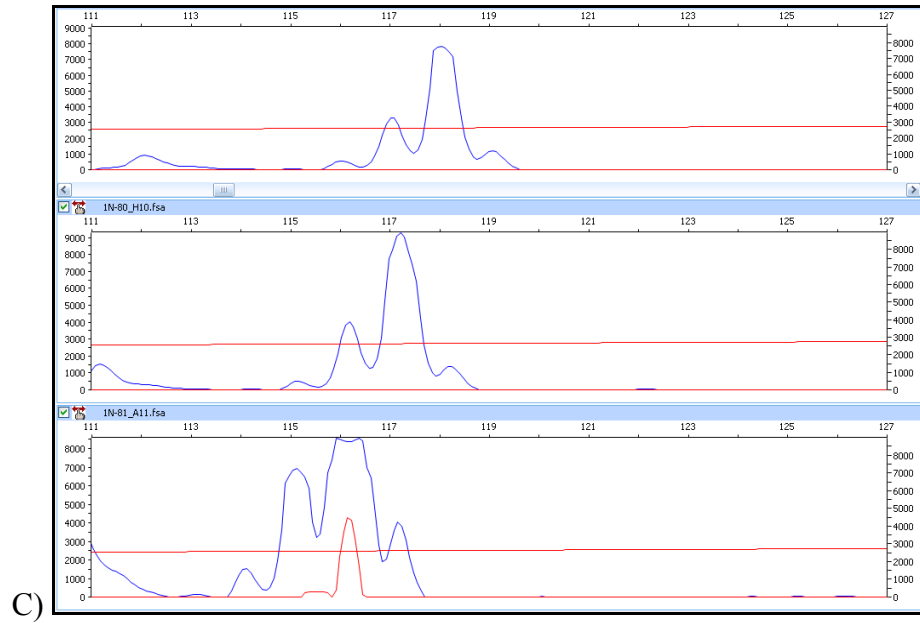
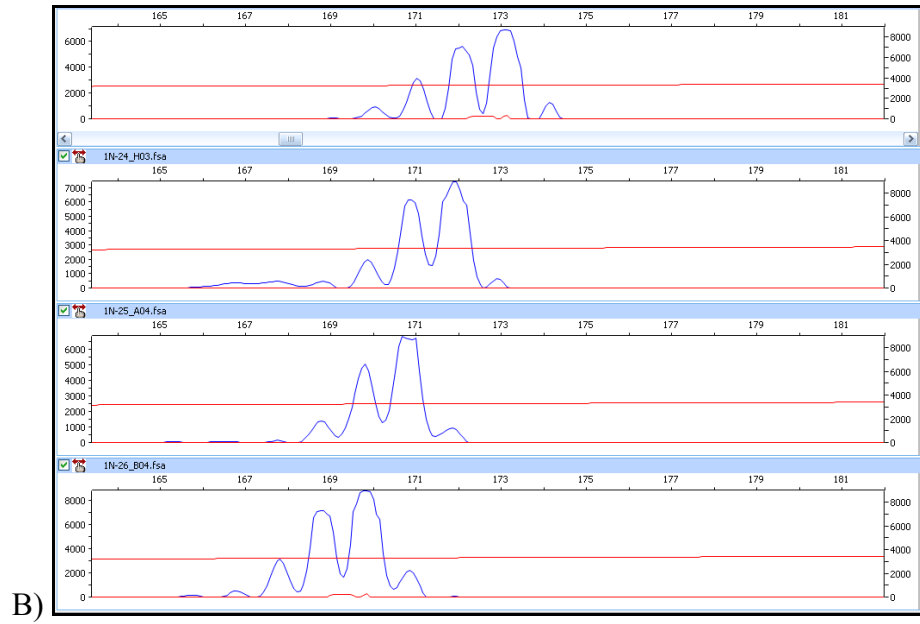
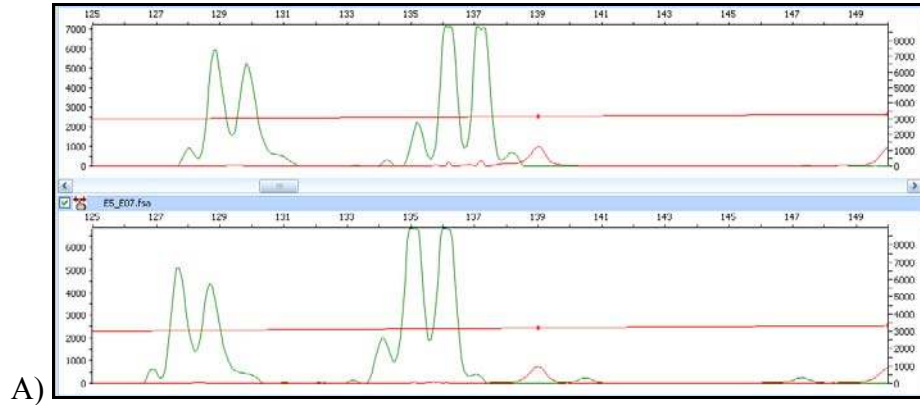
3.1 Kloroplast Mikrosatellit (cpSSR) Primerlerine ait Allellerin ve Haplotiplerin Belirlenmesi

Kloroplast DNA'sının haploid olmasından dolayı yapılan analizler sonucunda çalışılan her bir primer tek bir lokus, her bir primerin çoğalttığı farklı nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları tek bir allel olarak değerlendirildi. Bu ilkeye dayanarak, analiz edilen her bir primer için, tohum bahçesindeki 30 klonu ait 50 ağacın (rametin), tohum bahçesindeki ağaçlar (rametler) tarafından üretilen 300 embriyonun ve tohum bahçesine yaklaşık 170 m uzaklıkta ve bahçenin kuzey ve kuzey batısında yer alan doğal populasyondaki 47 bireyin (ağacın) her birinin sahip olduğu alleller belirlendi ve frekansları ayrı ayrı hesaplandı (Şekil 3.1).

Çalışılan altı kloroplast mikrosatellit (cpSSR) lokusuna (Pt1254, Pt30204, Pt87268, Pt41093, Pt15169 ve Pt71936) ait alleller ve baz çifti (bç) olarak bunların büyüklükleri belirlendi. Altı cpSSR primerinden, Pt41093 primeri monomorfik, diğer primerler ise (Pt1254, Pt30204, Pt87268, Pt15169 ve Pt71936) polimorfik olarak saptandı. Analiz edilen tohum bahçesine ve doğal populasyona ait örneklerde altı lokus için toplam 23 allel belirlendi. Analizlerde kullanılan primerlerden en çok allel (7) Pt1254 primerinde, en az allel (1) ise monomorfik olan Pt41093 primerinde görüldü. Pt30204 primerinde 2 allel (136 ve 137 bç), Pt87268 primerinde 4 allel (170, 171, 172 ve 173 bç), Pt15169 primerinde 3 allel (116, 117 ve 118 bç) ve Pt71936 primerinde ise 6 allel (143, 146, 147, 148, 149 ve 150 bç) gözlemlendi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Analizlerde kullanılan altı cpSSR primerinden Pt1254 ve Pt71936 dışındakilerin aralarında 1 baz çiftlik (bç) fark bulunan allellere sahip olduğu belirlendi. Pt1254 primerinde 67 ve 69 allel büyüklükleri arasında 1 baz çiftlik (bç)'lik, Pt71936 primerinde ise, 143 ve 146 allel büyüklükleri arasında 2 bç'lik boşluğun olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1). Yani Pt1254 primerinde 68 bç büyüklüğündeki allele ve Pt71936 primerinde 144 ve 145 bç büyüklüğündeki allellere rastlanmadı.

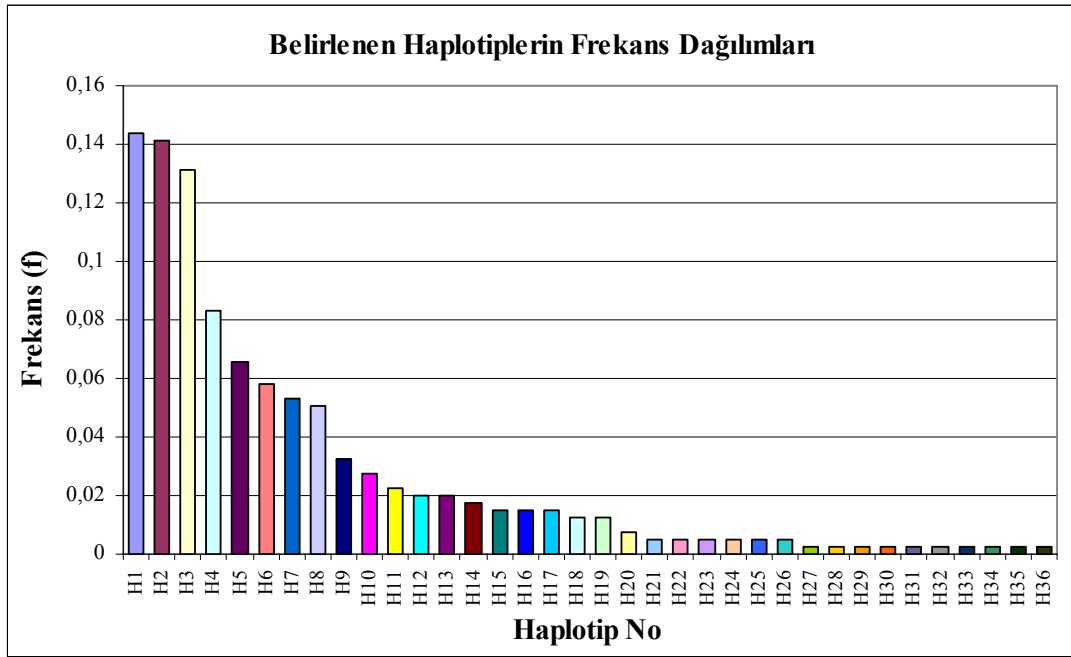


Şekil 3.1 Çalışmada analiz edilen altı primerin (lokusun) her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan tüm örneklerdeki frekans dağılımları



Şekil 3.2 Pt30204 (A), Pt87268 (B) ve Pt15169 (C) no'lu primerlere ait allellerin Peak Scanner Software v1.0 programındaki görüntüsü

Analiz edilen her bir örnekte çalışılan altı primer için elde edilen farklı büyüklükteki allellerin kombinasyonu haplotip olarak değerlendirildi. Buna göre, çalışılan tüm örneklerde toplam 36 haplotip gözlemlendi. Çalışılan örneklerde belirlenen haplotiplerin frekans dağılımı Şekil 3.3’de verilmiştir. Gözlenen haplotipler ve her bir lokusta sahip oldukları allel büyüklükleri (bp) Çizelge 3.1’de gösterilmektedir. Haplotipler bütün örnekler göz önüne alındığında görülme sıklığı en yüksek olandan en düşük olana doğru numaralandırıldı.

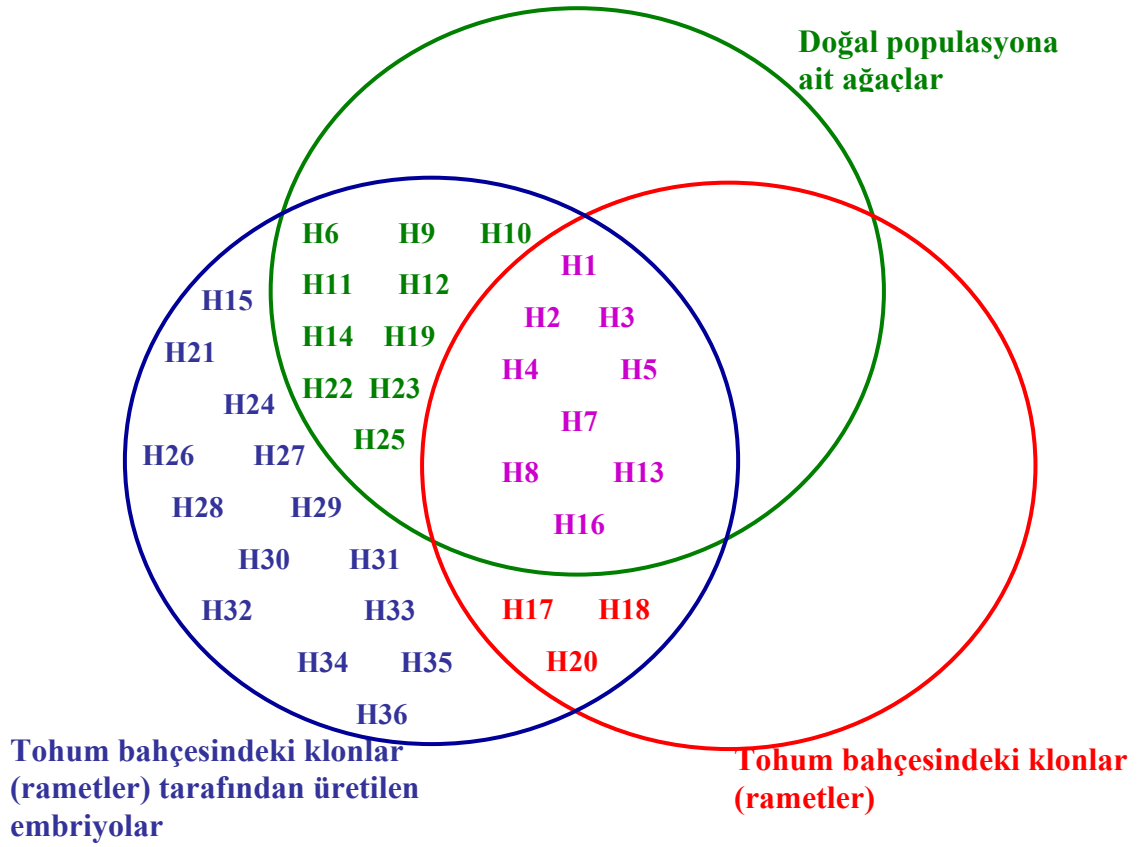


Şekil 3.3 Çalışmada belirlenen haplotiplerin frekans dağılımları

Gözlenen haplotiplerden dokuz tanesinin (H1, H2, H3, H4, H5, H7, H8, H13 ve H16) hem doğal popülasyona ait örneklenen ağaçlarda hem tohum bahçesindeki klonlara ait örneklenen rametlerde ve bu klonlar (rametler) tarafından üretilen embriyolarda ortak olarak bulunduğu saptandı (Şekil 3.4). On haplotip (H6, H9, H10, H11, H12, H14, H19, H22, H23 ve H25), doğal popülasyondan örneklenen ağaçlarda ve tohum bahçesindeki klonlar (rametler) tarafından üretilen embriyolarda ortak olarak belirlendi. H17, H18 ve H20 no’lu haplotipler ise tohum bahçesindeki klonlarda ve bu klonlar (rametler) tarafından üretilen embriyolarda ortaktır. Yani, bu üç haplotip doğal popülasyona ait bireylerde görülmemiştir. Sadece tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda belirlenen haplotip sayısı ise 14’tür (Şekil 3.4).

Çizelge 3.1 *P. brutia* tohum bahçesine (38 no'lu) ve tohum bahçesinin yakın çevresinde yer alan doğal popülasyona ait çalışılan örneklerde altı ayrı lokus (primer) için gözlenen 36 haplotip ve bu haplotiplerin baz çifti olarak sahip oldukları allel büyüklükleri

	Lokus ve/veya primerler					
Haplotip	Pt1254	Pt30204	Pt87268	Pt41093	Pt15169	Pt71936
H1	71	136	171	72	117	147
H2	71	136	170	72	117	147
H3	71	136	172	72	116	149
H4	72	136	172	72	117	147
H5	71	136	171	72	118	147
H6	71	136	171	72	117	146
H7	70	136	171	72	118	147
H8	71	136	172	72	117	148
H9	67	136	171	72	117	143
H10	72	136	171	72	117	147
H11	65	136	170	72	117	147
H12	72	136	170	72	117	147
H13	71	137	172	72	117	147
H14	71	136	170	72	117	146
H15	72	136	172	72	117	150
H16	65	136	173	72	117	148
H17	71	136	171	72	117	148
H18	70	136	171	72	117	148
H19	66	136	171	72	117	143
H20	72	136	172	72	117	149
H21	71	136	172	72	117	147
H22	71	136	172	72	116	150
H23	71	136	170	72	118	147
H24	70	136	171	72	117	147
H25	67	136	170	72	117	143
H26	72	136	172	72	116	150
H27	70	136	172	72	117	148
H28	72	137	172	72	117	149
H29	69	136	170	72	117	148
H30	72	136	172	72	116	149
H31	66	136	171	72	117	147
H32	71	137	170	72	117	147
H33	72	136	173	72	117	150
H34	72	136	173	72	117	149
H35	71	136	173	72	116	148
H36	72	136	173	72	118	147



Şekil 3.4 Çalışmada belirlenen haplotiplerin tohum bahçesindeki klonlar (rametler), doğal popülasyona ait ağaçlar ve tohum bahçesindeki klonlar (rametler) tarafından üretilen embriyolar arasındaki dağılımı

3.2 Tohum Bahçesinde Bulunan Klonların Genetik Kimliklerinin Tespiti

Tohum bahçesinde bulunan 30 klona ait 50 ramette toplam 12 çeşit haplotip gözlemlendi. Tohum bahçesindeki her bir klonun sahip olduğu haplotip kimlikleri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’de, tohum bahçesinde gözlenen haplotiplerin frekansları Çizelge 3.4’de gösterilmektedir. Tohum bahçesindeki bazı klonların çalışılan cpSSR primerleri bakımından birbiriyle aynı genetik kimliğe sahip olduğu belirlendi. Örneğin; 9266, 9269, 9272, 9273, 9275, 9278, 9280, 9285, 9290-1, 9290-2, 9290-3, 9293, 9295-4 ve 9295-5 no’lu klonlarda en yaygın haplotiplerden birisi olan H2 haplotipi ($f = 0.28$) görüldü. 9267, 9277, 9282-1, 9282-2, 9289-2, 9289-3, 9289-4, 9291, 9292 ve 9295-3 no’lu klonların ise H3 haplotipine sahip olduğu belirlendi. Tohum bahçesinde en sık gözlenen haplotipler H2, H3 ve H8 haplotipleridir. Tohum bahçesindeki klonların %28’i H2, %20’si H3, %18’i de H8 haplotip kimliğine sahiptir. Tohum bahçesinde en

az gözlenen haplotipler ise H5, H7, H16, H17, H18 ve H20 haplotipleridir. H5, H16, H17, H18 ve H20 no'lu haplotipler birer klon ile temsil edilmektedir. Tohum bahçesindeki klonlarda (rametlerde) gözlenen haplotiplerin bahçedeki dağılımı Şekil 3.5'de gösterilmektedir.

Tohum bahçesindeki her bir klon 43'den (9267 ve 9268 no'lu klonlar) 93'e (9295 no'lu klon) değişen sayılarda bireylere (rametlere) sahiptir. Tohum bahçesinde yer alan 30 klonun her birine ait ramet sayıları kullanılarak, tohum bahçesinde etkili klon sayısı (N_c) 29 olarak hesaplandı. Çalışmada, tohum bahçesindeki 30 klonun 25 tanesinden birer adet olmak üzere toplam 25 rametin genetik kimliği belirlendi (Çizelge 3.2). Otuz klonun geri kalan 5 klonu için ise her birinden beşer ramet olmak üzere toplam 25 ağaç rastlantısal olarak seçildi. Tohum bahçesinden seçilen 5 klonun her birinden örneklenen 5 ramet üzerinde cpSSR analizleri yapılarak genotipleri karşılaştırıldı. Her birinden 5'er ramet alınan klonlar 9282, 9289, 9290, 9294 ve 9295 numaralı klonlardır. Amaç, bir klonun genotipini belirlerken aynı zamanda çalışılan beş rametin gerçekten aynı klona ait olup olmadığını ve klonlarda herhangi bir etiketleme hatası olup olmadığını tespit etmektir. Analizler sonucu elde edilen bulgular, bu beş klona ait rametlerin genotiplerinin çalışılan cpSSR primerleri bakımından birbiri ile eşleşmediğini göstermektedir (Çizelge 3.3). Örneğin, 9282 no'lu klonun 1. ve 2. rameti H3 no'lu haplotipi gösterirken, 3. rameti H20 no'lu haplotipi, 4. ve 5. rameti H8 no'lu haplotipi göstermektedir. 9282 no'lu klonun H20 genotipine sahip olan 3. rametinin tohum bahçesindeki hiçbir klonun genotipiyle eşleşmediği belirlendi. Yani H20 haplotipi sadece 9282 no'lu klonun 3. rametinde gözlemlendi. 9289 no'lu klonun ise 1. rameti H13 no'lu haplotipi, 2., 3. ve 4. rameti H3 no'lu haplotipi gösterirken 5. rameti H8 no'lu haplotipi göstermektedir. 9290 no'lu klonun 1., 2., ve 3. rameti H2 haplotipini, 4. ve 5. rameti H13 haplotipini göstermektedir. 9294 ve 9295 no'lu klonların rametlerinde de benzer durumların olduğu görülmektedir. 9294 no'lu klonun 1. ve 2. rameti H7 haplotipini, 3. ve 4. rameti H4 haplotipini, 5. rameti ise H1 haplotipini göstermektedir. Ayrıca 9294 no'lu klona ait 2 rametin (H7 genotipine sahip) tohum bahçesindeki hiçbir klonun genotipiyle eşleşmediği belirlendi (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3). 9295 no'lu klonun 1. ve 2. rameti H1 haplotipini, 3. rameti H3 haplotipini, 4. ve 5. rameti ise H2

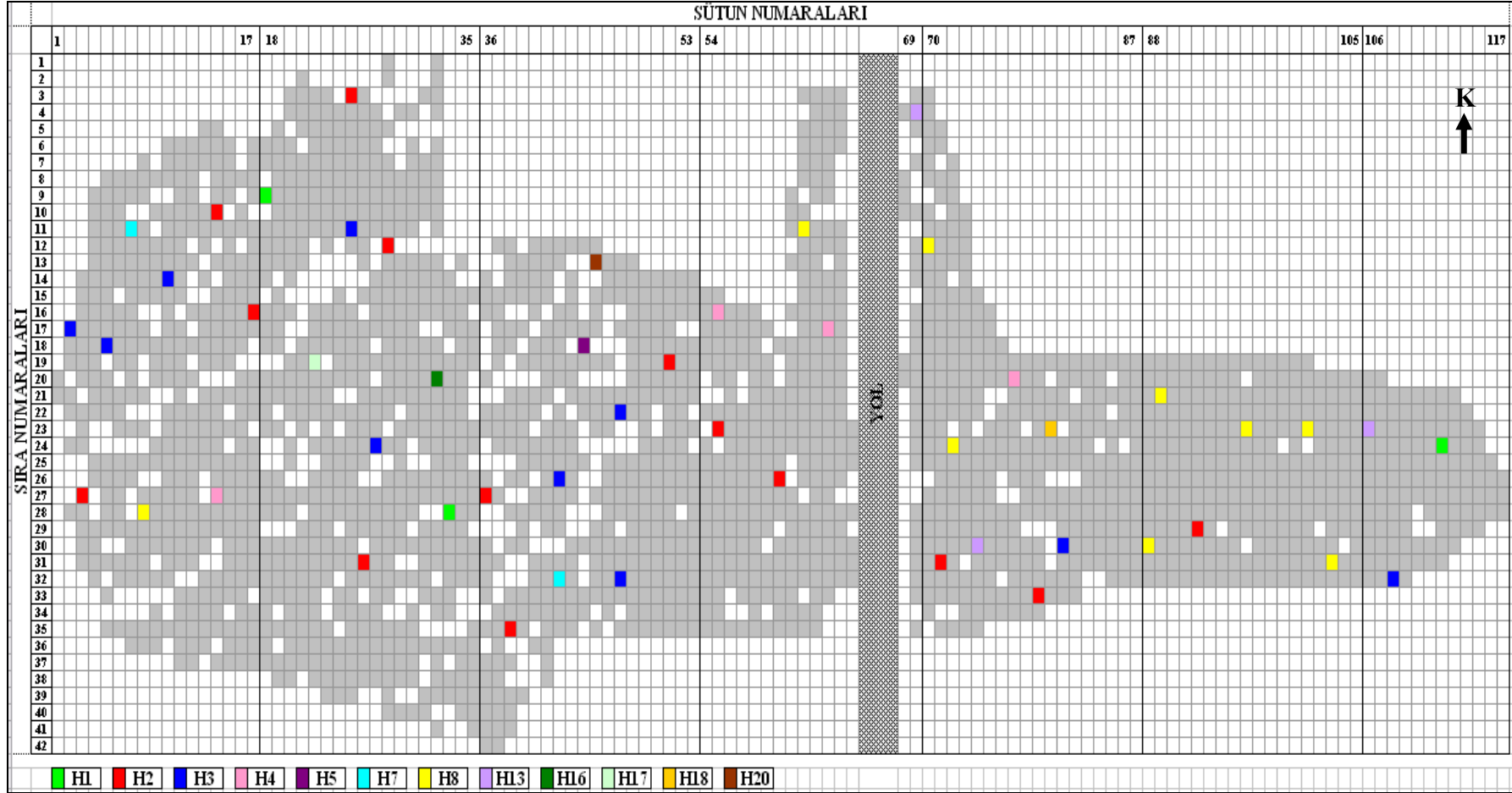
haplotipini göstermektedir. Bu bulgular adı geçen rametlerin tohum bahçesinin kuruluş aşamasında veya öncesinde yanlış etiketlenmiş olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 3.2 Tohum bahçesinden birer adet ramet olarak örneklenen 25 klona ait haplotip kimlikleri

Tohum Bahçesindeki Klonların Numaraları	Haplotip No
9266, 9269, 9272, 9273, 9275, 9278, 9280, 9285, 9293	H2
9267, 9277, 9291, 9292	H3
9271, 9281	H4
9276	H5
9270, 9279, 9283, 9286, 9287, 9288	H8
9274	H16
9268	H17
9284	H18

Çizelge 3.3 Tohum bahçesinden beşer adet ramet olarak örneklenen 5 klona ait haplotip kimlikleri (Klonların muhtemel haplotip kimlikleri koyu renkte gösterilmektedir.)

Tohum Bahçesindeki Klonların Numaraları	İlgili Klona ait Rametlerin Numaraları	Haplotip No
9282	9282-1, 9282-2 9282-3 9282-4, 9282-5	H3 H20 H8
9289	9289-1 9289-2, 9289-3, 9289-4 9289-5	H13 H3 H8
9290	9290-1, 9290-2, 9290-3 9290-4, 9290-5	H2 H13
9294	9294-1, 9294-2 9294-3, 9294-4 9294-5	H7 H4 H1
9295	9295-1, 9295-2 9295-3 9295-4, 9295-5	H1 H3 H2



Şekil 3.5 Çalışılan *P. brutia* klonal tohum bahçesindeki klonların haplotip kimliklerinin dağılımının şematik olarak gösterimi

Çizelge 3.4 Tohum bahçesindeki klonlara ait haplotiplerin frekansları

Sıra No	Haplotip No	Haplotip Sayısı	f*	f ² *
1	H1	3	0.06	0.0036
2	H2	14	0.28	0.0784
3	H3	10	0.20	0.0400
4	H4	4	0.08	0.0064
5	H5	1	0.02	0.0004
6	H7	2	0.04	0.0016
7	H8	9	0.18	0.0324
8	H13	3	0.06	0.0036
9	H16	1	0.02	0.0004
10	H17	1	0.02	0.0004
11	H18	1	0.02	0.0004
12	H20	1	0.02	0.0004
Toplam	12	50	1	0.1680

* f = Frekans, f² = Frekansın karesi

3.3 Tohum Bahçesindeki Klonlar (Rametler) Tarafından Üretilen Embriyoların Genetik Kimliklerinin Tespiti

Tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda toplam 36 çeşit haplotip gözlemlendi. Gözlenen haplotipler ve frekansları Çizelge 3.5’de gösterilmektedir. Embriyolarda en yaygın gözlenen haplotipler, H1, H2, H3, H4 ve H5 no’lu haplotiplerdir. Bu beş haplotip embriyolarda gözlenen haplotiplerin %55.7’sini oluşturmaktadır. Ayrıca bu beş haplotip, tohum bahçesindeki klonlarda ve doğal populasyondaki bireylerde de gözlenen ortak haplotiplerdendir. On dört haplotip sadece tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda belirlendi, tohum bahçesindeki klonlarda ve doğal populasyondan örneklenen ağaçlarda bu 14 haplotipten herhangi birini taşıyan bireylere rastlanmadı. Bu haplotiplerden H27, H28, H29, H30, H31, H32, H33, H34, H35 ve H36 no’lu haplotipler sadece birer embriyoda gözlenen frekansı en düşük haplotiplerdir. H6, H9, H10, H11, H12, H14, H19, H22, H23 ve H25 no’lu haplotipler hem embriyolarda hem de doğal populusyona ait bireylerde gözlemlendi. Yani bu haplotipleri taşıyan embriyoların doğal populasyondaki bireyler tarafından üretilen polenlerle döllenme sonucu oluştuğu anlaşılmaktadır. H17, H18 ve H20 no’lu haplotipleri taşıyan embriyolar ise tohum bahçesindeki klonlara ait bireyler tarafından üretilen polenlerle döllenme sonucu oluşmuştur.

Çizelge 3.5 Tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolara ait haplotipler ve frekansları

Sıra No	Haplotip No	Haplotip Sayısı	f*	f ² *
1	H1	44	0.1467	0.0215111
2	H2	40	0.1333	0.0177778
3	H3	37	0.1233	0.0152111
4	H4	22	0.0733	0.0053778
5	H5	24	0.0800	0.0064000
6	H6	20	0.0667	0.0044444
7	H7	18	0.0600	0.0036000
8	H8	10	0.0333	0.0011111
9	H9	12	0.0400	0.0016000
10	H10	9	0.0300	0.0009000
11	H11	6	0.0200	0.0004000
12	H12	7	0.0233	0.0005444
13	H13	3	0.0100	0.0001000
14	H14	5	0.0167	0.0002778
15	H15	6	0.0200	0.0004000
16	H16	4	0.0133	0.0001778
17	H17	5	0.0167	0.0002778
18	H18	4	0.0133	0.0001778
19	H19	3	0.0100	0.0001000
20	H20	2	0.0067	0.0000448
21	H21	2	0.0067	0.0000448
22	H22	1	0.0033	0.0000108
23	H23	1	0.0033	0.0000108
24	H24	2	0.0067	0.0000448
25	H25	1	0.0033	0.0000108
26	H26	2	0.0067	0.0000448
27	H27	1	0.0033	0.0000108
28	H28	1	0.0033	0.0000108
29	H29	1	0.0033	0.0000108
30	H30	1	0.0033	0.0000108
31	H31	1	0.0033	0.0000108
32	H32	1	0.0033	0.0000108
33	H33	1	0.0033	0.0000108
34	H34	1	0.0033	0.0000108
35	H35	1	0.0033	0.0000108
36	H36	1	0.0033	0.0000108
Toplam	36	300	1	0.0807111

* f = Frekans, f² = Frekansın karesi

3.4 Doğal Populasyona ait Ağaçların Genetik Kimliklerinin Tespiti

Tohum bahçesinin yakınında yer alan doğal kızılçam populasyonuna ait 47 birey örneklendi. Doğal populasyona ait örneklenen 47 ağaçtan 16'sı dağınık bir şekilde tohum bahçesinin dört tarafında bulunmakta ve tohum bahçesine olan uzaklıkları 6 m ile 110 m arasında değişmektedir. Diğer 31 ağaç ise tohum bahçesinin kuzey ve kuzey batısında yaklaşık 170 m uzaklıkta yer almaktadır (Bkz. Şekil 2.2). Doğal populasyona ait bireylerde toplam 19 çeşit haplotip gözlemlendi. Bu 19 farklı haplotipin %52.6'sı sadece doğal populasyona ait bireylerde gözlenirken, %43.4'ü tohum bahçesindeki klonlara ait bireylerde de gözlemlendi. Doğal populasyona ait bireylerin sahip olduğu haplotipler ve frekansları Çizelge 3.6'da gösterilmektedir. Doğal populasyonda en yaygın gözlenen haplotipler H1, H3 ve H4 no'lu (toplam $f = 0.47$), en az gözlenen haplotipler ise H5, H7, H8, H9, H12, H16, H22, H23 ve H25 no'lu haplotiplerdir ($f < 0.03$).

Çizelge 3.6 Doğal populasyona ait bireylerde gözlenen haplotipler ve frekansları

Sıra No	Haplotip No	Haplotip Sayısı	f^*	f^{2*}
1	H1	10	0.2128	0.0452694
2	H2	2	0.0426	0.0018108
3	H3	5	0.1064	0.0113173
4	H4	7	0.1489	0.0221820
5	H5	1	0.0213	0.0004527
6	H6	3	0.0638	0.0040742
7	H7	1	0.0213	0.0004527
8	H8	1	0.0213	0.0004527
9	H9	1	0.0213	0.0004527
10	H10	2	0.0426	0.0018108
11	H11	3	0.0638	0.0040742
12	H12	1	0.0213	0.0004527
13	H13	2	0.0426	0.0018108
14	H14	2	0.0426	0.0018108
15	H16	1	0.0213	0.0004527
16	H19	2	0.0426	0.0018108
17	H22	1	0.0213	0.0004527
18	H23	1	0.0213	0.0004527
19	H25	1	0.0213	0.0004527
Toplam	19	47	1	0.1000453

* f = Frekans, f^2 = Frekansın karesi

3.5 Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik

Tohum bahçesine ait klonlar, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolar ve doğal populasyona ait ağaçlarda 6 farklı lokus çalışıldı ve bu lokuslarda toplam 23 allel belirlendi. Her bir lokustaki gözlenen allel büyüklükleri ve frekansları Çizelge 3.7’de gösterilmektedir. Pt1254 lokusuna ait 4. (69 bç) allel sadece tohum bahçesi tarafından üretilen embriyolarda gözlemlendi. Sadece embriyolarda ve doğal populasyonda gözlenen Pt1254 lokusuna ait 2. (66 bç) ve 3. (67 bç) alleller ile Pt71936 lokusuna ait 1. (143 bç), 2. (146 bç) ve 6. (150 bç) alleller tohum bahçesine ait klonlarda (rametlerde) gözlenmedi. Çalışılan lokuslara ait diğer alleller ise tohum bahçesindeki klonlarda, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda ve doğal populasyonda saptandı. Her bir lokus için çalışılan bütün örneklerde en yaygın görülen alleller; Pt1254 lokusu için 6. allel (71 bç), Pt30204 lokusu için 1. allel (136 bç), Pt87268 lokusunda 2. ve 3. alleller (171 bç ve 172 bç), Pt15169 lokusunda 2. allel (117 bç) ve Pt71936 lokusu için 3. allel (147 bç)’dir (Bkz. Şekil 3.1).

Tohum bahçesindeki klonlar (rametler) ve doğal populasyona ait ağaçlar çalışılan lokusların allel frekansları bakımından birbirinden istatistiki olarak farklı bulunmuştur ($P < 0.05$). Özellikle Pt1254 ($P = 0.000997$), Pt87268 ($P = 0.003476$) ve Pt71936 ($P = 0.000059$) lokusları tohum bahçesindeki klonlar (rametler) ve doğal populasyon arasındaki farklılığın asıl kaynağıdır. Ayrıca doğal populasyonda Pt1254 ve Pt71936 lokuslarının, tohum bahçesi anaç gen havuzunda bulunmayan allellere sahip olduğu tespit edilmiştir. Analizler sonucunda bu allellere tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda da rastlanmıştır.

Tohum bahçesindeki klonların, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyoların ve doğal populasyona ait ağaçların genetik çeşitliliğine ait bilgiler ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) (Botstein vd 1980) Çizelge 3.8’de sunulmuştur. Nei’nin (1973) genetik çeşitlilik katsayısı (h) tohum bahçesinde 0.340 ± 0.102 , tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda 0.378 ± 0.117 ve doğal populasyonda 0.369 ± 0.114 olarak hesaplandı. Ortalama allel sayısı (N_a) 2.83 ile 3.83 arasında, etkili allel sayısı (N_e) ise 1.72 ile 1.89 arasında değişmektedir. Bütün örnekler

ele alındığında ortalama N_e 1.825 ± 0.164 olarak bulundu. Shannon sabiti (I), tohum bahçesi klonları için 0.61, embriyolar için 0.74, doğal populasyon için 0.72 olarak hesaplandı. Yüksek I değeri populasyon içinde önemli oranda varyasyon olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.7 Tohum bahçesinin, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyoların ve doğal populasyonun çalışılan lokuslar bakımından allel büyüklükleri ve frekansları (Tohum bahçesinde rastlanmayan alleller koyu renkte gösterilmektedir.)

Lokus	Allel No	Allel Büyüklüğü (baz çifti, bç)	Frekans		
			Tohum Bahçesi	Embriyolar	Doğal Populasyon
Pt1254	1	65	0.0200	0.0333	0.0851
	2	66	0.0000	0.0133	0.0426
	3	67	0.0000	0.0433	0.0426
	4	69	0.0000	0.0033	0.0000
	5	70	0.0600	0.0833	0.0213
	6	71	0.8200	0.6467	0.5957
	7	72	0.1000	0.1767	0.2128
Pt30204	1	136	0.9400	0.9833	0.9574
	2	137	0.0600	0.0167	0.0426
Pt87268	1	170	0.2800	0.2067	0.2128
	2	171	0.1600	0.4733	0.4255
	3	172	0.5400	0.2933	0.3404
	4	173	0.0200	0.0267	0.0213
Pt41093	1	72	1.0000	1.0000	1.0000
Pt15169	1	116	0.2000	0.1400	0.1277
	2	117	0.7400	0.7133	0.8085
	3	118	0.0600	0.1467	0.0638
Pt71936	1	143	0.0000	0.0533	0.0851
	2	146	0.0000	0.0833	0.1064
	3	147	0.5400	0.6033	0.6383
	4	148	0.2400	0.0867	0.0426
	5	149	0.2200	0.1400	0.1064
	6	150	0.0000	0.0333	0.0213

Çizelge 3.8 Tohum bahçesindeki klonlar, embriyolar ve doğal populasyondaki bireylere ait genetik çeşitlilik parametreleri

	Lokus	N _a *	N _e *	I*	h*	PIC*
Tohum Bahçesi Klonlar	Pt1254	4	1.457	0.640	0.314	0.295
	Pt30204	2	1.127	0.227	0.113	0.106
	Pt87268	4	2.525	1.061	0.604	0.539
	Pt41093	1	1.000	0.000	0.000	0.000
	Pt15169	3	1.691	0.714	0.409	0.361
	Pt71936	3	2.515	1.008	0.602	0.535
	Ortalama	2.833	1.719	0.608	0.340	0.306
	Standart Hata	0.477	0.272	0.172	0.102	-
Embriyolar	Pt1254	7	2.176	1.121	0.540	0.505
	Pt30204	2	1.034	0.085	0.033	0.032
	Pt87268	4	2.829	1.136	0.646	0.581
	Pt41093	1	1.000	0.000	0.000	0.000
	Pt15169	3	1.818	0.798	0.450	0.407
	Pt71936	6	2.487	1.269	0.598	0.569
	Ortalama	3.833	1.891	0.735	0.378	0.349
	Standart Hata	0.946	0.308	0.228	0.117	-
Doğal Populasyon	Pt1254	6	2.430	1.198	0.589	0.547
	Pt30204	2	1.089	0.176	0.081	0.082
	Pt87268	4	2.918	1.142	0.657	0.664
	Pt41093	1	1.000	0.000	0.000	0.000
	Pt15169	3	1.484	0.610	0.326	0.329
	Pt71936	6	2.275	1.189	0.560	0.566
	Ortalama	3.667	1.866	0.719	0.369	0.341
	Standart Hata	0.843	0.321	0.220	0.114	-
Toplam	Ortalama	3.444	1.825	0.687	0.362	0.349
	Standart Hata	0.437	0.164	0.114	0.060	-

*N_a = Gözlenen allel sayısı, N_e = Etkili allel sayısı, I = Shannon sabiti, h = Nei'nin (1973) genetik çeşitlilik katsayısı, tarafsız tahmin, PIC = Polimorfik bilgi içeriği

Çalışmada kullanılan altı cpSSR belirtecine ait ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri, tohum bahçesinde 0.306, embriyolarda 0.349 ve doğal populasyonda 0.341 olarak hesaplandı. Analiz edilen bütün örnekler ele alındığında ortalama PIC değeri, 0.349 olarak belirlendi. Ayrıca, en yüksek PIC değeri Pt87268 lokusunda, en düşük PIC değeri ise Pt30204 lokusunda hesaplandı (Çizelge 3.8).

Haplotip zenginliği (R_h) tohum bahçesinde 10.7, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda 16.5, doğal populusyona ait ağaçlarda 18 olarak bulundu (Çizelge 3.9). Haplotip zenginliği en az örnek sayısına sahip populusyona ($n=47$) göre seyreltme yapıldıktan sonra hesaplandı. Nei'nin (1987) tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı (H_e) tohum bahçesinde 0.8490, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen embriyolarda 0.9224, doğal populusyona ait ağaçlarda 0.9195 olarak hesaplandı (Çizelge 3.9). Ortalama haplotip çeşitlilik değerinin ($H_s = 0.897$) yüksek olması populusyon içindeki genetik çeşitliliğin yüksek olduğunun göstergesidir. Toplam genetik çeşitlilik (H_T) ortalama 0.924 olarak hesaplandı. Populusyonlar arası genetik çeşitliliğin, toplam çeşitliliğin yüzde kaçı olduğunu belirlemek için genetik farklılaşma katsayısı (G_{ST}) hesaplandı. G_{ST} ortalama %2.9 olarak bulundu. Genetik farklılaşmanın başlıca Pt1254, Pt87268 ve Pt71936 lokuslarından kaynaklandığı görüldü.

Çizelge 3.9 Haplotip çeşitlilik parametreleri ve haplotipler arasındaki uzaklık

Populusyon	n^*	N_h^*	R_h^*	N_p^*	H_e^*	D_{sh}^{2*}
Tohum Bahçesi Klonlar	50	12	10.7	-	0.8490	2.08
Embriyolar	300	36	16.5	14	0.9224	3.94
Doğal Populusyon	47	19	18	-	0.9195	5.47

* n : değerlendirilen birey sayısı, N_h : haplotip sayısı, R_h : haplotip zenginliği, N_p : özel ve/veya eşsiz haplotip sayısı, H_e : Nei'nin (1987) tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı, D_{sh}^2 : basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki genetik uzaklık katsayısı

Basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki ortalama genetik uzaklık katsayısı (D_{sh}^2) 3.83 (Tohum bahçesinde 2.08, embriyolarda 3.94, doğal populusyona ait ağaçlarda 5.47) olarak bulundu (Çizelge 3.9). Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre tohum bahçesi,

embriyolar ve doğal populasyon arasındaki varyasyonun büyük oranda (%98) populasyon içerisinde olduğu, populasyonlar arası genetik çeşitliliğin düşük olduğu (%2) gözlemlendi ($F_{ST} = 0.01907$) (Çizelge 3.10). İstatistiki analizler sonucunda, F_{ST} değerleri tohum bahçesi için 0.02008, embriyolar için 0.01889 ve doğal populasyon için 0.01915 olarak bulundu.

Çizelge 3.10 Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyans (%)
Populasyonlar-arası	2	2.319	0.00887	1.91
Populasyon-İçi	394	179.842	0.45645	98.09
Toplam	396	182.161	0.46533	

3.6 Tohum Bahçesinde Polen Kirliliğinin (Kontaminasyonunun) Tespiti

Tohum bahçesine dışarıdan polen karışıp karışmadığı, eğer karışmışsa ne oranda karıştığının belirlenmesinde GENFLOW (Adams ve Burczyk 1993) ve POLLEN FLOW (PFL) (Slavov 2004, Slavov vd 2005b) istatistik paket programları kullanıldı. İstatistiki analizler sonucunda çalışılan toplam 300 embriyoda (tohum bahçesindeki her bir klondan 10'ar adet embriyo olmak üzere) 87 gametin (%29) kontaminant olduğu belirlendi (Çizelge 3.11). Kontaminant gametlerin genetik kimliği incelendiğinde 24 farklı haplotip kimlik saptandı. En çok kontaminant gamete sahip rametler (%50 kontaminant gamet/klon) 9266, 9271 ve 9292 no'lu klonlara ait rametlerdir. 9269 ve 9284 no'lu klonlara ait rametlerde ise en az kontaminant gamete (%10 kontaminant gamet/klon) rastlandı. Ayrıca 9270 no'lu klona ait ramette hiç kontaminant gamet gözlenmedi (Çizelge 3.11). Tohum bahçesindeki 19 klona ait embriyoların en az %30'u dışarıdan gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuğu belirlenmiştir.

Kontaminant gametlerin ve doğal popülasyona ait ağaçların genetik kimlikleri ayrıntılı olarak ele alınarak polen kirliliğinin kaynağı hakkında bilgiler elde edildi.

Tohum bahçesinin arazi planı incelendiğinde, bahçenin kuzeyden güneye doğru toprak yol ile iki bölgeye ayrıldığı görülmektedir. Tohum bahçesine ait embriyolarda gözlenen kontaminant gametlerin % 67,82'si (59 adet) toprak yolun batı kısmında yer alan bölgede, % 32,18'i (28 adet) toprak yolun doğu kısmında yer alan bölgede gözlemlendi. Tohum bahçesinin dört tarafında doğal populasyona ait 16 adet tek tek yer alan ağaçlar bulunmaktadır. Bu ağaçların tohum bahçesine olan mesafeleri 6 m ile 110 m arasında değişmektedir. Doğal populasyondan örneklenen diğer 31 ağaç ise tohum bahçesinin kuzey ve kuzey batısında yaklaşık 170 m uzağında yer alan ormanlık alanda bulunmaktadır. Bazı haplotip kimliğe sahip kontaminant gametlere sadece toprak yolun batı kısmında yer alan bölgede rastlandı (H9 gibi). Diğer bazı haplotip kimliğe sahip kontaminant gametlere ise sadece toprak yolun doğu kısmında yer alan bölgede rastlandı (H23 gibi). H6, H10, H11, H12, H14, H19, H26 no'lu haplotip kimliğe sahip kontaminant gametler ise tohum bahçesi genelinde gözlemlendi. Tohum bahçesindeki polen kirliliğinin hem etrafında tek tek yer alan hem de doğal populasyona ait ormanlık alanda yer alan ağaçlardan kaynaklandığı görüldü. Örneğin, tohum bahçesinde belirlenen 12 adet kontaminant gametin, tohum bahçesine uzaklığı yaklaşık 25 m olan ve tohum bahçesinin güneyinde yer alan doğal populasyona ait bir birey ile aynı haplotip kimliğe sahip olduğu belirlendi (H9 no'lu haplotip) ve aynı haplotipe sahip başka bireye ormanlık alandan örneklenen diğer bireylerde rastlanmadı. Kontaminant gametlerin tohum bahçesinde dağılımına bakıldığında tohum bahçesinin bütün bakılardan polen kirliliğine açık olduğu gözlemlendi. Örneğin, tohum bahçesinin genelinde belirlenen 20 kontaminant gamet H6 haplotip kimliğine sahiptir. Aynı genetik kimliğe sahip doğal populasyonda 3 birey saptandı. Bu bireylerden ikisi tohum bahçesinin batısında yaklaşık 37 m ve 103 m mesafede, diğeri ise tohum bahçesinin kuzeyinde yaklaşık 170 m mesafede yer alan ormanlık alanda bulunmaktadır. H6 haplotip kimliğe sahip kontaminant gametler muhtemelen bu üç ağaca ait polenlerle döllenme sonucu oluşmuştur.

Tohum bahçesindeki klonlar (rametler) tarafından üretilen embriyolarda gözlenen kontaminantların oranı (b) 0.290 olarak bulundu (Çizelge 3.12). Diğer bir ifade ile tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen tohumların %29'u, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilmeyen polenlerle döllenme sonucu olmuştur. Bu polen

kirliliğinin minimum tahminidir. Tohum bahçesinde tahmin edilen gerçek polen kontaminasyonu (m) ise 0.393 (%39.3) olarak hesaplandı. Polen kirliliğinin bu düzeyde olması sonucunda tohum bahçesi tohumlarından beklenen genetik kazancın $G_a = \%20$ oranında azalacağı hesaplanmıştır.

Çizelge 3.11 Tohum bahçesindeki klonlara ait gözlenen kontaminant gamet sayısı ve kontaminant gametlerin haplotip kimlikleri

Tohum Bahçesi Klonlar	Gözlenen Kontaminant Gamet Sayısı	Kontaminant Gametlerin Haplotip Kimlikleri
9266	5	H10, H12, H22, H28
9267	2	H9, H12
9268	3	H6, H12, H28
9269	1	H11
9270	0	-
9271	5	H6, H15
9272	2	H6, H14
9273	3	H9, H11
9274	3	H9, H19
9275	2	H6, H24
9276	3	H10, H21, H25
9277	3	H15, H33
9278	2	H10, H21
9279	4	H6, H12, H30, H31
9280	4	H6, H9, H26
9281	3	H9, H15, H19
9282	3	H6, H9, H11
9283	4	H10, H11, H14, H26
9284	1	H6
9285	3	H6, H14, H34
9286	2	H12, H14
9287	2	H12, H14
9288	3	H6, H10
9289	4	H6, H10, H12
9290	3	H6, H9
9291	4	H6, H19, H31, H32
9292	5	H6, H10, H23, H35, H36
9293	2	H9, H24
9294	4	H6, H9, H12
9295	2	H9, H11
TOPLAM	87	-

Çizelge 3.12 Antalya 38 no'lu kıvılcık klonal tohum bahçesinde polen kirliliği (kontaminasyonu) parametreleri

b*	d*	m*
0.290 ± 0.026	0.738 ± 0.027	0.393 ± 0.038

*b: kontaminasyonla oluşmuş embriyoların gözlenen oranı, d: bir yabancı polen taneciğinin belirlenebilir bir çok-lokuslu belirteci taşıma olasılığı, m=b/d: Gerçek polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı tahmini, ± standart hata

Kendi-kendine dölleme (selfing) oranını tahmin edebilmek için, kendileme sonucu meydana gelen tohumların açıkça belirlenebilen sayıları göz önüne alınmalıdır. Diğer bir deyişle, kendi-kendine dölleme miktarını tahmin edilebilmek için tohum bahçesindeki klonların eşsiz (unique) genotipe sahip olması, başka klon veya tohum bahçesi dışından bireyle ortak genotipe sahip olmaması gerekmektedir. Örneğin, 9291 no'lu klona ait 3 embriyo anne ile aynı genotipe sahip olmasına rağmen kendi-kendine dölleme ile oluşma ihtimali tahmin edilemez. Çünkü bu klon 9267, 9277 ve 9292 no'lu klonlarla ve doğal popülasyondan bazı bireylerle de ortak genotipe sahiptir. Her bir klona ait çalışılan 10 embriyonun genotipleri incelendiğinde tohum bahçesindeki 15 klonda kendi-kendine dölleme (selfing) gözlenmemiştir. Bu çalışmaya konu olan tohum bahçesinde yer alan klonların bazıları ortak genotipe sahiptir (Bkz. Çizelge 3.2). Tohum bahçesi içindeki tüm klonlar göz önüne alındığında sadece 9268, 9274, 9276 ve 9284 no'lu klonlar eşsiz (unique) genotipe sahiptir. Bu klonlardan 9268, 9276 ve 9284 no'lu klonlara ait 1'er embriyonun genotipi anne ağaç ile aynı genotipe sahiptir fakat aynı genotipe sahip ağaçlara doğal popülasyonda da rastlanmaktadır. Bu embriyoların kendi-kendine dölleme ile oluşma ihtimali, dışarıdan herhangi bir polen akışı olmadığı varsayılırsa, %10'dur. Fakat yaptığımız çalışma sonucunda tahmin edilen %39'luk polen kontaminasyonu göz önünde bulundurulduğunda, bu embriyoların kendi-kendine dölleme sonucu oluşma ihtimalinin %3.9 (0.39 x 0.10) civarında olabileceğini söyleyebiliriz. Ancak burada hesaplanan oran etkili kendi-kendine dölleme oranıdır yani canlı ve olgunlaşarak embriyo oluşturabilen tohumlar kullanılarak hesaplanır. Genellikle kendi-kendine dölleme sonucu oluşan tohumlarda tohum içeriğinde eksiklikler, embriyo gelişiminde bozukluklar ve sonuç olarak boş tohum oluşması gözlemlenir (Stoeckert ve Newton 2002, Kaya 2005).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) Çığlık-Antalya mevkiinde 1992 yılında kurulmuş Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespikli) orijinli 38 no'lu klonal tohum bahçesi ile tohum bahçesine en yakın doğal kızılçam populasyonundan toplanan tohum ve ibre örneklerinde kloroplast SSR (cpSSR) belirteçleri kullanılarak analizler yapılmıştır. Tohum bahçesine ve doğal populusyona ait örneklerde (embriyo, megagametofit ve ibre dokusunda) DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri kullanılarak altı kloroplast SSR (cpSSR) lokusu, PCR ile çoğaltılmıştır. DNA parça (fragment) analizleri ile lokuslara ait alleller belirlenmiştir. Analizler sonucu elde edilen verilerle hem tohum bahçesinin ve doğal populusyonun genetik çeşitliliği, hem de tohum bahçesinde polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır.

4.1 Haplotip ve Allel Çeşitliliği

Yaklaşık son 25 yıldır farklı ülkelerde farklı araştırmacılar tarafından değişik orman ağacı türlerinde yapılan morfolojik, izoenzim veya DNA tabanlı analizler ile ilgili türlerin doğal populusyonlarının ve tohum bahçelerinin gen havuzları hakkında önemli bilgi birikimi sağlanmıştır. *P. brutia* populusyonlarında genetik çeşitlilik, eşleşme sistemi ve polen kirliliği üzerinde, değişik araştırmacılar tarafından izoenzim (Conkle vd 1988, Kara vd 1997, Panetsos vd 1998, Korol vd 2002a,b, Aravanopoulus vd 2004, Kaya vd 2006, Kaya ve Isik 2010) ve RAPD belirteçleri (Kandemir vd 2004, Içgen vd 2006, Lise vd 2007, Kurt vd 2011) kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Literatür bilgimize göre cpSSR belirteçleri kullanılarak kızılçamda yapılan ilk çalışma Bucci vd (1998)'nin yaptığı çalışmadır. Bucci vd (1998)'nin çalışmasında, Türkiye'den beş, Yunanistan'dan iki ve Lübnan'dan bir olmak üzere sekiz farklı kızılçam populusyonu ele alınmış ve genetik çeşitlilikleri ortaya konulmuştur. Ayrıca, İran ve Azerbaycan'dan iki *P. elderica* Medw., Türkiye, Yunanistan, İsrail, Cezayir, Fas, İspanya, Fransa ve İtalya'dan 10 *P. halepensis* Mill. populusyonunun genetik çeşitlilik düzeyleri belirlenmiştir.

Vendramin vd (1996) tarafından *Pinus thunbergii* Parl. genomuna dayanarak 20 çift cpSSR primeri geliştirilmiştir. Bu primerlerden 10 tanesi (Pt1254, Pt9383, Pt15169, Pt30204, Pt36480, Pt26081, Pt41093, Pt71936, Pt87268, Pt110048) birçok *Pinus* türünde ve değişik koniferlerde yaygın olarak kullanılmıştır (Bucci vd 1998, Echt vd 1998, Parducci vd 2001, Ribeiro vd 2001, Ribeiro vd 2002, Cuenca vd 2003, Dzialuk ve Burczyk 2004, Gomez vd 2005, Hansen vd 2005, Höhn vd 2005, Robledo-Arnuncio vd 2005, Naydenov vd 2005a, Naydenov vd 2005b, Naydenov vd 2006, Vaxevanidou vd 2006, Afzal-Rafii ve Dodd 2007, Bucci vd 2007, Fady vd 2008, Kaya vd 2008, Dzialuk vd 2009, Scalfi vd 2009, Heuertz vd 2010). Vendramin vd (1996) tarafından geliştirilen 20 çift cpSSR primerinin ve deneysel koşulların özellikle *P. brutia*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. pinea*'da %100 başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında 20 cpSSR primer çiftinden *P. brutia* için optimize edilebilen, aynı zamanda literatür bilgilerimize göre diğer orman ağaçlarında da yaygın olarak kullanılan, altı primer çifti tohum bahçesindeki polen kirliliği düzeyinin belirlenmesi için kullanıldı. Çalışılan primerlerden Pt41093 primeri monomorfik, diğer primerler ise (Pt1254, Pt30204, Pt87268, Pt15169 ve Pt71936) polimorfik olarak saptandı. Kızılçam ve diğer orman ağacı türlerinde yapılan önceki çalışmalarda Pt41093 lokusunun da polimorfik olduğu bildirilmiştir (Bucci vd 1998, Gomez vd 2005, Heuertz vd 2010).

Analiz edilen beş polimorfik lokusta (Pt1254, Pt15169, Pt30204, Pt87268, Pt71936) bulunan allel büyüklükleri Bucci vd (1998)'nin yaptığı çalışmadaki sonuçlar ile çoğunlukla paralellik göstermektedir. Bu tez çalışmasında incelenen ve en yüksek allel sayısına (yedi adet) sahip olan Pt1254 primeri, Bucci vd (1998) tarafından incelenen primerler arasında değildir. Her iki çalışmada da Pt30204 lokusunda iki ve Pt87268 lokusunda dört allel bulunmuştur. Bucci vd (1998) tarafından Pt71936 lokusunun 145-150 bp arasında altı allele sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada ise 143-150 bp arasında altı allel belirlenmiştir. Bununla birlikte, Bucci vd (1998)'nin çalıştığı popülasyonlarda, Pt15169 lokusunda dört allel bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ele alınan popülasyonlarda ise üç allel bulunmuştur. Bu durum; Bucci vd (1998)'nin örneklediği kızılçam popülasyonlarının hem sayıca fazla olması (sekiz popülasyon) hem de Yunanistan, Türkiye ve Lübnan gibi geniş bir coğrafik alanı kapsamasına karşın, bu tez çalışmasında sadece türün Antalya'da bulunan bir tohum bahçesinin ve bahçeye en

yakın doğal popülasyonun ele alınmış olması ile açıklanabilir. Bununla birlikte, farklı çevre koşullarında yetişen popülasyonlar farklı seleksiyon baskısına maruz kalabilirler. Özellikle orman ekosistemleri, çok kısa mesafelerde değişebilen farklı doğa birimlerinden oluşabilmektedir. Aynı türün bir dağın farklı yamaçlarında 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. 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 Pt1254 lokusunda bulunan alleller arasında bir baz çiftlik (bç)'lik, Pt71936 lokusunda bulunan alleller arasında ise iki bç'lik boşluğun olduğu görülmüştür. Benzer durum, Robledo-Arnuncio vd (2005) tarafından *P. sylvestris* popülasyonlarının genetik yapısının araştırıldığı çalışmada Pt71936 lokusunda belirtilmiştir. *P. sylvestris*'de 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 popülasyonun sekizinde görüldüğü ve mutasyonun 325 birey arasından sadece 11 birey tarafından taşındığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise kızılçamda Pt1254 lokusunda 67 ve 69 bç'lik allel büyüklükleri arasında bir baz çiftlik (bç)'lik, Pt71936 lokusunda ise, 143 ve 146 bç'lik allel büyüklükleri arasında iki bç'lik boşluğun olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 3.1).

Kızılçam tohum bahçesinde ve tohum bahçesi yakınında yer alan doğal popülasyondaki bireylerde altı cpSSR lokusunda yapılan analizler sonucunda 23 allel ve 36 haplotip belirlenmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından kızılçam ve/veya diğer konifer türlerinde allel sayısı 13-49 ve haplotip sayısı 13-139 arasında bulunmuştur. Örneğin, Bucci vd (1998) tarafından *P. brutia*'da dokuz cpSSR lokusunda yapılan analizlerde toplam allel sayısını 49 ve haplotip sayısını 40 olarak bildirmiştir. Aynı çalışmada *P. elderica* için 13, *P. halepensis* için 28 haplotip bulunmuştur. Ribeiro vd (2002) tarafından 24 *P. pinaster* popülasyonunda yapılan çalışmada altı cpSSR lokusunda 25 allel ve 108 haplotip bildirilmiştir. Cuenca vd (2003) tarafından

Meksika’da yayılış gösteren dokuz *P. nelsonii* populasyonunda yapılan çalışmada 11 cpSSR lokusundan dört tanesi polimorfik olarak saptanmış ve toplam 27 haplotip bildirilmiştir. Gomez vd (2005) tarafından *P. halepensis* (sekiz cpSSR lokusunda) ve *P. pinaster*’de (altı cpSSR lokusunda) yapılan çalışmada toplam 49 allel (*P. halepensis* için 20, *P. pinaster* için 29) belirlenmiştir. Aynı çalışmada *P. pinaster* için 69, *P. halepensis* için 21 haplotip bulunmuştur. Höhn vd (2005) tarafından *P. cembra*’da altı cpSSR lokusunda yapılan çalışmada toplam 22 allel ve 41 haplotip bulunmuştur. Robledo-Arnuncio vd (2005) tarafından 13 *P. sylvestris* populasyonunda altı cpSSR lokusunda yapılan çalışmada toplam 29 allel ve 139 haplotip bulunmuştur. Bucci vd (2007) tarafından 48 *P. pinaster* populasyonunda beş polimorfik cpSSR lokusunda yapılan çalışmada 103 haplotip bulunmuştur. Sarıçam’da iki cpSSR lokusunda yapılan diğer bir çalışmada toplam 13 allel ve 17 haplotip bulunmuştur (Scalfi vd 2009). Bu çalışmada *P. brutia* için elde edilen allel sayısı ve haplotip sayısı daha önceki çalışmalarda verilen değerlerle paralellik göstermektedir. Bütün çalışmalar incelendiğinde analiz edilen cpSSR lokusu sayısına göre elde edilen allel ve haplotip sayısının değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda yüksek allel ve haplotip sayısının bulunması çalışılan populasyonların yüksek genetik çeşitlilik barındırması ve her bir populasyondan çok sayıda birey analiz edilmiş olmasından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada altı cpSSR lokusuna dayalı olarak belirlenen haplotiplerden dokuz tanesinin (H1, H2, H3, H4, H5, H7, H8, H13 ve H16) hem kızılçam tohum bahçesinde hem de tohum bahçesi yakınında yer alan doğal populasyondaki bireylerde bulunduğu saptandı. Ortak olarak belirlenen haplotiplerin tohum bahçesindeki toplam frekansı 0,94 olarak, tohum bahçesi yakınındaki doğal populasyondaki toplam frekansı 0,64 olarak belirlendi. Bu sonuç çalışılan tohum bahçesinin ve onun kaynağı olan Gündoğmuş-Eskibağ populasyonunun ve bahçe yakınında yer alan doğal populasyonun gen havuzunun çalışılan cpSSR lokusları bakımından benzerliği veya farklılığı hakkında bilgi vermektedir. Yani tohum bahçesindeki klonların gen havuzu, çalıştığımız lokuslar bakımından, doğal populasyondan örneklenen bireylerin oluşturduğu gen havuzu ile benzerlik göstermektedir.

4.2 Klonların Genotipik Kimliklerinin Teşhisi

Ağaç ıslahı programları, eşleşme sistemi ve polen kirliliği vb. çalışmalar için gerekli olan önkoşullardan biri, tohum bahçelerini oluşturan klonların genetik kimliklerinin belirlenmesidir. Tohum bahçesindeki klonların genotiplerinin tespit edilmesi ve rametlerin ait oldukları varsayılan klonlara ait olup olmadığının belirlenmesi oldukça önemlidir (Paule 1991, Adams 1993). Tohum bahçelerindeki klonlara ait rametlerin, kuruluş aşamasında veya öncesinde, yanlış etiketlenmesi ve kuruluş aşamasında bazı klonların atlanması, eşleşme sistemi ve polen kirliliği gibi çalışmalarda tahmin edilecek parametrelerin doğruluğunu etkilemektedir (Kaya ve Isik 2010). Çalışmamızda tohum bahçesinde bulunan 30 klonda, analiz edilen altı lokus birlikte ele alındığında, toplam 12 çeşit haplotip gözlemlendi. Teorik olarak ise 12 değil, tohum bahçesindeki klon sayısı kadar (yani 30) haplotip kimlik saptanması beklenir. Bu farklılığın nedeni şöyle açıklanabilir; (1) klonların ortak babasal (paternal) atadan meydana gelmeleri sonucu farklı klonların aynı haplotipik kimliği taşımaları, (2) tohum bahçesinin kuruluş aşamasında bazı klonların etiketlemelerinin yanlış yapılması, (3) kullanılan belirteçlerin genetik kimlik tespitinde yetersiz olması. Bu nedenler, beklenenden daha az sayıda haplotip belirlenmesine neden olabilir (Dzialuk ve Burczyk 2004).

Stoehr vd (1998) tarafından *Pseudotsuga menziesii* klonal tohum bahçesinde yer alan 20 klonda yapılan kloroplast DNA analizlerinde 13 farklı genotip belirlenmiştir. *Quercus robur* tohum bahçesinde ve *P. contorta* tohum bahçesinde yapılan çalışmalarda da birbiri ile aynı genotipe sahip klonlar tespit edilmiştir (Buiteveld vd 2001, Stoehr ve Newton 2002). Slavov vd (2004) tarafından *Pseudotsuga menziesii* tohum bahçesine ait örneklenen bir blokta, geliştirdikleri SSR belirteçlerini kullanarak genotipleme çalışmaları yapılmıştır. Analizler blokta yer alan klonlara ait 3'er ramet üzerinde yapılmış ve bütün klonların beklenildiği gibi farklı genotiplere sahip olduğu belirlenmiştir. Slavov vd (2004)'nin çalışmasında her bir klona ait rametlerin genotipleri incelendiğinde, bir ramet hariç diğerlerinin ait olduğu klonla aynı genotipe sahip olduğu saptanmıştır. Bu rametin tohum bahçesindeki farklı bir bloğa ait olabileceği ve muhtemelen tohum bahçesinin kuruluş aşamasında yanlış etiketleme sonucunda çalışılan bloğa yanlışlıkla dikilmiş olabileceği bildirilmektedir.

Tohum bahçesinden rastlantısal olarak seçilen beş klonun (9282, 9289, 9290, 9294 ve 9295 no'lu klonlar) her birinden örneklenen beş ramet üzerinde ilave analizler yapılarak genotipleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın başlangıcında bu beş klonun her birinden örneklenen beşer rametin genotiplerinin ait oldukları klonun genotipi ile tıpa tıp aynı olduğu varsayımı yapılmıştır. Çünkü vejetatif yolla aynı bireyden (ortetten) üretilen bireylerde (rametlerde) genotiplerin tıpatıp birbirleriyle ve ortet bireylerle aynı olması beklenir. Bununla birlikte, analizler sonucunda bu varsayımın bu beş klonun her biri için geçerli olmadığı gözlenmiştir. Örneğin, 9282 no'lu klona ait iki ramet H3, bir ramet H20 no'lu haplotipi gösterirken diğer iki ramet ise H8 no'lu haplotipi göstermektedir. Oysa 9282 no'lu klona ait beş rametin hepsinin de aynı (tek bir) haplotipi göstermesi gerekirdi. 9282 no'lu klona ait sadece bir ramette görülen H20 genotipi, tohum bahçesindeki hiçbir klonun genotipine benzememektedir. Bu durumda 9282 no'lu klonun muhtemel genetik kimliği için iki varsayım yapılabilir; (1) tohum bahçesinde H8 haplotipi yaygındır. Bu nedenle 9282 no'lu klonun haplotipi de H8 olabilir, (2) H20 haplotipi tohum bahçesinden analiz edilen bireylerden sadece 9282 no'lu klon olarak etiketlenmiş bir ramette gözlenmiştir ve bu klonun gerçek haplotipi H20 olabilir.

9289 no'lu klonun ise 1. rameti H13 no'lu haplotipi, 2., 3. ve 4. rametleri H3 no'lu haplotipi gösterirken 5. rameti H8 no'lu haplotipi göstermektedir. 9290 no'lu klona ait üç ramet H2 haplotipini, iki ramet ise H13 haplotipini göstermektedir. Bu durum adı geçen rametlerin yanlış etiketlenmiş olduğunu göstermektedir. Örneğin, H13 haplotipi 9289-1, 9290-4, 9290-5 no'lu rametlerde görüldüğü için, 9289 ve 9290 no'lu klonların etiketleme sırasında karışmış olabileceği söylenebilir. Bu durumda 9289 no'lu klonun muhtemel genetik kimliğinin H3 ve 9290 no'lu klonun muhtemel genetik kimliğinin H13 haplotipi olduğu söylenebilir (Bkz. Çizelge 3.3). 9294 ve 9295 no'lu klonların rametlerinin genotiplerinin de birbirine tıpatıp benzemediği görülmektedir. Ayrıca 9294 no'lu klona ait iki rametin (H7 genotipine sahip) tohum bahçesindeki hiçbir klonun genotipine benzemediği belirlendi. Bu bağlamda, 9294 no'lu klonun muhtemel genetik kimliğinin H7 haplotipi olduğu söylenebilir. H1 haplotipi 9294-5, 9295-1 ve 9295-2 no'lu rametlerde görüldüğü için, 9294 ve 9295 no'lu klonlara ait rametlerin etiketleme sırasında karışmış olabileceği ve 9295 no'lu klonun muhtemel genotipinin H1 haplotipi

olduğu söylenebilir (Bkz. Çizelge 3.3). Sonuç olarak adı geçen rametlerin ait oldukları sanılan klondan farklı genotiplere sahip olması, bu rametlerin tohum bahçesinin kuruluş aşamasında veya öncesinde yanlış etiketlenmiş olmasıyla açıklanabilir. Bu bilgi ışığında, adı geçen beş klonun gerçek genetik kimliklerinin belirlenmesi ve tohum bahçesinde yer alan diğer klonlarda da yanlış etiketlemeler olup olmadığını tespit edebilmek için; (1) tohum bahçesindeki tüm rametlerin genotipik kimliklerinin belirlenmesini, (2) yanlış etiketlenmiş olanların ait oldukları doğru klona dahil edilmesini, (3) hiçbir klona dahil edilemiyorsa tohum bahçesinden kesilip çıkarılmasını ve (4) gerekiyorsa tohum bahçesindeki bütün rametlerin yeniden doğru klon numarası ile etiketlenmesini sağlayacak çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Tohum bahçesinin kuruluş aşamasında klonlara ait bireylerin yanlış etiketlenmesi gibi deneysel hatalara ne yazık ki sık sık rastlanmaktadır. Örneğin, Paule (1991), bir sarıçam tohum bahçesinde yer alan 43 klonun her birine ait ikişer ramette izoenzim analizlerini yapmış; incelediği 86 rametten 10 tanesinde (%11.6) genotiplerin ilgili ortet birey ve ilgili rametlerle tıpatıp uymadığını ortaya çıkarmıştır. Goto vd (2001) tarafından Japonya’da bir *P. thunbergii* klonal tohum bahçesinde RAPD analizleri ile yapılan çalışmada da klonlara ait rametlerde yanlış etiketlemeler saptanmıştır. Ayrıca Goto vd (2001)’nin çalışmasında tohum bahçelerine ait klonların genetik kimliklerinin kontrol edilmesinde RAPD tekniği ve ‘bulk’ tohum kullanılarak yapılan analizlerin hızlı ve etkili bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Kaya ve Isik (2010) tarafından bir kızılçam tohum bahçesinde yer alan 28 klonun genetik kimlikleri izoenzim analizleri ile belirlenmiştir. Kaya ve Isik (2010)’nin çalışmasında klonların her birinin farklı genetik kimliğe sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmada, incelenen 84 rametten 5 tanesinin (%6) genotiplerinin ilgili klona ait diğer rametlerle tıpatıp uymadığı ortaya çıkmıştır.

Tohum bahçesinde yer alan 30 klonun her birine ait ramet sayıları kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda, tohum bahçesinde etkili klon sayısı (N_c) 29 olarak bulundu. Prescher vd (2008) tarafından 32 klona sahip Norveç ladini tohum bahçesinde yapılan çalışmada genetik aralama kesimi öncesinde etkili klon sayısı 19.99, genetik aralama kesimi sonrasında ise 22 olarak saptanmıştır. Genetik aralama kesiminin genetik kazancı arttırmada etkili olduğu bildirilmiştir. Kang vd (2001b) tarafından

Finlandiya, Kore ve İsveç'deki *P. sylvestris*, *P. abies*, *P. koraiensis* ve *P. densiflora* türlerine ait 255 klonal tohum bahçesinde yapılan çalışmada ortalama etkili klon sayısı 66 olarak belirlenmiştir. Kang vd (2001b)'nin çalışmasında genellikle etkili klon sayısının tohum bahçelerindeki gerçek klon sayısına göre daha bilgi verici olduğu ve tohum bahçesinin gen havuzunun tanımlanmasında önemli olduğu belirtilmektedir. Ayrıca klonların gamet gen havuzuna olan etkileri hem klonlara ait ramet sayısına hem de farklı klonlardaki rametlerin verimliliğine (dişi ve erkek çiçek üretimine) bağlıdır. Klonlara ait ramet sayısı farklılıkları, etkili klon sayısı üzerinde, tohum bahçesi tesisinde kullanılan toplam/ortalama ramet sayısından daha önemlidir. Ayrıca tohum bahçesinden elde edilecek tohum ürünündeki gen çeşitliliğinin tahmini, tohum bahçesinin tesis ve bakım çalışmaları için önemlidir. Bu tür çalışmalar tohum bahçelerinin kurulmasında (kullanılacak ramet ve klon sayısının belirlenmesi) ve var olan tohum bahçelerinin yönetilmesinde katkı sağlayacak önemli bilgiler sunmaktadır. Bu tez çalışmasında etkili klon sayısı ile tohum bahçesinde bulunan gerçek klon sayısı birbirine yakın olarak bulunmuştur. Tohum bahçesindeki klonların gamet gen havuzuna etkilerinin derecesini belirlemek için dişi ve erkek çiçek üretimi ve verimliliği üzerine çalışmaların planlanması gerekmektedir.

4.3 Tohum Bahçesinin ve Doğal Populasyonun Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi

Tohum bahçesindeki klonlar ile doğal populasyona ait ağaçlar arasında çalışılan cpSSR lokuslarının allel frekansları bakımından, birbirinden istatistiki önemde farklar bulunmuştur ($P < 0.05$). Özellikle Pt1254, Pt87268 ve Pt71936 lokusları bu iki populasyon arasındaki farklılığın kaynağıdır. Şöyle ki doğal populasyonun gen havuzunda Pt1254 ve Pt71936 lokuslarının, tohum bahçesi anaç gen havuzunda bulunmayan allellere sahip olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 3.7). Analizler sonucunda bu allellere tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda da rastlanmıştır. Tohum bahçesinin yakınında yer alan doğal populasyonun gen havuzunun, tohum bahçesinin gen havuzundan farklı olması beklenen bir durumdur. Çünkü tohum bahçesindeki bireyler Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespikli) tohum meşceresi orijinelidir. Gündoğmuş-Eskibağ orijini ile (1000 m) tohum bahçesinin yakınındaki doğal kızılçam populasyonu (320 m) farklı yükseltilerde yer almaktadır. Bu nedenle Gündoğmuş-Eskibağ kızılçam tohum meşceresi gen havuzu ile tohum bahçesi

yakınındaki doğal kıvılcım populasyonu farklı evrimsel güçlerin (özellikle farklı seleksiyon basıncının) etkisi altında bulunmaktadır. Bu durum, tohum bahçesinin gen havuzu ile tohum bahçesinin yakın çevresindeki doğal populasyonun gen havuzunun farklı olmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanında, tohum bahçesindeki klonlar yoğun bir yapay seleksiyonla seçildikten sonra tohum bahçelerine getirildikleri için tohum bahçesi ve tohum bahçesine yakın doğal populasyonlar arasında gen frekansları bakımından daima bir fark olması beklenir (Snieszko 1981, Squillace ve Long 1981).

Tohum bahçesinde genetik kirlilik oranının tahmin edilmesinde, tohum bahçesine yakın ve onu çevreleyen doğal populasyonların gen havuzunda, tohum bahçesi gen havuzunda bulunmayan allellerin bulunması ya da bunlar arasında allel frekansları bakımından önemli farklılıkların olması gibi veriler önemli yararlar sağlamaktadır (Smith ve Adams 1983). Ayrıca, tohum bahçesinin yakın çevresindeki doğal populasyonların gen havuzunun tohum bahçesinin gen havuzundan önemli ölçüde farklı olması, özellikle polen kirliliği (kontaminasyonu) olması durumunda tohum bahçesi tohumlarının genetik yapısını ve kalitesini önemli derecede değiştirebilir (Paule vd 1993). Tohum bahçelerinde ebeveyn analizi ve polen kirliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan farklı çalışmalarda da tohum bahçesi, embriyolar ve yakınında yer alan doğal populasyonlar arasında allel farklılıkları bulunmuştur (Buiteveld vd 2001, Kaya vd 2006, Torimaru vd 2009). Örneğin, Buiteveld vd (2001) tarafından *Q. robur* tohum bahçesinde altı nükleer SSR (nSSR) lokusunda yapılan analizlerde tohum bahçesindeki 57 klonun genotipi ve bu klonlardan üç tanesine ait toplam 180 tohumun genotipi belirlenmiştir. Buiteveld vd (2001)'nin çalışmasında, tohum bahçesindeki bu üç klon tarafından üretilen embriyolarda gözlenen yedi allelin tohum bahçesindeki klonlarda olmadığı, tohum bahçesinde gözlenen 12 allelin ise bu üç klon tarafından üretilen embriyolarda olmadığı saptanmıştır. El-Kassaby vd (1989) tarafından iki sarıçam tohum bahçesinde 21 izoenzim lokusu kullanılarak yapılan çalışmada bahçenin birisi ile dışarıdan gelen polenler ve embriyolar arasında allel frekansları bakımından fark bulunmazken, diğer tohum bahçesindeki klonlar ve dışarıdan gelen polenlerin gen havuzundaki alleller arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 3.8'deki veriler, tohum bahçesinin, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyoların ve doğal popülasyona ait bireylerin genetik çeşitliliğine ait bilgiler ortaya koymuştur. Tohum bahçesinin ve doğal popülasyonun çalışılan cpSSR lokusları ele alındığında polimorfizm oranı aynı bulunmuştur (%83.33). Çalışılan altı cpSSR lokusu ele alındığında, tohum bahçesinde 17 allel, embriyolarda 23 allel ve doğal popülasyonda 22 allel saptandı. Çalışmamızda tohum bahçesi klonlarında gözlenen allel sayısı embriyolara ve doğal popülasyona göre daha düşüktür. Höhn vd (2005) tarafından dört *P. cembra* doğal popülasyonunda yapılan çalışmada popülasyon başına düşen ortalama allel sayısı 16.5 olarak bildirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda, tohum bahçesi klonlarında, Nei'nin (1973) genetik çeşitlilik katsayısı (h), lokus başına gözlenen allel sayısı ve etkili allel sayısı, embriyolara ve doğal popülasyona göre daha düşük bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.8). Tohum bahçesini oluşturan bireylerin belirli karakterler bakımından (boy, gövde çapı, gövde düzgünlüğü gibi) fenotipik seleksiyonla yapay olarak seçilmiş olması sonucu, tohum bahçesinin genetik tabanı daralmış ve bu durum bazı lokusların tohum bahçesi klonal gen havuzunda temsil edilmemesine yol açmış olabilir. Bu nedenle tohum bahçesine ait genetik çeşitlilik parametreleri daha düşük çıkmış olabilir.

Bu tez çalışmasında, basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki ortalama genetik uzaklık katsayısı (D^2_{sh}) 3.83 olarak bulundu (Bkz. Çizelge 3.9). Farklı orman ağacı türlerinde yapılan çalışmalarda genetik uzaklık katsayısı (D^2_{sh}) değeri; Morgante vd (1997) *P. halepensis* Mill.'de 3.58, Echt vd (1998) *P. resinosa*'da 0.154, Ribeiro vd (2001) *P. pinaster*'de 3.01, Parducci vd (2001) *Abies* türlerinde 11, Gomez vd (2005) *P. halepensis* ve *P. pinaster* Ait.'de sırasıyla 3.83 ve 0.83, Robledo-Arnuncio vd (2005) *P. sylvestris* L.'de 4.3, Terrab vd (2006) *Cedrus* türlerinde 11.46, Dzialuk vd (2009) *P. uncinata*'da 8.43 olarak bulunmuştur. Vaxevanidou vd (2006) tarafından endemik *P. canariensis*'in merkezi ve periferik (kenar) popülasyonlarında yapılan çalışmada D^2_{sh} değeri sırası ile 1.07 ve 1.52 olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, elde edilen D^2_{sh} değeri Akdeniz havzasında ve/veya Avrupa'da yayılış gösteren diğer çam türleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Haplotipik çeşitlilik düzeyinin kızılçamda yüksek bulunması, kızılçamın diğer çam türleri gibi yüksek genetik çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Populasyon-içi genetik çeşitliliğin bir göstergesi olan Shannon sabiti (I) en yüksek embriyolarda hesaplandı ($I=0.74$). Embriyolara ait genetik çeşitlilik parametreleri incelendiğinde, allel sayısı ve genetik çeşitlilik katsayısının yüksek olması ve embriyolara özgü haplotip sayısının fazla olması populasyon içi çeşitliliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları da tohum bahçesi, embriyolar ve doğal populasyon arasındaki varyasyonun büyük oranda (%98) populasyon içerisinde olduğunu, populasyonlar arası genetik farklılaşmanın düşük olduğunu (%2) göstermektedir (Bkz. Çizelge 3.10). Ribeiro vd (2002) tarafından 24 *P. pinaster* populasyonunda yapılan çalışmada populasyonlar arası genetik çeşitlilik %2 olarak bildirilmiştir. Naydenov vd (2006) tarafından Bulgaristan'daki dokuz *P. nigra* populasyonunda yapılan çalışmada populasyonlar arası genetik farklılaşma %6.06, populasyon içi genetik çeşitlilik ise %93.94 olarak bildirilmiştir. Hamrick ve Godt (1989), rüzgarla yayılan polenler tarafından meydana gelen yüksek gen akımının, koniferlerde populasyon içi çeşitliliğin yüksek olmasının ve populasyonlar arası farklılaşmanın düşük seviyede olmasının en önemli nedeni olduğunu söylemektedir. Hansen vd (2005)'e göre gen değişimi için kuvvetli bariyerlerin olmaması (yani polen yolu ile gen akışı), kullanılan belirteçlerin mutasyonel mekanizması ve türün tarihsel gelişimi (şişebogağı etkisi, kurucu etkisi vb.) populasyonlar arası genetik farklılaşmanın az olmasının nedeni olabilir. Populasyonlar arası genetik farklılaşmanın başka bir nedeni de, çalışılan populasyonların orijinlerindeki çevresel etkenlerin ne kadar benzer ya da ne kadar farklı olduğuna (doğal seçilime) bağlı olmasıdır. Genel olarak, orman ağaçlarında populasyon-içi genetik çeşitlilik diğer canlılara göre daha yüksek, populasyonlar arasındaki farklılaşma daha düşüktür.

Populasyonların genetik çeşitliliği ve yapısı evrimsel güçlerin ortaklaşa etkisiyle şekillenir. Özellikle eşleşme 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). Kloroplast basit dizi tekrarları seçim ve çevresel faktörlerden doğrudan etkilenmemelerine karşın, evrimsel güçler 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. Bu nedenle, kızılçam gibi nispeten uzun ömürlü, farklı ekolojik koşullarda yayılış gösteren, optimum yayılış alanında kesintisiz dağılım gösteren bitki türlerine ait populasyonlar karakteristik olarak yüksek düzeyde populasyon-içi genetik çeşitlilik gösterirler (Bradshaw 1972, Işık 1999a, Provan vd 2001, Balloux ve Lugon-Moulin 2002, Navascues ve Emerson 2005). Ayrıca, morfolojik karakterler (boy, çap vb.) üzerinde daha önce yapılan genetik araştırmalarda da kızılçamda populasyonlar-arası genetik çeşitliliğin nispeten az, fakat populasyonlar-içi genetik çeşitliliğin oldukça yüksek (yani %85 ve üzeri) olduğu bulunmuştur (Isik ve Isik 1999, Isik vd 1999, Caliskan 2006, Alan ve Yıldız 2006, Kurt 2011). Hem morfolojik hem de moleküler verilere dayalı olarak kızılçamda populasyon-içi genetik çeşitliliğin yüksek bulunması, kızılçamın ağaç ıslahı çalışmaları için uygun genetik tabana sahip bir tür olduğunu göstermektedir.

Haplotip zenginliği (R_h) tohum bahçesi klonlarında 10.7, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda 16.5, doğal populasyona ait bireylerde 18 olarak bulundu. Fady vd (2008) tarafından doğal *C. libani* populasyonlarında yapılan cpSSR analizlerinde haplotip zenginliği 6.36 olarak bildirilmiştir. Nei'nin (1987) tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı (H_e) tohum bahçesi klonlarında 0.8490, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda 0.9224, doğal populasyona ait bireylerde 0.9195 olarak hesaplandı (Bkz. Çizelge 3.9). Ortalama haplotip çeşitlilik değerinin ($H_s = 0.897$) yüksek olması populasyon içindeki genetik çeşitliliğin yüksek olduğunun göstergesidir.

Çalışmamızda genetik farklılaşma katsayısı (G_{ST}) ortalama %2.9 olarak bulundu. Yani populasyonlar arası genetik çeşitlilik toplam çeşitliliğin %2.9'dur. Genetik farklılaşmanın başlıca Pt1254, Pt87268 ve Pt71936 lokuslarından kaynaklandığı görüldü. Buiteveld vd (2001) tarafından 57 klona sahip *Q. robur* tohum bahçesinde yapılan çalışmada haplotip çeşitlilik katsayısını (H_e) tohum bahçesi klonlarında 0.84, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen embriyolarda 0.72, yakın bölgede yer alan iki doğal populasyonda 0.85 olarak saptanmıştır. Ribeiro vd (2001) tarafından 12 *P. pinaster* populasyonunda altı cpSSR lokusu kullanılarak yapılan çalışmada $H_e = 0.87$

olarak belirtilmiştir. Cuenca vd (2003) tarafından dört polimorfik cpSSR lokusu kullanılarak 9 *P. nelsonii* popülasyonunda yapılan çalışmada $H_e = 0.64$ olarak bulunmuştur. Gomez vd (2005) tarafından *P. halepensis* ve *P. pinaster*'de yapılan çalışmada ortalama haplotipik çeşitlilik değeri sırasıyla 0.93 ve 0.58 olarak hesaplanmıştır. Bu değer Höhn vd (2005) tarafından *P. cembra*'da 0.92, Robledo-Arnuncio vd (2005) tarafından *P. sylvestris*'de 0.98 olarak bulunmuştur. Petit vd (2005), *Pinaceae* familyasında yer alan sekiz türde ortalama haplotipik çeşitlilik değerini 0.37 olarak hesaplamıştır. Vendramin vd (2008) tarafından *Pinus pinea*'da yapılan çalışmada bulunan düşük H_e (0.019) değeri, türün genetik çeşitlilik yönünden ne kadar fakir olduğunu ortaya koymuştur. Myers vd (2007) *P. strobus*'a ait anakara ve adalarda yer alan 20 popülasyonda yaptıkları çalışmada ortalama haplotip çeşitliliğinin 0.80 olduğu ve popülasyon-içi çeşitliliğinin ada ve anakara popülasyonları arasında benzerliğinin geçmişte meydana gelen uzak mesafeli polen akışından kaynaklandığı bildirilmiştir. Bucci vd (2007) tarafından *P. pinaster*'in bütün doğal yayılış alanından örneklenen 48 popülasyonda yapılan çalışmada ortalama haplotip çeşitliliği 0.83 olarak ve en yüksek haplotip çeşitliliğinin güney batı ve orta İspanya'daki popülasyonlara ait olduğu bildirilmiştir.

4.4 Polen Kirliliği (Kontaminasyonu) Oranı

Polen kirliliği ve soy-içi üreme (inbreeding), özellikle kendi-kendine döllenme (selfing), rüzgarla tozlaşan tohum bahçelerinin genetik verimliliğini azaltan önemli faktörlerdendir (Xie ve Knowles 1994). Tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme (outcrossing) ve soy-içi üreme ile kendi-kendine döllenmenin etkilerinin değerlendirilmesi önemlidir. Şöyle ki: eğer tohum bahçesindeki bireyler arasında kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı az ise veya kendi-kendine döllenme oranı yüksek ise, tohum bahçesinde üretilen tohumların miktarı ve genetik kalitesinde önemli bir azalma olabilir (Omi ve Adams 1985). Tohum bahçesinde kendinden-başka-bireylerle döllenme tohum bahçesinin yakın çevresindeki doğal popülasyonlardaki bireylerle oluyorsa, bu durumda tohum bahçesinde genetik kirlilikte bir artış olacaktır. Bu çalışmada tohum bahçesine dışarıdan polen karışıp karışmadığı eğer karışmışsa ne ölçüde karıştığının belirlenmesi için yapılan istatistikî analizler sonucunda 300 embriyoda 87 gametin (%29) kontaminant olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.11).

Yani 87 gameti oluşturan polenler tohum bahçesi dışındaki kızılçam ağaçlarına aittir. Diğer bir deyişle 87 gametin oluşumuna tohum bahçesindeki klonlara ait rametlerin babasal katkısı bulunmamaktadır. Tohum bahçesindeki 19 klona ait embriyoların en az %30'u dışarıdan gelen polenlerle döllenme sonucu oluşmuştur. Doğal populasyon ve tohum bahçelerinden farklı araştırmacılar ve değişik orman ağacı türlerinde yapılan çalışmalarda da kontaminant gametlerin varlığı tespit edilmiştir. Örneğin, Dow ve Ashley (1998) tarafından *Q. macrocarpa*'da yapılan çalışmada populasyonun üç farklı bölgesinden (batı kenarından, ortasından ve doğu kenarından) örneklenen üç meşe ağacında sırasıyla %51, %63 ve %58 oranında yabancı polenlerle döllenme sonucu oluşmuş gametler belirlenmiştir. Streiff vd (1999) tarafından yapılan çalışmada *Q. petraea* ve *Q. robur*'dan oluşmuş doğal populasyonda analiz edilen 984 gametin 657 tanesinin, populasyonun dışında yer alan erkek bireyden gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuğunu saptamıştır. Buiteveld vd (2001), *Q. robur* tohum bahçesinde çalışılan 180 meşe palamudunun 115 tanesinin (%64) genotipinin tohum bahçesindeki genotiplerle uymadığını ve muhtemelen tohum bahçesi dışından gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuklarını bildirmiştir. Fernandes vd (2008) tarafından etrafi *Eucalyptus grandis* ve *P. pinea* türleri ile çevrili bir *P. pinaster* tohum bahçesinde yapılan çalışmada analiz edilen 206 embriyonun 108'inin (%52.4) tohum bahçesi dışından gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuğunu saptamıştır ve tohum bahçesinde ele alınan üç farklı alanda kontaminasyon oranı sırası ile %48.5, %60 ve %48.6 olarak belirlenmiştir. Jones vd (2008) tarafından çevresi doğal *Eucalyptus* türleri ile çevrili ve herhangi bir izolasyonun olmadığı *Eucalyptus grandis* tohum bahçesinde yapılan çalışmada bahçeden toplanan tohumlardan elde edilen 329 fideden 151'inin (%45.9) tohum bahçesi dışından gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuğu saptanmıştır ve tohum bahçesindeki anaç ağaçlardaki bireysel kontaminasyon oranının %34 ile %53 arasında değiştiği bildirilmiştir. Torimaru vd (2009) tarafından yapılan çalışmada *P. sylvestris* tohum bahçesine ait 305 tohumun genotipleri belirlenmiş, bu tohumların %48.2'si tohum bahçesi kaynaklı polenlerle, %51.8'i ise tohum bahçesi dışından gelen polenlerle döllenme sonucu oluştuğu saptanmıştır.

Plomion vd (2001) tohum bahçesindeki klonlarda gözlenen kontaminant gametlerin varlığının nedenlerini şöyle açıklamaktadır; (1) tohum bahçesi dışından gelen polen

göçü, (2) tohum bahçesinin kurulduğu alanda doğal rejenerasyon, (3) cpSSR lokuslarına ait allellerde tek bazlık fark olduğu için skorlama hataları ve (4) düşük ihtimalle heteroplazmi, inversiyon oluşturan saç tokası şeklindeki ilmekler (Hairpin loop) ve sıklıkla mutasyon meydana gelen bölgelerin bulunması. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre çalışılan kızılçam tohum bahçesinde gözlenen kontaminant gametlerin varlığının (%29) en olası nedeni tohum bahçesi dışından gelen polen göçü olarak söylenebilir.

Tohum bahçesinde gözlenen, "kesin olarak belirlenebilir" kontaminantların oranı 0.290 olarak bulunmuştur. Yani tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen tohumların %29'u, kesinlikle tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilmeyen polenlerle döllenme sonucu olmuştur. Bu polen kirliliğinin minimum tahminidir. Tohum bahçesinde tahmin edilen gerçek polen kirliliği ise %39.3 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 3.12). Gerçek polen kirliliği oranı belirlenirken hem kesin olarak belirlenebilir kontaminantlar, hem de tohum bahçesi ve yakın doğal populasyonlar arasındaki allel frekansındaki farklılıklar dikkate alınır. Yani polen kirliliği sadece tohum bahçesinde bulunmayan allellerin tohum bahçesi tarafından üretilen tohumların yapısına katılmasıyla sınırlı kalmaz. Aynı zamanda polen kirliliği sonucunda genetik olarak arzu edilen allellerin frekansında artma veya azalmalar söz konusu olabilir. Tohum bahçesini çevreleyen yakın doğal populasyonların gen havuzunda bulunan alleller aynı zamanda tohum bahçesi gen havuzunda da bulunabilir. Eğer her iki gen havuzunun allel frekanslarında farklılıklar varsa, bu durumda doğal populasyonlardan yayılan polenlerle kontaminasyon sonucunda, tohum bahçesinde üretilen tohumların gen havuzu yine değişecektir.

Değişik araştırmacılar tarafından farklı orman ağacı türlerine ait populasyonlarda polen kirliliği oranının %5 ile %90 arasında değişen değerlerde olduğu bildirilmiştir (Çizelge 4.1). Örneğin, Kaya vd (2006) tarafından Antalya-Asar *P. brutia* tohum bahçesinde izoenzim analizleri ile yapılan çalışmada yüksek derecede polen kirliliği (%85) saptanmıştır. Slavov vd (2005a) tarafından *Pseudotsuga menziesii* tohum bahçesinde 1999, 2000 ve 2003 yıllarına ait tohumlar ile SSR belirteçleri kullanılarak yapılan çalışmada ortalama polen kontaminasyonu %35.3 (%31 ile %41.3 arasında)

olarak belirlenmiş ve polen kontaminasyonu oranının klonlar arasında değiştiği bildirilmiştir. Özellikle polen kontaminasyonunun erken polen kabul eden dişi çiçeklere sahip klonlarda (kontaminasyon oranı ortalama %55.5) daha yüksek olduğu saptanmıştır. Pakkanen vd (2000) tarafından *Picea abies* tohum bahçesinde 1989, 1992 ve 1993 yıllarına ait tohum örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada ortalama polen kontaminasyonu %70 olarak belirlenmiş, çiçeklenme fenolojisinde ve iklimsel koşullarda farklılık olmasına rağmen yıllar arasında polen kontaminasyonu açısından fark bulunmamıştır. Aynı çalışmada tohum bahçesinin aralama yapılmış ve yapılmamış bloklarındaki polen kirliliği oranı karşılaştırılmış, aralama yapılmış bloklardaki polen kontaminasyonu oranının, aralama yapılmamış bloklardakinden istatistiki olarak önemli derecede düşük olduğu saptanmıştır ($\chi^2 = 2.69$, $p < 0.01$). Yazdani ve Lindgren vd (1991) tarafından sarıçam tohum bahçesindeki farklı bloklarda yapılan çalışmada, klonlar arasında yıllara göre polen kontaminasyonu oranının istatistiki önemde farklı olmamasına rağmen, farklı bloklardaki polen kontaminasyonu oranının yıllara göre istatistiki olarak farklı olduğu bulunmuştur. Bir tohum bahçesinde polen kirliliği oranı farklı yıllarda farklı bulunabilir. Çünkü tohum bahçesine giren yabancı polen oranı değişik yıllarda farklılık gösterebilir. Ayrıca, her yıl tohum oluşumuna ebeveynlerin farklı katkısı ve her yıl polen dağılımını etkileyen iklimsel faktörlerin de değişmesi, oluşan tohumlarda genetik yapıyı etkilemektedir (Keskin 1999). Bir tohum bahçesinde üretilen polenlerin miktarının değişmesi kontaminasyon oranını etkileyecektir. Ayrıca bir tohum bahçesinin değişik kısımlarının (örneğin merkez ve kenardaki kısımlar) polen göçünden ne derece etkilendiğinin bilinmesi de önemlidir. Elde edilecek bu tarz bilgiler mevcut tohum bahçelerinden toplanan tohumların kontaminasyon riskine göre sınıflandırılmasını mümkün kılacak ve tohum bahçelerinin işletilmesinde faydalı olacaktır.

Harju ve Nikkanen (1996) bir sarıçam tohum bahçesinde, tohum bahçesinin en yakın sarıçam popülasyonuna 2 km uzakta olmasına rağmen, polen kirliliği oranını %48 olarak bildirmiştir. Harju ve Muona (1989), Wang vd (1991), Pakkanen ve Pulkinen (1991) ve Burczyk vd (2004b) değişik türler üzerinde yaptıkları araştırmalarda, buldukları polen kirliliği düzeyinin adı geçen tohum bahçelerinde bu kadar yüksek olmasının nedenlerini, tohum bahçesinin yeteri kadar büyük olmamasından dolayı

Üretilen polenlerin azlığına ve klonların çiçeklenme fenolojilerindeki farklılıklara bağlamaktadırlar. Değişik türlere ait tohum bahçelerinde, klonların polen üretimi bakımından farklılıklar gösterdikleri belirtilmektedir (Yazdani vd 1995, Keskin 1999). Ayrıca tohum bahçesindeki klonlardaki dişi çiçeklerin maksimum polen kabul dönemi ve erkek çiçeklerin de maksimum polen yayma döneminin akışıp çakışmadığı da kendi kendine döllenme oranı ve polen kirliliği düzeyini değiştirebilecek önemli bir faktördür. Polen kontaminasyonu açısından, tohum bahçesinin bizzat kendi yaşı kadar, tohum bahçesini çevreleyen yakın doğal populasyonların yaşı da oldukça önemlidir. ığlık tohum bahçesinin yakınındaki doğal populasyonların yaşı 40'ın üstündedir ve muhtemelen polen üretimi tohum bahçesindeki bireylere göre daha fazladır. Üstelik tohum bahçesini çevreleyen bu doğal populasyonların tohum bahçesine bu kadar yakın ve tohum bahçesine göre daha geniş bir alanda olmaları da polen kontaminasyonu oranının bu derece yüksek olmasında etkili olmuştur. Yapılan alışmalar halen bir çok *Pinus* türünde polen kontaminasyonunu azaltmak için kullanılan 120-150 m'lik izolasyon zonlarının bile etkili olmadığını göstermektedir (Squillace 1967, Squillace ve Long 1981).

Tohum bahçesi dışındaki kaynaklardan bahçeye gelen polenler, açık tozlaşma yoluyla işletilen tohum bahçelerinden elde edilecek potansiyel genetik kazancın ciddi bir şekilde azaltmaktadır. Çünkü yüksek orandaki polen kirliliği tohum bahçesi tohumlarında genetik çeşitliliği arttırmasına rağmen, yabancı polenler istenmeyen genetik özellikler taşıyan populasyonların gen havuzundan geldiği takdirde bahçedeki tohumlardan beklenen genetik kazancın azalmasına neden olmaktadır (Fast vd 1986, Wiselogel 1986, Kang vd 2001a). Bunun yanı sıra tohum bahçesi dışından gelen gen göçü, tohum bahçesinin genetik etkinliğini azaltan ve üretilen tohumların hizmet edecekleri bölge için uyum değerini bozan bir faktör olabilir. Özellikle tohum bahçesine dışarıdan gelen polenler, tohum bahçesinden elde edilecek tohumların dikileceği alanlara daha zayıf adapte olan populasyonlardan geliyorsa, bu sorun daha büyük önem kazanır (Snieszko 1981). Bu tez çalışmasında bulunan %39.3'lk polen kirliliğinin, tohum bahçesinden beklenen genetik kazancı yaklaşık olarak %20 kadar azaltacağı hesaplanmıştır. Plomion vd (2001) tarafından *P. pinaster* oklu-çapraz tohum bahçesinde belirlenen %36.5'lik polen kirliliği sonucunda genetik kazancın %18.25

azalacağı bildirilmiştir. Kaya vd (2006) tarafından *P. brutia* tohum bahçesinde belirlenen yüksek derecede polen kirliliği sonucu genetik kazancın yaklaşık %43 kadar azalacağı belirtilmiştir. Tohum bahçelerindeki polen kirliliği oranını azaltmak ve dolayısı ile genetik kazancı arttırmak için polen yönetim tekniklerinin (çiçeklenmenin teşviki, kontrollü tozlaşma, destekleyici kitle polenlemesi vb.) uygulanmasına önem verilmeli ve tohum bahçesinde polen üretimini arttırmak için daha fazla sayıda ramete sahip klonlarla tohum bahçeleri kurulmalıdır.

Tohum bahçelerinde kendi-kendine dölleme (selfing) sonucu oluşan tohumların oranının belirlenmesi önemlidir. Çünkü aynı klona ait ağaçların kendi-kendine döllemeleri sonucu oluşan tohumlarında tohum içeriğinde eksiklikler, embriyo gelişiminde bozukluklar ve sonuç olarak boş tohum oluşması veya oğul döllerin yaşama kabiliyetinin düşük olması gözlemlenir (Erickson ve Adams 1990, Adams vd 1992, Stoehr ve Newton 2002, Kaya 2005). Bu tez çalışmasında tohum bahçesinde yer alan 30 klonun 15'inde kendi-kendine dölleme (selfing) gözlenmemiştir. Tohum bahçesinde yer alan 9268, 9276 ve 9284 no'lu klonlara ait birer embriyonun genotipinin anne ağaç ile aynı olduğu belirlenmiştir. Bu embriyoların kendi-kendine dölleme ile oluşma ihtimali, dışarıdan herhangi bir polen akışı olmadığı varsayıldığında, %10 olarak, tahmin edilen %39'luk polen kontaminasyonu göz önünde bulundurulduğunda ise, %3.9 olarak belirlendi. Her bir klona ait rametlerin tohum bahçesi yerleşim planında sistematik bir şekilde dağıtılmış olması kendi-kendine dölleme (selfing) olasılığını azaltan bir etkidir. Stoehr ve Newton (2002) tarafından *P. contorta* tohum bahçesinde altı cpSSR lokusu kullanılarak yapılan çalışmada, kendileme sonucu meydana gelen tohumların açıkça belirlenebilen sayıları göz önüne alınarak kendi-kendine dölleme (selfing) oranı %2 olarak bildirilmiştir. Kaya vd (2006) tarafından *P. brutia* tohum bahçesinde yapılan çalışmada kendi-kendine dölleme (selfing) oranı %5.3 olarak saptanmıştır. Jones vd (2008) tarafından *Eucalyptus grandis* tohum bahçesinde yapılan çalışmada kendi-kendine dölleme (selfing) oranının %0 ile %36 arasında değiştiği (ortalama %14) bildirilmiştir.

Çizelge 4.1 Değişik orman ağacı türlerine ait popülasyonlarda gerçek polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı (m) tahminleri

Tür Adı	Popülasyon alanı	İzolasyon (metre)	Belirteç (lokus sayısı)	m (%)	Yararlanılan kaynak
Doğal Popülasyon					
<i>Quercus macrocarpa</i>	5 ha	>100	SSR (4)	62	Dow ve Ashley 1998
<i>Q. robur, Q. petraea</i>	5.8 ha	-	SSR (6)	65-69	Streiff vd 1999
<i>Pinus attenuata</i>	0.04 ha	>11	İzoenzim (11)	56	Burczyk vd 1996
<i>Pinus densiflora</i>	-	>100	SSR (3)	31	Lian vd 2001
<i>Pinus flexilis</i>	15 ha	>2000	İzoenzim (10)	6.5	Schuster ve Mitton 2000
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	2.4 ha	-	İzoenzim (13)	20-27	Adams 1992
Tohum Bahçesi					
<i>Quercus robur</i>	4.5 ha	>400	SSR (6)	70	Buiteveld vd 2001
<i>Picea abies</i>	13.2 ha	-	İzoenzim (11)	70	Pakkanen vd 2000
<i>Pinus brutia</i>	11.2 ha	>100	İzoenzim (14)	85.7	Kaya vd 2006
<i>Pinus brutia</i>	17.8 ha	>170	SSR (6)	39.3	Bu çalışma
<i>Pinus contorta</i>	4.4 ha	>200	SSR (6)	5.5	Stoehr ve Newton 2002
<i>Pinus koraiensis</i>	1 ha	-	SSR (13)	25	Feng vd 2010
<i>Pinus pinaster</i>	11.8 ha	-	SSR (6)	36	Plomion vd 2001
<i>Pinus pinaster</i>	4 ha	<2000	SSR (3)	52.4	Fernandes vd 2008
<i>Pinus sylvestris</i>	12.5 ha	-	İzoenzim (21)	24-40	Yazdani ve Lindgren 1991
<i>Pinus sylvestris</i>	12.5 ha ve 16 ha	-	İzoenzim (21)	36 ve 21	El-Kassaby vd 1989
<i>Pinus sylvestris</i>	13.7 ha	>500	SSR (9)	52	Torimaru vd 2009
<i>Pinus taeda</i>	2 ha	>122	İzoenzim (7)	36	Friedman ve Adams 1985
<i>Pinus thunbergii</i>	0.5 ha	>500	RAPD (28)	2.4	Goto vd 2002
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	2 ha	-	İzoenzim (11)	49	Adams vd 1997
Plantasyon					
<i>Picea abies</i>	1 ha	>4000	İzoenzim (6)	16	Xie ve Knowles 1994
<i>Picea abies</i>	0.89 ha	-	İzoenzim (8)	83	Burczyk vd 2004b

5. SONUÇ

Bu çalışmada, Çıglık-Antalya mevkiindeki 16 yaşında bir kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) klonal tohum bahçesinde polen kirliliği oranı, kloroplast belirteçleri (cpSSR) yardımıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan altı cpSSR primerinden, Pt41093 primeri monomorfik, diğer primerler ise polimorfik olarak saptandı. Analiz edilen bireylerde altı lokus için toplam 23 allel belirlendi. Her bir bireyde çalışılan altı primer için elde edilen farklı büyüklükteki allellerin kombinasyonu haplotip olarak değerlendirildi. Buna göre, çalışılan tüm örneklerde toplam 36 farklı haplotip gözlemlendi. Teorik olarak tohum bahçesindeki klon sayısı kadar haplotip kimlik saptanması beklenmektedir. İncelenen altı cpSSR lokusu birlikte ele alınınca tohum bahçesinde bulunan 30 klonda toplam 12 çeşit haplotip gözlemlendi. Çalışmada belirlenen haplotiplerden dokuz tanesinin kızılçam tohum bahçesinde ve tohum bahçesi yakınında yer alan doğal populasyondaki bireylerde ortak olarak bulunduğu saptandı. Bu sonuç çalışılan tohum bahçesi ile yakınında yer alan doğal populasyonun gen havuzlarının kısmen benzer olduğunu göstermektedir.

Tohum bahçesindeki 30 klonun genetik kimlikleri incelendiğinde her birinin genotiplerinin birbirinden farklı olmadığı, bazı klonların incelenen lokuslar bakımından aynı genetik kimliğe sahip olduğu belirlendi. Tohum bahçesinden rastlantısal olarak seçilen beş klonun (9282, 9289, 9290, 9294 ve 9295) her birinden örneklenen beş ramet üzerinde yapılan analizlerde bu beş klonun rametlerinin çalışılan cpSSR lokusları bakımından genotiplerinin birbiri ile eşleşmediği gözlemlenmiştir. Bu bilgi ışığında, tohum bahçesindeki tüm rametlerin genotipik kimliklerinin belirlenmesini, yanlış etiketlenmiş olanların ait oldukları klona dahil edilmesini veya hiçbir klona dahil edilemiyorsa tohum bahçesinden elimine edilmesini, gerekiyorsa tohum bahçesindeki bütün rametlerin yeniden doğru klon numarası ile etiketlenmesini sağlayacak çalışmalar planlanmalıdır. Aksi takdirde gelecekte yapılacak döl denemeleri, çiçeklenme, çeşitli faktörlere karşı dirençli klonların belirlenmesi gibi çalışmalarda hem elde edilen bulguların doğruluk derecesi hem de araştırmacılar açısından bir takım sorunlar ortaya çıkacaktır. Ayrıca, tohum bahçelerindeki klonlara ait rametlerin, kuruluş aşamasında veya öncesinde, yanlış etiketlenmesi polen kirliliği çalışmalarında tahmin edilecek parametrelerin doğruluğunu olumsuz yönde etkilemektedir.

Tohum bahçesindeki klonlara ve doğal popülasyona ait bireyler çalışılan lokusların allel frekansları bakımından birbirinden istatistiki olarak farklı bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu iki popülasyon arasındaki farklılığın asıl kaynağı özellikle Pt1254, Pt87268 ve Pt71936 lokuslarıdır. Genetik çeşitliliğin göstergesi olan Nei'nin (1987) tarafsız haplotip çeşitlilik katsayısı (H_e) doğal popülasyonda ve embriyolarda, tohum bahçesi klonlarından daha yüksek çıkmıştır. Yüksek haplotipik çeşitlilik düzeyi, kızılçamın diğer çam türleri gibi yüksek genetik çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonucuna göre tohum bahçesi, embriyolar ve doğal popülasyonun genetik çeşitliliklerinin büyük oranda (%98) popülasyon içerisinde olduğu, popülasyonlar arası çeşitliliğin düşük olduğu (%2) gözlemlendi. Basamaklı mutasyon modeline göre haplotipler arasındaki ortalama genetik uzaklık katsayısı (D_{sh}^2) 3.83 olarak bulundu.

Bu çalışmada yapılan istatistiki analizler sonucunda çalışılan toplam 300 embriyodan 87'sinin kontaminant polen ile döllenme sonucu oluşan gametler olduğu belirlendi. Yani, tohum bahçesindeki klonlar tarafından üretilen tohumların %29'unun, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilmeyen polenlerle döllenme sonucu oluştuğu belirlendi. Tohum bahçesinde tahmin edilen gerçek polen kontaminasyonu (m) ise 0.393 (%39.3) olarak saptandı. İstenmeyen genetik özellikler taşıyan popülasyonların gen havuzundan gelen yabancı polenler yüksek oranda polen kirliliğine ve dolayısıyla bahçeden beklenen genetik kazancın azalmasına neden olmaktadır. Polen kirliliğinin bu düzeyde olması sonucunda tohum bahçesi tohumlarından beklenen genetik kazançta %20 oranında bir azalma olacağı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 38 no'lu kızılçam tohum bahçesinin, kızılçamın doğal popülasyonlarından arzu edilen düzeyde izole edilemediği söylenebilir. Çalışmamız sonucu bulunan polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı tohum bahçesinden elde edilecek tohumların genetik kalitesini olumsuz etkileyebilecek düzeydedir. Bu nedenle, bu ve benzeri tohum bahçelerinde, tohum bahçesine doğru yabancı polenlerin aşırı göçünü önlemek ve dolayısı ile genetik kazancı arttırmak için bazı önlemlerin alınması gereklidir.

Bu tür sorunları azaltmak veya sorunların üstesinden gelmek için tohum bahçesi kurulurken veya var olan tohum bahçelerinde alınması gereken önlemleri şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Polen kirliliğinin (kontaminasyonunun) mümkün olduğu kadar az olabileceği ya da hiç olmayacağı, aynı zamanda türün yetiştirme ve sağlıklı gamet oluşturma koşullarına uygun bölgelerin tohum bahçesi kurulması için belirlenmesi. Tohum bahçesinin 1000 m uzağına kadar aynı ağaç türü veya yakın akraba tür bulunmaması gerektiği belirtilmektedir (Yahyaoğlu ve Atasoy 1983).
- 2) İstenmeyen polen kaynaklarından fiziksel izolasyon zonunun genişletilmesi. Bir çok *Pinus* türü için halen uygulanan standart 120-150 m'lik izolasyon zonunun polen kontaminasyonunu azaltmak için etkili olmadığı görülmüştür (Squillace 1967, Squillace ve Long 1981).
- 3) Tohum bahçesinin merkezi alanının genişletilmesi. Tohum bahçesinde polen üretimini arttırmak için daha fazla sayıda ramete sahip klonlarla daha geniş alanlarda tohum bahçeleri kurulmalıdır.
- 4) Tohum bahçesindeki klonlara ait rametler ile tohum bahçesine yakın doğal populasyonlardaki bireyler arasında fenolojik olaylar bakımından zamansal izolasyon sağlanması. Örneğin tohum bahçesindeki klonlara ait dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresi ve tohum bahçesindeki dışındaki doğal populasyonlardaki erkek çiçeklerin maksimum polen yayma dönemi çakışma var ise, tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin polen kabul dönemine geçiş süresinin geciktirilmesi ve gerekirse destekleyici kitle polenlemesi uygulanması. Ayrıca tohum bahçesindeki klonlar da dişi ve erkek çiçek üretiminde zamansal uyumun sağlanması, panmiksiz olasılığını artırarak polen kirliliğinin azalması ve dolayısıyla genetik kazancın artmasında etkilidir.
- 5) Destekleyici kitle polenlemesi (Supplemental Mass Pollination) tekniğinin kullanılması. Bu teknikle önceki yıllara veya erken polen yayan klonlara ait

polenlerin yöntemine uygun bir şekilde toplanıp saklanması ve bu polenlerin dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresinde tekrar tohum bahçesine yayılması sağlanır. Bu teknik sayesinde polen üretimi sınırlı olan genç tohum bahçelerinde tohum üretimi artar, genetik kalitesi yüksek polenlerle tozlaşmanın sağlandığı bahçeden üretilen tohumların genetik kalitesi artar ve ayrıca polen kirliliği oranı azalır. Bu tekniğin polen kontaminasyonu düzeyini azaltmada etkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (El-Kassaby ve Ritland 1986, El-Kassaby vd 1989, Eriksson vd 1995, Stoehr vd 2006). Caron ve Leblanc (1992) tarafından *Picea mariana* tohum bahçesinde polen tuzakları kullanılarak yapılan çalışmada ard arda 3 yıl polen kirliliği oranı %32 ile %83 arasında bulunmuş ve polen kontaminasyonu seviyesini azaltmak, panmiksiz ve tohum verimini arttırmak ve dolayısıyla genetik kazancı arttırmak için destekleyici kitle polenlemesi tekniğinin kullanılabileceği önerilmiştir.

- 6) Tohum bahçesindeki polen üretimini arttıracak, dolayısıyla tohum bahçelerindeki polen kirliliği oranını azaltacak ve genetik kazancı arttıracak tekniklerin uygulanması. Tohum bahçelerindeki klonların bol miktarda polen üretimini teşvik etmek için gibberellinler veya gibberellin türevi sentetik maddeler kullanılması, gübreleme, halkalama (boğma), veya diğer teknikler kullanılarak çiçeklenmenin uyarılması sağlanır. Tohum bahçesinde bol miktarda polen üretilmesi sonucunda dışarıdan gelen polenlerin oranının daha az olması ve polen kirliliğinin azalması sağlanır. Zamanında uygulanan bu teknikler sonucunda, yaprakları oluşturacak tomurcukların çiçek veren tomurcuğa dönüşmesi teşvik edilmektedir. Eğer tohum bahçesi içinde çiçeklenme oranı artarsa tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin yine tohum bahçesi içinde üretilen polenlerle döllenme olasılığı da artacaktır (Lowe ve Wheeler 1993). Gün (2010) tarafından bu tez çalışmasının yürütüldüğü aynı tohum bahçesinde yapılan çalışmada farklı zamanlarda ve konsantrasyonlarda Gibberellin A_{4/7/9} karışımı uygulamasının dişi ve erkek çiçek üretiminde artışa neden olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca *Pinus strobus* (Pijut 2002) ve *Pseudotsuga menziesii* (Cherry vd 2007) gibi konifer türlerinde yapılan diğer çalışmalarda GA_{4/7}

uygulamasının hem erkek hem de dişi çiçeklenmede artışa neden olduğu belirtilmiştir.

- 7) Tohum bahçesinin bulunduğu çevrenin yeniden düzenlenmesi. Tohum bahçesinin etrafında doğal populasyona ait ağaçlar var ise uzaklaştırılması veya yöreye en iyi uyum yapabilen ve hızlı gelişen farklı türler ile (*Pinus pinea*, *Eucalyptus sp.*, *Cupressus sp.* gibi) tohum bahçesi çevresi ağaçlandırılması diğer önemli bir yaklaşımdır.
- 8) Kontrollü tozlaşma yönteminin uygulanması. Genellikle belirli genotipler arasında çaprazlama yapmak için kullanılan bir tekniktir. Fakat polen kirliliğinin önlenmesi amacıyla da sık olarak kullanılmaktadır. Kontrollü tozlaşma tekniği polenin dişi çiçeğe suni olarak verilmesi ve dolayısıyla ana ve baba ebeveynin her ikisinin de belli olmasını sağlayan bir tekniktir (Ürgenç 1982).
- 9) Polen kirliliği sonucu genetik kazançtaki azalmayı hafifletmek için en son çare olarak başvurulabilecek alternatif bir yaklaşım da tohum bahçesinin, klonların seçildiği ana populasyonun genetik kalitesinden daha zayıf olmayan ve benzer uyum değeri olan populasyonların olduğu bir yere kurulması.

Yukarıda bahsedilen polen kirliliğini azaltmaya veya ortadan kaldırmaya yardımcı önerilerden bir kaçı, bu çalışmaya konu olan 38 no'lu *P. brutia* tohum bahçesinde uygulanabilir niteliktedir. Bu öneriler uygulanabilirlik bakımından en ekonomik olanından başlayarak şöyle sıralanabilir:

- 1) Tohum bahçesinin bulunduğu çevrenin yeniden düzenlenmesi. Tohum bahçesinin etrafında doğal kızılçam populasyonuna ait tek tek yer alan ağaçlar bulunmaktadır. Doğal populasyona ait bu ağaçlar tedrici olarak uzaklaştırılıp, o alan ve tohum bahçesinin etrafı öncelikle o yöreye en iyi uyum yapabilen ve hızlı gelişen farklı bir tür ile (örneğin *Pinus pinea*, *Eucalyptus sp.*, *Cupressus sp.* ve bunun gibi türler) ağaçlandırılabilir. Eğer yöreye iyi uyum yapan başka bir tür bulunamazsa o zaman bu alan tohum bahçesinden elde edilen tohumlarla

ağaçlandırılabilir. Böylece yeni dikilen ağaçlar tohum bahçesi ile benzer gen havuzundan olduğu için, genetik olarak arzu edilmeyen polen kaynakları büyük oranda elimine edilmiş olacaktır.

- 2) Tohum bahçesine Destekleyici Kitle Polenlemesi (Supplemental Mass Pollination) uygulanması. Tohum bahçesine ait polenler, önceki yıllardan veya erken polen yayan klonlardan yöntemine uygun bir şekilde toplanıp saklanması ve bu polenlerin dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresinde tekrar tohum bahçesine yayılması sağlanabilir.
- 3) Tohum bahçesine polen üretimini arttıracak tekniklerin uygulanması. Ayrıca, tohum bahçesindeki erkek ve dişi çiçeklerin sayısını arttıracak tekniklerin kullanılması yerinde olacaktır. Çünkü tohum bahçesindeki erkek ve dişi çiçeklerin sayısının artması her zaman arzu edilen bir durumdur. Böylece dişi çiçeklerin sayısındaki artmaya paralel olarak tohum bahçesinden elde edilecek tohum miktarı artacak, erkek çiçeklerin sayısının (dolayısı ile polenlerin) artmasıyla tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin yine tohum bahçesinde üretilen polenlerle döllenme olasılığı artacaktır.
- 4) Tohum bahçesindeki bireyler ile tohum bahçesine yakın doğal populasyonlardaki bireyler arasında fenolojik olaylar bakımından zamansal izolasyon sağlanması.
- 5) Tohum bahçesinde, mümkün olduğu ölçüde çok sayıda bireyler üzerinde kontrollü tozlaşma yapılması.

Yukarıdaki birinci öneri gerçekleşir ise, diğer önerileri uygulamaya büyük oranda gerek kalmayabilir. Çünkü dışarıdan gelen, görünürdeki yabancı polen kaynağı ortadan kalkmış olacaktır. Bununla birlikte adı geçen doğal populasyona ait bireyler ortadan kalktıktan sonra, tohum bahçesine gelen yabancı kaynaklı polenlerin ne kadar azaldığını anlamak için ayrı bir araştırma konusu önerilebilir.

Antalya’da bu çalışmaya konu olan tohum bahçesinden başka, kızılçam türüne ait 11 tohum bahçesi daha bulunmaktadır. Daha önce Kaya vd (2006) tarafından 27 no’lu Asar kızılçam tohum bahçesinde polen kirliliği (kontaminasyonu) oranı belirlenmiştir. Antalya bulunan diğer 10 tohum bahçesinin her birinde de polen kirliliği oranının belirlenmesi ve tolerans sınırları üstünde yabancı polen karışımı gözlenmesi halinde buna karşı gerekli önlemlerin alınması tohum bahçelerinin işlevi açısından önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

- ADAMS, W.T. 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New Forest*, 6:217-240.
- ADAMS, W.T. 1993. Application of isozymes in tree breeding. In: S.D. Tanksley and T. J. Orton (Editors), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, Elsevier Science Publishers B. V., pp.381-400, Amsterdam.
- ADAMS, W.T. and BIRKES, D.S. 1989. Mating patterns in seed orchards. In: *Proceedings of 20th Southern Forest tree Improvement Conference*, June 26-30, 1989, Charleston, South Carolina.
- ADAMS, W.T. and BIRKES, D.S. 1991. Estimating mating patterns in Forest tree populations. In: Fineschi, S., Malvolti, M.E., Cannata, F. and Hattemer, H.H. (Editors), *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees*. pp.157-172, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- ADAMS, W.T. and BURCZYK, J. 1993. GENFLOW: A computer program for estimating levels of pollen contamination in clonal seed orchards. Release 1. Dept. of Forest Science, Oregon State Univ., Corvallis, OR, USA.
- ADAMS, W.T., BIRKES, D.S. and ERICKSON, V.J. 1992. Using genetic markers to measure gene flow and pollen dispersal in forest tree seed orchards. In: R. Wyatt (Editor), *Ecology and Evolution of Plant Reproduction*. Chapman and Hall, pp. 37-61, New York.
- ADAMS, W.T., HIPKINS, V.D., BURCZYK, J. and RANDALL, W.K. 1997. Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research*, 27:131-134.
- AFZAL-RAFII, Z. and DODD, R.S. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular Ecology*, 16:723-736.
- 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. *Evolutionary Applications*, 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.
- ALAN, M., OZTURK, H. and SIKLAR, S. 2007. Seed Orchard Planning and Management in Turkey. In: *Seed orchards, Proceedings from a conference at Umea, Sweden*, Editor: Dag Lindgren, September 26-28.

- ALEMDAĞ, Ş. 1962. Türkiye’deki kızılçam ormanlarının gelişimi, hasılatı ve amenajman esasları. Orm. Arş. Enst. Teknik Bülten Serisi, 11, 198 ss., Ankara.
- ALTUN, Z.G. 2006. DNA işaretleyiciler (Markör) ve Türkiye’de orman ağaçları ıslahında kullanımı. Ege Ormancılık Araştırma Müd. Dergisi, 295:20-36, 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.
- ANONİM. 1992. Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (Convention on Biological Diversity). URL:<http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>
- ANONİM. 2001a. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı (2001-2005) Ormancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı, Yayın No: DPT-2531-ÖİK:547, Ankara 539 ss.
- ANONİM. 2001b. Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü 2000 yılı Çalışma Raporu ve 2001 yılı Çalışma programı. T.C. Orman Bakanlığı, Ankara. 149 ss.
- ANONİM. 2006. Orman Varlığımız. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ağaçlandırma Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara, Türkiye. 160 ss.
- ANONİM. 2007. Dokuzuncu Beş Yıllık Kalkınma Planı (2007-2013). Ormancılık. Özel İhtisas Komisyonu Raporu. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı, Yayın No: DPT-2712-ÖİK:665, Ankara 112 ss.
- ANONİM. 2009. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Ormancılık İstatistikleri. URL:<http://www.ogm.gov.tr>
- 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, optimization 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>.
- ARAVANOPOULOS, F.A., PANETSOS, P.K. and SKALTSOYIANNES, A. 2004. Genetic structure of *Pinus brutia* stands exposed to wild fires. *Plant Ecology*, 171:175-183.
- AUSTERLITZ, F., DICK, C.W., DUTECH, C., KLEIN, E.K., ODDOU-MURATORIO, S., SMOUSE, P.E. and SORK, V.L. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Molecular Ecology*, 13:937-954.

- 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. *Molecular Ecology*, 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., ZANG, D. and LINDGREN, D. 2004. Fertility variation and status number between a base population and a seed orchard of *Pinus brutia*. *Silvae Genetica*, 53, 4-5:161-163.
- BLACK, W. C. 1997. Modified version of Biosys I by Swofford D. L. and Selander 1981. *Journal of Heredity*, 72:281-283. <http://lamar.colostate.edu/pub/wcb4>.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, K. and DAVIS, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
- BOYDAK, M. 2004. Silvicultural characteristics and natural regeneration of *Pinus brutia* Ten. a review. *Plant Ecology*, 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. Stere (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. *Molecular Ecology*, 7 :1633-1645.
- 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. *Molecular Ecology*, 16:2137-2153.
- BUITEVELD, J., BAKKER, E.G., BOVENSCHEN, J. and VRIES DE, S.M.G. 2001.

- Paternity analysis in a seed orchard of *Quercus robur* L. and estimation of the amount of background pollination using microsatellite markers. *Forest Genetics*, 8 (4):331-337.
- BURCZYK, J. 1996. Variance effective population size based on multilocus gamete frequencies in coniferous population: an example of a Scots pine clonal seed orchard. *Heredity*, 77:74-82.
- BURCZYK, J. 1998. Mating system variation in Scots pine clonal seed orchard. *Silvae Genetica*, 47(2-3):155-158.
- BURCZYK, J. and PRAT, D. 1997. Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity*, 79:638-647.
- BURCZYK, J., ADAMS, W.T. and SHIMIZU, J.Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuate* Lemmon.) stand. *Heredity*, 77:251-260.
- BURCZYK, J., DIFAZIO, S.P. and ADAMS, W.T. 2004a. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? *Forest Genetics*, 11(3-4):179-192.
- BURCZYK, J., LEWANDOWSKI, A. and CHALUPKA, W. 2004b. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) *Forest Ecology and Management*, 197:39-48.
- 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.
- CARON, G.E. and LEBLANC, R. 1992. Pollen contamination in a small black spruce seedling seed orchard for 3 consecutive years. *Forest Ecology and Management*, 53:245-261.
- 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. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. pp.225-237. Oxford University Press.
- CEUCA, V., COVRIG, I., PUSCAS, A. and COLISAR, A. 2008. Application of the DNA extraction protocol on *Pinus cembra* – optimized using an original protocol described by Claudia Stange *et al.* Bulletin UASVM, *Horticulture*, 65(1):132-137.
- CHERRY, M.L., ANEKONDA, T.S., ALBRECHT, M.J. and HOWE, G.T. 2007. Flower stimulation in young miniaturized seed orchards of Douglas-fir

- (*Pseudotsuga menziesii*). *Canadian Journal of Forest Research*, 37:1-10.
- 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. *Systematic Botany*, 13(3):411-424.
- CROWLEY, T.M., MURALITHARAN, M.S. and STEVENSON, T.W. 2003. Isolating Conifer DNA: A Superior Polysaccharide Elimination Method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21:97a-97d.
- CUENCA, A., ESCALANTE, A.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). *Molecular Ecology*, 12:2087-2097.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.
- DI-GIOVANNI, F. and KEVAN, P.G. 1991. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. *Canadian Journal of Forest Research*, 21:1155-1170.
- DI-GIOVANNI, F., KEVAN, P.G. and ARNOLD, J. 1996. Lower planetary boundary layer profiles of atmospheric conifer pollen above a seed orchard in northern Ontario, Canada. *Forest Ecology Management*, 83(1-2):87-97.
- DOW, B.D. and ASHLEY, M.V. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity*, 89:62-70.
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.I. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- DZIALUK, A. and BURCZYK, J. 2004. PCR-Multiplex of Six Chloroplast Microsatellites for Population studies and Genetic Typing in *Pinus sylvestris*. *Silvae Genetica*, 53:5-6.
- DZIALUK, A., MUCHEWICZ, E., BORATYNSKI, A., MONTERRAT, J.M., BORATYNSKA, K. and BURCZYK, J. 2009. Genetic variation of *Pinus uncinata* (Pinaceae) in the Pyrenees determined with cpSSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 277:197-205.
- ECHE, C.S. and MAY-MARQUARDT, P. 1997. Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome*, 40:9-17.

- ECHT, C.S., DEVERNO, L.L., ANZIDEI, M. and VENDRAMIN, G.G. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait.. *Molecular Ecology*, 7:307-316.
- ECHT, C.S., VENDRAMIN, G.G., NELSON, C.D. and MARQUARDT, P. 1999. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Canadian Journal of Forest Research*, 29:365-371.
- EISEN, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. pp. 34-48. Oxford University Press.
- EL-KASSABY, Y.A. and RITLAND, K. 1986. Low levels of pollen contamination in a Douglas-fir seed orchard as detected by allozyme markers. *Silvae Genetica*, 35(5-6):224-229.
- EL-KASSABY, Y.A., RUDIN, D. and YAZDANI, R. 1989. Levels of outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in Northern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 4:41-49.
- ENNOS, R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72:250-259.
- ERICKSON, V.J. and ADAMS, W.T. 1990. Mating system variation among individual ramets in a Douglas-fir seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research*, 20:1672-1675.
- ERIKSSON, U., JANSSON, G., YAZDANI, R. and WILHELMSSON, L. 1995. Effects of supplemental mass pollination (SMP) in a young and a mature seed orchard of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiology* 15:519-526.
- ERKAN, N. 1996. Doğal kızılçam meşcerelerinde artım ve büyümenin değerlendirilmesi. *Batı Akdeniz Orman Arş. Enst. Dergisi*, Sayı 2, ss:33-42.
- ERTEN, P. ve ÖNAL, S. 1987. Kızılçam Odununun Özellikleri, Korunması, Reçine Üretimi ve Kullanım Yerleri. *Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları*, Muhtelif Yayınlar Dizisi, no:52, Ankara, ss. 171-182.
- 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.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G. and SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics 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*). Int. Plant Genetic Resources Ins., Rome, Italy. 6 p

FADY, B., LEFEVRE, F., VENDRAMIN, G.G., AMBERT, A., REGNIER, C. and BARITEAU, M. 2008. Genetic consequences of past climate and human impact on eastern Mediterranean *Cedrus libani* forests. Implications for their conservation. *Conservation Genetics*, 9:85-95.

FAST, W., DANCİK, B. P. and BOWER, R.C. 1986. Mating system and pollen contamination in a Douglas-fir clone bank. *Canadian Journal of Forest Research*, 16:1314-1319.

FENG, F.J., SUI, X., CHEN, M.M., ZHAO, D., HAN, S.J. and LI, M.H. 2010. Mode of pollen spread in clonal seed orchard of *Pinus koraiensis*. *Journal of Biophysical Chemistry*. 1(1):33-39.

FERNANDES, L., ROCHETA, M., CORDEIRO, J., PEREIRA, S., GERBER, S., OLIVEIRA, M.M. and RIBEIRO, M.M. 2008. Genetic variation, mating patterns and gene flow in a *Pinus pinaster* Aiton clonal seed orchard. *Annals of Forest Science*, 65:706p1-10.

FRANKIS, M. 1993. Morphology and affinities of *Pinus brutia*. In: Proceedings of international Symp. on *Pinus brutia* Ten. October 18 to 23, Marmaris, Turkey. pp.11-18.

FRIEDMAN, S.T. and ADAMS, W.T. 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of lobolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor. Applied Genetics*, 69:609-615.

FUNDA, T., LSTIBUREK, M., LACHOUT, P., KLAPSTE, J. and EL-KASSABY, Y.A. 2009. Optimization of combined genetic gain and diversity for collection and deployment of seed orchard crops. *Tree Genetics & Genomes* 5:583-593.

FURNIER, G. R. and ADAMS, W. T. 1986. Mating system in natural populations of Jeffrey pine. *American Journal of Botany*, 72(4):1002-1008.

GASPAR, M.J., DE-LUCAS, A., ALIA, R., PAIVA, J.A.P., HIDALGO, E., LOUZADA, J., ALMEIDA, H. and GONZALEZ-MARTINEZ, S.C. 2009. Use of molecular markers for estimating breeding parameters: a case study in a *Pinus pinaster* Ait. progeny trial. *Tree Genetics and Genomes*, 5:609-616.

GENÇ, M. 2012. Silvikültürün temel esasları. Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Fakültesi Yayın No: 44. Isparta, 351 s.

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>.

- 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., 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. *Diversity and Distributions*, 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.
- GOTO, S., MIYAHARA, F. and IDE, Y. 2001. A Fast Method for Checking the Genetic Identity of Ramets in a Clonal Seed Orchard by RAPD Analysis with a Bulking Procedure. *Silvae Genetica*, 50:5-6.
- GOTO, S., MIYAHARA, F. and IDE, Y. 2002. Identification of the male parents of half-sib progeny from Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) clonal seed orchard using RAPD markers. *Breeding Science*, 52:71-77.
- GREENWOOD, M. S. and RUCKER, T. 1985. Estimating pollen contamination in Loblolly pine seed orchards by pollen trapping. Proc. 18th Southern Forest Tree Improv. Conf., May 21-23, 1985.
- GÜN, Ş.S. 2010. Farklı zamanlarda ve konsantrasyonlarda Gibberellin A_{4/7/9} karışımı uygulamasının kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) tohum bahçesinde çiçeklenme üzerine etkisi. Ak. Ün. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 173 ss., Antalya.
- 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. *Canadian Journal of Forest Research*, 28:1557-1565.
- 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.
- HAMRICK, J.L. and GODT, M.J. 1989. Allozyme diversity in plant species. In Brown A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L., Weir, B.S. (eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, pp. 43-63.
- 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. and KJAER, E.D. 2006. Paternity analysis with microsatellites in Danish *Abies nordmanniana* clonal seed orchard reveals dysfunctions. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(4):1054-1058.
- 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 Genetics and Genomes*, 1:116-123.
- HARJU, A. and MUONA, O. 1989. Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 4:513-520.
- HARJU, A.M. and NIKKANEN, T. 1996. Reproductive success of orchard and nonorchard pollens during different stages of pollen shedding in a Scots pine seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research*, 26(6):1096-1102.
- HELGASON, T. and ENNOS, R.A. 1991. The outcrossing rate and gene frequencies of a native Scots pinewood population, determined using isozyme markers. *Scottish-Forestry*, 45(2):111-119.
- HEUERTZ, M., TEUFEL, J., GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., SOTO, A., FADY, B., ALIA, R. and VENDRAMIN, G.G. 2010. Geography determines genetic relationships between species of mountain pine (*Pinus mugo* complex) in western Europe. *Journal of Biogeography*, 37:541-556.
- HEYWOOD, V.H. and IRIONDO, J.M. 2003. Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113:321-335.
- HÖHN, 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, Ankara, 131p.
- 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. *Forest Ecology and Management*, 225:328-336.
- 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.
- ISIK, F., KESKIN, S. and MCKEAND, S.E. 2000. Provenance variation and provenance-site interaction in *Pinus brutia* TEN.: Consequences of defining

- breeding zones. *Silvae Genetica*, 49:213-223.
- ISIK, K. 1986. Altitudinal variation in *Pinus brutia* Ten.: Seed and seedling characteristics. *Silvae Genetica*, 35:58-65.
- IŞIK, K. 1991. Amerika Birleşik Devletlerinin Güneydoğu eyaletlerinde orman ağacı ıslahı konusundaki uygulamalar ve gelişmeler. *Orm. Müh. Der.*, 2:8-14, Ankara.
- 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 Genetica*, 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 Genetica*, 46:113-120.
- IŞIK, K., TOPAK, M. ve 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.
- JONES, M.E., SHEPHERD, M., HENRY, R. and DELVES, A. 2008. Pollen flow in *Eucalyptus grandis* determined by paternity analysis using microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes*, 4:37-47.
- 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 Genetica*, 53(4):169-175.
- KANG, K.S., LINDGREN, D. and MULLIN, T.J. 2001a. Prediction of genetic gain and gene diversity in seed orchard crops under alternative management strategies. *Theoretical and Applied Genetics*, 103:1099-1107.
- KANG, K.S., HARJU, A.M., LINDGREN, D., NIKKANEN, T., ALMQVIST, C. and SUH, G.U. 2001b. Variation in effective number of clones in seed orchards. *New Forests*, 21:17-33.
- KANG, K.S., LINDGREN, D. and MULLIN, T.J. 2004. Fertility Variation, Genetic Relatedness, and Their Impacts on Gene Diversity of Seeds from a Seed Orchard of *Pinus thunbergii*. *Silvae Genetica*, 53:(5-6):202-206.

- KARA, N. 1996. Kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) doğal populasyonlarında izoenzim çeşitliliğinin araştırılması. Ak. Ün. Fen Bil. Ens. Y. Lisans Tezi, 77 ss., Antalya.
- KARA, N., KOROL, L., ISIK, K. and SCHILLER, G. 1997. Genetic diversity in *Pinus brutia* Ten. : Altitudinal variation. *Silvae Genetica*, 46(2-3):155-161.
- KASAPLIGIL, B. 1978. Past and present pines of Turkey. *Phytologia*, 40:99-199.
- KAYA, N. 2001. Kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) Çameli-Göldağı orijinli Asar-Antalya Klonal tohum bahçesinde eşleşme sisteminin ve genetik kontaminasyonun saptanması. Ak. Ün. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 81 ss., Antalya.
- KAYA, N. 2005. Orman ağaçlarında eşleşme şekilleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi, 2:125-137.
- KAYA, N. and ISIK, K. 2010. Genetic identification of clones and the genetic structure of seed crops in a *Pinus brutia* seed orchard. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34:127-134.
- KAYA, N., ISIK, K. and ADAMS, W.T. 2006. Mating System and Pollen Contamination in a *Pinus brutia* Seed Orchard. *New Forests*, 31(3):409-416.
- 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. *Turkish Journal Botany*, 32:1-10.
- KESKİN, S. 1999. Çameli-Göldağı Orijinli Kızılçam Tohum Bahçesinde Çiçek ve Kozalak Verimi Açısından Klonal Farklılıklar ve Çiçeklenme Fenolojisi. Orman Bak., Batı Akdeniz Ormancılık Arş. Müd. Yayınları, No:091, ss 96.
- 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 Genetica*, 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.
- KRUGMANN, S.L., STEIN, W.I., SCHIMITT, D.M. 1974. Seed Biology. In: Seeds of woody plants in the United States. C.S. Schopmeyer (Ed.), Agriculture Handbook No. 450, Forest Service, H.S. Dep. of Agriculture, pp: 5-40. Washington D.C.
- KURT, Y. 2011. Antalya-Düzlerçamı ortak bahçe deneme alanındaki altı farklı kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) populasyonunda cpSSR belirteçleri ile genetik çeşitliliğin belirlenmesi. Ak. Ün. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 115 ss., Antalya.

- KURT, Y., BILGEN, B.B, KAYA, N. and ISIK, K. 2011. Genetic comparison of *Pinus brutia* Ten. populations from different elevations by RAPD markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2):299-304.
- LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A. and NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11:2453-2465.
- LIAN, C.L., MIWA, M. and HOGETSU, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity*, 87:88-98.
- 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 Fennica*, 41(2):211-220.
- LOWE, W.J. and WHEELER, N.C. 1993. Pollen contamination in seed orchards. In: D.L. Bramlett, G.R. Askew, T.D. Blush, F.E. Bridgwater and J.B. Jett (eds). *Advances in Pollen Management*. pp.49-54. USDA Agric. Handb. 698. Washington, DC.
- MEDAIL, F. and DIADEMA, K. 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, 36:1333-1345.
- 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.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- MYERS, E.R., CHUNG, M.Y. and CHUNG, M.G. 2007. Genetic diversity and spatial genetic structure of *Pinus strobus* (Pinaceae) across an island landscape inferred from allozyme and cpDNA markers. *Plant Systematics and Evolution*, 264:15-30.
- NAHAL, I. 1983. Le Pin Brutia (*Pinus brutia* Ten. subsp. *brutia*). *Forêt Mediteranneenne*, 5:165-172.
- NAVASCUES, M. and EMERSON, B.C. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology*, 14:1333-1341.
- NAVASCUES, M., VAXEVANIDOU, Z, GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., CLIMENT, J., GIL, L. and EMERSON, B.C. 2006. Chloroplast microsatellites reveal

- colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology*, 15:2691-2698.
- 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 Genetica*, 57(6):357-363.
- NAYDENOV, K.D., TREMBLAY, F.M., BERGERON, Y., ALEXANDROV, A. and FENTON, N. 2005a. Dissimilar patterns of *Pinus heldreichii* Christ. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33:133-148.
- NAYDENOV, K.D., TREMBLAY, F.M., ALEXANDROV, A. and FENTON, N.J. 2005b. Structure of *Pinus sylvestris* L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33:1226-1245.
- NAYDENOV, K.D., TREMBLAY, F.M., FENTON, N.J. and ALEXANDROV, A. 2006. Structure of *Pinus nigra* Arn. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34:562-574.
- NEALE, D. B. and ADAMS, W. T. 1985. The mating system in natural and shelterwood stands of Douglas-fir. *Theoretical and Applied Genetics*, 71:201-207.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *P. Natl. Acad. Sci.*, Vol:70, No:12, Part I, pp: 3321-3323.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. 512 p. Columbia University Press, New York.
- NEVO, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theoretical Population Biology*, 13:129-177.
- OATIAM. 2010. Orm. Ağ. ve Toh. Isl. Arş. Müd. URL: <http://www.ortohum.gov.tr/>
- OHSAWA, T. and IDE, Y. 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, 17:152-163.
- OLIVEIRA, E.J., PADUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCOVSKY, R. and CARNEIRO-VIERIA, M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2):294-307.
- OMI, S. K. and ADAMS, W. T. 1985. Variation in seed set and proportions of outcrossed progeny with clones, crown position, and top pruning in a Douglas-fir seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research*, 16:502-507.

- OSTROWSKA, E., MURALITHARAN, M., CHANDLER, S., VOLKER, P., HETHERINGTON, S. and DUNSHEA, F. 1998. Optimizing conditions for DNA isolation from *Pinus radiata*. Technical Rev. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34:108-111.
- 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, Ankara. 163p.
- 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.
- PAKKANEN, A. and PULKKINEN, P. 1991. Pollen production and background pollination levels in Scots pine seed orchards of northern Finnish origin. In: Proceedings of the Meeting of the Nordic Group for Tree Breeding 1991. Edited by D. Lindgren. Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Genetics and Plant Physiology Umeå rep.10, pp: 14-21.
- PAKKANEN, A., NIKKANEN, T. and PULKKINEN, P. 2000. Annual Variation in Pollen Contamination and Outcrossing in a *Picea abies* Seed Orchard. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 15:399-404.
- PALOMERA-AVALOS, V., CASTRO-FELIX, P. and VILLALOBOS-ARAMBULA, A.R. 2008. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African Journal of Biotechnology*, 7(1):51-54.
- PANETSOS, C.P. 1981. Monograph of *Pinus halepensis* Mill. and *P. brutia* Ten. *Annales Forestales* (Zagreb) 9:39-77.
- PANETSOS, K.P., ARAVANOPOULOS, F. A. and SCALTSOYIANNES, A. 1998. Genetic variation of *Pinus brutia* from islands of the northeastern Aegean sea. *Silvae Genetica*, 47:115-120.
- PARDUCCI, L., SZMIDT, A.E., MADAGHIELE, A., ANZIDEI, M. and VENDRAMIN, G.G. 2001. Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 102:733-740.
- PAULE, L. 1991. Clone identity and contamination in a Scots pine seed orchard. In: Proceedings of the Meeting of the Nordic Group for Tree Breeding 1991. Edited by D. Lindgren. Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Genetics

and Plant Physiology Umeå rep.10, pp:22-32.

- PAULE, L., LIDNGREN, D. and YAZDANI, R. 1993. Allozyme frequencies, outcrossing rate and pollen contamination in *Picea abies* seed orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 8:8-17.
- PEAKALL, R. and SMOUSE, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- PETIT, R.J., MOUSADIK, A. and PONS, O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12:844-855.
- PETIT, R.J., DEGUILLOUX, M.F., CHAT, J., GRIVET, D., GARNIER-GERE, P. and VENDRAMIN, G.G. 2005. Standardisation for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 14:885-890.
- PIJUT, P.M. 2002. Eastern white pine flowering in response to spray application of Gibberellin A_{4/7} or procone. *Northern Journal of Applied Forestry*, 19:68-72.
- PLOMION, C., LEPROVOST, G., POT, D., VENDRAMIN, G., GERBER, S., DECROOCQ, S., BRACH, J., RAFFIN, A. and PASTUSZKA, P. 2001. Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Canadian Journal of Forest Research*, 31:1816-1825.
- PRESCHER, F., LINDGREN, D. and KARLSSON, B. 2008. Genetic thinning of clonal seed orchards using linear deployment may improve both gain and diversity. *Forest Ecology and Management*, 254:188-192.
- PROVAN, J., POWELL, W. and HOLLINGSWORTH, P. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(3):142-148.
- RIBERIO, M.M., PLOMION, C., PETIT, R., VENDRAMIN, G. G. and SZMIDT, A. E. 2001. Variation in chloroplast simple-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics*, 102:97-103.
- RIBERIO, M.M., MARIETTE, S., VENDRAMIN, G. G., SZMIDT, A. E., PLOMION, C., and KREMER, A. 2002. Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology*, 11:869-877.
- 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>.

- 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. *Journal of Biogeography*, 32:595-605.
- 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. *European Journal of Forest Research*, 128:377-386.
- SCHUSTER, W.S.F and MITTON, J.B. 2000. Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Heredity*, 84:348-361.
- 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 Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.
URL:<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>.
- 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.
- SEMAGN, K., BJORNSTAD, A. and NDJIONDJOP, M.N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25):2540-2568.
- SEMERIKOVA, S.A. and SEMERIKOV, V.L. 2007. The diversity of chloroplast microsatellite loci in Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.) and two Far East fir species *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. and *A. sachalinensis* Fr. Schmidt. *Russian Journal of Genetics*, 43:1373-1381.
- SHARMA, C.M. and KHANDURI, V.P. 2007. Pollen-mediated gene flow in Himalayan long needle pine (*Pinus roxburghii* Sargent). *Aerobiologia*, 23:153-158.
- SHAW, D. V., KAHLER, A. L. and ALLARD, R. W. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78(2):1298-1302.
- 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.

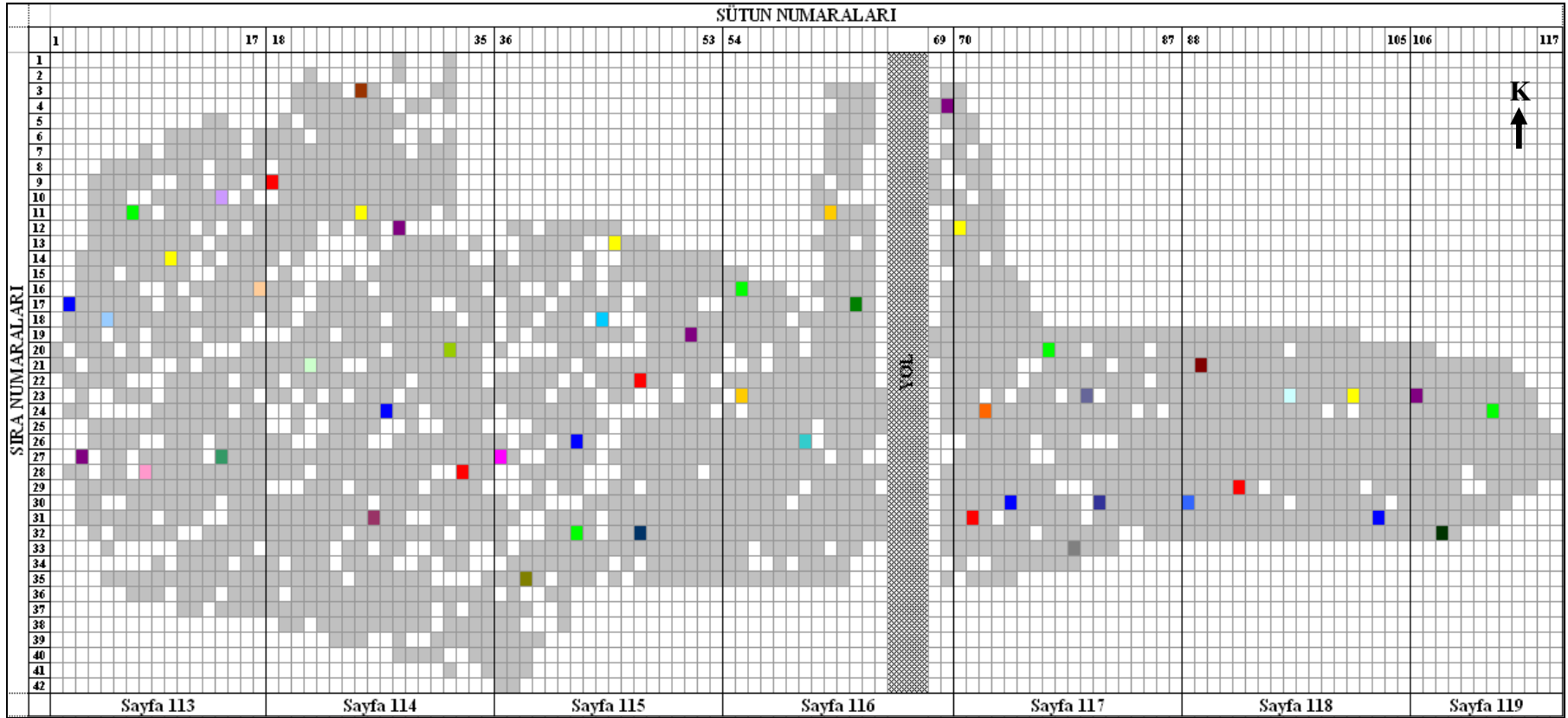
- SLAVOV, G. T. 2004. Development and Application of SSR Markers for Measuring Gene Flow in Douglas-fir. PhD Dissertation. Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.
- SLAVOV, G.T., HOWE, G.T., YAKOVLEV, I., EDWARDS, K.J., KRUTOVSKII, K.V., TUSKAN, G.A., CARLSON, J.E., STRAUSS, S.H. and ADAMS, W.T. 2004. Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:873-880.
- SLAVOV, G.T., HOWE, G.T. and ADAMS, W.T. 2005a. Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Canadian Journal of Forest Research*, 35(7):1592-1603.
- SLAVOV, G.T., HOWE, G.T., GYAOUROVA, A.V., BIRKES, D.S. and ADAMS, W.T. 2005b. Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Molecular Ecology*, 14:3109-3121.
- SMITH, D.B. and ADAMS, W.T. 1983. Measuring pollen contamination in clonal seed orchards with the aid of genetic markers. In: Proceedings, 17th Southern Forest Tree Improvement Conference; 1983 June 6-9; Athens, GA:69-77.
- SNIEZKO, R.A. 1981. Genetic and economic consequences of pollen contamination in seed orchards. In: Proceedings, 16th Southern Forest Tree Improvement Conference; 1981 May 27-28: Blacksburg, VA. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute: 225-233.
- SOTO, A., ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., SMOUSE, P.E. and ALIA, R. 2010. Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Molecular Ecology*, 19:1396-1409.
- SQUILLACE, A.E.. 1967. Effectiveness of 400-foot isolation around a slash pine seed orchard. *Journal of Forestry*, 65:823-829.
- SQUILLACE, A.E. and LONG E.M. 1981. Proportion of pollen from nonorchard sources. In: E.C. Franklin (Ed.), *Pollen Management Handbook*, pp.15-19. USDA Agric. Handb. 587. Washington, DC.
- STEWART, S.C. 1994. Simultaneous estimation of pollen contamination and pollen fertilities of individual trees in conifer seed orchards using multilocus genetic data. *Theoretical and Applied Genetics*, 88:593-596.
- STOEHR, M.U. and NEWTON, C.H. 2002. Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research*, 32: 469-476.
- 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. *Canadian Journal of Forest Research*, 28:187-195.
- STOEHR, M., MEHL, H., NICHOLSON, G., PIEPER, G. and NEWTON, C. 2006. Evaluating supplemental mass pollination efficacy in a lodgepole pine orchard in British Columbia using chloroplast DNA markers. *New Forests*, 31:83-90.
- STREIFF, R., DUCOUSSO, A., LEXER, C., STEINKELLNER, H., GLOESSL, J., KREMER, A. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Mol. Ecol.* 8:831-841.
- ŞİMŞEK, Y. 1993. Orman Ağaçları Islahına Giriş. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları. Muhtelif yayınlar serisi No:65. Ankara, 312 s.
- TERRAB, A., PAUN, O., TALAVERA, S., TREMETSBERGER, K., ARISTA, M. and STUESSY, T.F. 2006. Genetic diversity and population structure in natural populations of Moroccan Atlas cedar (*Cedrus atlantica*; *Pinaceae*) determined with cpSSR markers. *American Journal of Botany*, 93(9):1274-1280.
- TOTH, G., GASPARI, Z. and JURKA, J. 2000. Microsatellites in Different Eucaryotic Genoms: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10:967-981.
- TORIMARU, T., WANG, X.R., FRIES, A., ANDERSSON, B. and LINDGREN, D. 2009. Evaluation of Pollen Contamination in an Advanced Scots Pine Seed Orchard. *Silvae Genetica*, 58(5-6):262-269.
- TUNÇTANER, K. 2007. Orman Genetiği ve Ağaç Islahı, Türkiye Ormancılar Derneği, Eğitim Dizisi:4, 364 s.
- ÜRGENÇ, S. 1982. Orman Ağaçları Islahı. İ.Ü. Orman Fakültesi, Yayın No:2836/293. İstanbul, 414 s.
- VARSHNEY, R.K., GRANER, A. and SORRELS, M.E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23:48-55.
- 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. *Biological Conservation*, 129:451-460.
- VENDRAMIN, G.G., LELLI, L., ROSSI, P. and MORGANTE, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 5:595-598.
- VENDRAMIN, G.G., FADY, B., GONZALEZ-MARTINEZ, S.C., HU, F.S., SCOTTI, I., SEBASTIANI, F., SOTO, A. and PETIT, R.J. 2008. Genetically depauperate

- but widespread: the case of an emblematic Mediterranean pine. *Evolution*, 62(3):680-8.
- WANG, X. LINDGREN, D., SZMIDT, A.E. and YAZDANI, R. 1991. Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 6:379-385.
- WEINTRAUB, S. 2002. Demystifying silica gel. Object specialty group postprints, Vol. 9, 1-24. Washington, D.C: American Institute for Conservation.
- WHEELER, N. and JECH, K. 1986. Pollen contamination in a mature, Douglas-fir seed orchard. Proc. IUFRO Conf. Breeding, Theory, Progeny testing of seed orchards. Oct. 13-17, 1986. Williamsburg, VA.
- WISELOGEL, A.E. 1986. Pollen Contamination in a Superior Loblolly Pine Seed Orchard. Proc. Ninth North Amer. For. Biol. Workshop. pp:274-278. June 15-18, Stillwater, OK, USA.
- XIE, C.Y. and KNOWLES, P. 1994. Mating system and effective pollen immigration in a Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) plantation. *Silvae Genetica*, 43:48-52.
- YAHYAOĞLU, Z. VE ATASOY, H. 1983. Ladinde (*Picea orientalis* L. LINK) ıslah çalışmaları. Karadeniz Üniversitesi Dergisi, Orman Fak. Cilt:6, Sayı:2, 416-434.
- YAZDANI, R. and LINDGREN, D. 1991. Variation of pollen contamination in a Scots pine seed orchard. *Silvae Genetica*, 40(5-6):243-245.
- YAZDANI, R., LINDGREN, D., SEYEDYAZDANI, F., PASCUAL, L. and ERIKSSON, U. 1995. Flowering, phenology, empty seeds and pollen contamination in a clonal seed orchard of *Pinus sylvestris* in Northern Sweden. In: Ph, Baradat, W. T. Adams and G, Muller-Starck (Eds), Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees, SPB Academic Publishing, pp:309-319, Amsterdam, The Netherlands.
- YEH, F. C., YANG, R. and BOYLE, T. 1999. POPGENE Version 1.32. Windows-based software for population genetics analysis.
- ZHUOWEN, Z. 2002. Pollen Dispersal and its Spatial Distribution in Seed Orchards of *Cunninghamia lanceolata* (LAMB.) Hook. *Silvae Genetica*, 51(5-6):237-241.
- ZOBEL, B.J. and McELWEE, R.L. 1964. Seed orchards for the production of generally improved seed. *Silvae Genetica*, 13:4-11.
- ZOBEL, B.J. and TALBERT, J. 1984. Applied Forest Tree Improvement. John Wiley and Sons, Inc. New York, 505 p.
- ZOBEL, B.J., BARBER, J., BROWN, C.L. and PERRY, T.O. 1958. Seed orchards- Their concept and management. *Journal of Forestry*, 56:815-825.

7. EKLER

EK-1: Gündoğmuş-Eskibağ (Akçagedik-Tespihli) orijinli 38* no'lu kızılçam tohum bahçesi krokisi - klonların ve klonlara ait rametlerin yerleşim planı (Ayrıntıları, bundan sonraki sayfalardadır).



* Tohum bahçesi no'ları Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü'nce verilen Ulusal Kayıt No'larıdır.

Not: Çalışmada örneklenen her bir klon, ayrı renklerle gösterilmiştir.

EK-1'den devam

SIRA NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1																	
2																	
3																	
4																	
5													9270	9271			
6										9272	9273	9274	9275	9276	9277		9279
7								9275		9277	9278	9279	9280	9281	9282		9284
8					9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284		9286	9287	9288	9289
9				9281	9282	9283	9284	9285			9288	9289		9291	9292		9294
10				9286	9287	9288			9291	9292	9293	9294	9295	9266		9268	
11				9291	9292	9293	9294	9295		9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274
12				9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273		9275		9277		9279
13				9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279		9281	9282	9283	9284
14			9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283		9285		9287	9288	9289
15			9280	9281	9282		9284	9285	9286	9287	9288			9291	9292	9293	9294
16			9285	9286	9287	9288	9289			9292		9294	9295	9266	9267	9268	9269
17		9289	9290	9291	9292	9293	9294	9295		9267	9268		9270	9271	9272	9273	9274
18		9294	9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	
19		9269	9270	9271		9273	9274		9276	9277	9278		9280	9281	9282		
20	9273		9275	9276	9277		9279		9281	9282	9283	9284				9288	9289
21	9278	9279		9281	9282	9283	9284	9285			9288		9290	9291	9292	9293	9294
22		9284	9285	9286	9287	9288				9292	9293	9294	9295	9266		9268	9269
23			9290			9293	9294	9295		9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	
24		9294	9295						9271	9272	9273	9274	9275	9276		9278	9279
25				9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284
26				9281	9282	9283	9284			9287	9288	9289		9291	9292	9293	9294
27			9290		9292	9293		9295	9266	9267	9268	9269		9271	9272	9273	9274
28		9294	9295		9267	9268		9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279
29			9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284
30			9275	9276			9279	9280	9281	9282	9283	9284	9285		9287	9288	9289
31			9280	9281	9282	9283	9284	9285		9287	9288	9289			9292	9293	9294
32				9286		9288	9289	9290	9291	9292			9295	9266	9267	9268	9269
33					9292						9268	9269	9270	9271	9272	9273	
34									9271		9273	9274	9275	9276		9278	9279
35					9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284
36							9279	9280	9281		9283	9284	9285		9287	9288	9289
37											9288	9289		9291	9292	9293	9294
38																	
39																	
40																	
41																	
42																	

Not: Çalışmada örneklenen her bir klon, ayrı renklerle gösterilmiştir.

Devamı arkada

EK-1'den devam

18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
										9295				9269			
			9293							9270				9274			
		9267	9268	9269	9270		9272	9273					9278	9279			
		9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279		9281	9282		9284			
	9276		9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284	9285							
9280	9281	9282		9284	9285	9286	9287	9288	9289			9292		9294			
9285	9286	9287	9288	9289	9290	9291	9292	9293	9294	9295		9267	9268	9269			
	9291	9292	9293	9294	9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274			
9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279			
	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284			
9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284	9285	9286	9287		9289			
9280	9281	9282	9283		9285		9287	9288		9290							
9285	9286	9287	9288					9293		9295	9266	9267	9268	9269		9271	
9290		9292							9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275		
	9266					9271		9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282
9270	9271	9272		9274	9275	9276	9277		9279	9280	9281	9282	9283	9284	9285	9286	
9275	9276			9279	9280	9281	9282	9283	9284	9285	9286	9287			9290	9291	9292
9280	9281		9283	9284	9285	9286	9287	9288		9290	9291	9292	9293	9294		9266	9267
		9287	9288	9289		9291	9292	9293	9294	9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272
9290	9291	9292	9293	9294	9295	9266	9267	9268		9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	
9295	9266	9267	9268	9269	9270			9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	
9270		9272	9273	9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280		9282	9283	9284	9285	9286	
9275	9276		9278		9280		9282	9283	9284		9286	9287	9288	9289	9290	9291	9292
		9282		9284	9285	9286	9287	9288	9289	9290	9291		9293	9294	9295	9266	9267
		9287			9290	9291	9292	9293			9266			9269	9270	9271	
9295	9266			9269	9270	9271	9272			9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282
9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283	9284	9285	9286	9287	9288	9289	9290	9291	9292
9280	9281	9282		9284	9285	9286	9287	9288	9289	9290	9291	9292			9295	9266	9267
			9288	9289	9290		9292	9293	9294	9295	9266		9268	9269	9270	9271	
9290	9291	9292	9293	9294	9295	9266	9267		9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277
9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275			9278	9279	9280	9281	9282
9270	9271	9272	9273	9274	9275		9277	9278	9279	9280	9281	9282	9283		9285	9286	9287
9275	9276	9277	9278	9279		9281	9282		9284	9285			9288	9289	9290		
9280		9282	9283	9284		9286	9287	9288	9289			9292		9294	9295		
9285	9286	9287	9288	9289	9290		9292	9293	9294	9295	9266	9267					9272
9290		9292	9293	9294	9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277
9295	9266	9267	9268	9269	9270	9271	9272	9273	9274	9275	9276	9277		9279		9281	9282
	9271	9272		9274	9275	9276	9277	9278	9279	9280	9281	9282		9284	9285	9286	9287
					9280	9281	9282			9285			9288	9289	9290	9291	9292
										9290	9291	9292	9293			9266	9267
														9269			9272

Devamı arkada

EK-1'den devam

[illegible]

Devamı arkada

EK-1'den devam

54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
								9286	9275	9282	9288				9282
									9283	9290	9292			9283	9290
								9278	9287	9281	9277				9280
								9271	9272	9289	9275				
								9273	9274	9282					9289
								9276	9279	9290				9283	
							9284		9280	9269				9287	
							9289	9295						9290	9294
							9288	9279	9285	9294	9276				
								9275	9274	9277	9290				9289
							9272	9291	9280		9293				9272
								9269	9289	9288	9286				9293
9287	9289							9278	9292	9270	9295				
9282	9294	9290	9283	9293			9280	9290	9271	9283	9282				9271
9283	9288	9295	9287	9278	9291			9276	9294	9281	9284				9290
9281	9284	9271	9289	9283		9286	9288	9295	9285	9293	9291				9291
9291	9282	9293	9285	9294	9281		9289	9277	9287	9274	9292			9284	9292
	9290	9275		9266	9287		9272	9283	9280	9290	9288			9290	9283
		9269		9276	9288	9275	9292	9270	9284	9269	9275				9289
9277	9283	9270	9284	9282	9279	9290	9278	9294	9268	9285	9289				9287
	9278	9289	9274	9277	9283	9291	9271	9295	9282	9293	9291	9290			9276
9276		9292	9281	9294	9286	9285	9289	9276	9283	9281	9280	9295			9294
9282	9288	9290	9271	9293	9269	9292		9287	9275	9294	9292	9288			9269
9295	9273	9285	9287	9276	9295	9280		9270	9290	9284	9273				
9269	9277	9283	9289	9268	9284	9282	9293		9295	9278					
9279	9294	9275	9270	9291	9278	9294	9277	9283	9285	9291	9286	9293			9274
9292	9266	9288	9293	9286	9292		9289	9266	9281	9271	9294				9290
9287	9282	9290	9285	9295		9287	9275	9269	9292	9288	9276	9290			9282
9283	9280	9277	9269	9276	9283	9279	9280	9284	9270	9274	9295	9277			9289
9284	9291	9278	9289	9267	9281	9288	9293	9286	9282	9283	9287	9275			9286
9274	9293		9270	9294	9282	9271	9291		9289	9285					9283
9285	9288			9275		9290	9287	9294	9276						
9294	9283	9290	9277	9295	9289	9285	9283	9272	9295						9295

Devamı arkada

EK-1'den devam

70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
9289																	
9284																	
9295	9281																
9292	9294																
9282		9287															
9290	9270	9284															
	9293	9277															
9295		9283	9269														
9292	9266	9281	9294														
9282	9288	9287	9275														
9290	9286	9284	9276														
9270	9295		9291														
9269	9294	9268	9290	9280													
9289	9277	9292	9279	9288	9282												
9275	9287	9278	9281	9295	9286												
9295	9282	9293	9266	9283	9287	9270											
9294	9280	9284	9285	9276	9290	9274	9269	9295	9287	9290	9276	9289	9279	9287	9294	9295	9271
9273	9288	9271	9289	9291	9275	9288	9294	9271	9291		9293	9269	9283	9290		9289	9288
9281	9290	9270	9269	9272			9286	9277	9283	9292	9280		9291	9286	9293	9275	9285
9293	9286	9292	9277	9295		9293	9285	9289	9272	9270	9294	9285	9288	9292		9282	9287
9295	9285		9294		9279	9292	9266		9282	9284		9287	9278	9277	9284	9295	9274
9291	9284	9283	9268	9288	9290	9278	9269	9295	9276	9290	9268	9281	9289		9294		9281
9290	9282	9275	9289	9281	9273	9291	9274	9288	9271	9293	9291	9279	9283	9271	9290	9291	9267
	9293	9270	9269	9276	9284		9294	9270	9289				9266	9293	9270	9292	9283
9292	9280	9287	9266	9295	9272			9283	9285	9292	9294	9282	9287	9276	9288	9278	9295
9288	9294	9271	9283	9285	9282	9290	9287	9277	9269	9278	9290	9272	9284	9289	9275	9294	9273
9276	9281	9277	9291	9278	9292	9268	9281				9280	9283	9281	9285	9269	9290	9291
9284	9285	9293	9286	9289	9270	9294	9279	9284	9276		9291	9270	9295	9267	9292	9286	9293
9270	9295	9275		9280	9269	9288	9283	9286	9282		9271	9294	9277	9288	9276	9283	9279
9294	9266	9288	9273	9284	9274		9266	9290	9275	9269	9292	9274	9287		9289	9282	9294
9291	9269	9292	9282	9281	9295	9277	9292	9287	9285	9295	9281	9284					</

Devamı arkada

EK-1'den devam

[illegible]

Devamı arkada

EK-1'den devam

[illegible]

EK-2: Kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışları

1. ÖZÜTLEME TAMPONU

Özütleme tamponu	20X	Son Konsantrasyon
1 M Tris-HCl pH=8	2 ml	100 mM Tris- HCl pH=8
0.5 M EDTA pH=8	2 ml	50 mM EDTA pH=8
5 M NaCl	2 ml	500 mM NaCl
14.3 M 2-merkaptoetanol	14 µl	10 mM 2-merkaptoetanol
dH ₂ O	14 ml	-

2. 1 M Tris-HCl pH=8

Trizma baz : 12.11 gr
dH₂O : 100 ml
HCl ile pH=8'e ayarlanır. + 4 °C'de saklanır.

3. 0.5 M EDTA pH=8

EDTA : 18.622 gr
dH₂O : 100 ml
NaOH ile pH=8'e ayarlanır. + 4 °C'de saklanır.

4. 5 M NaCl

NaCl : 29.22 gr
dH₂O : 100 ml içinde çözülür. + 4 °C'de saklanır.

5. %10 SDS

SDS : 10 gr
dH₂O : 100 ml içinde çözülür. Oda sıcaklığında saklanır.

6. 5 M Potasyum Asetat (KAc)

KAc : 49.075 gr
dH₂O : 100 ml içinde çözülür. -20 °C'de saklanır.

7. 50 mM Tris/10 mM EDTA çözeltisi

50mM Tris/10 mM EDTA	10X	15X	20X
1 M Tris-HCl pH=8	50 µl	75 µl	100 µl
0.5 M EDTA pH=8	20 µl	30 µl	40 µl
dH ₂ O	930 µl	1395 µl	1860 µl

8. 3 M Sodyum Asetat (NaAc)

NaAc : 24.609 gr
dH₂O : 100 ml içinde çözülür. + 4 °C’de saklanır.

9. SAKLAMA TAMPONU

Saklama Tamponu	20X	25X
dH ₂ O	2 ml	2.5 ml
RNaz 10 mg/ml	5 µl	6.25 µl

10. Tris-Borat-EDTA (TBE) (10X)

Trizma baz : 108.0 gr
Borik asit : 55.0 gr
EDTA (0.5 M, pH: 8) : 40.0 ml veya 9.3 gr EDTA
dH₂O : 1 litre içinde çözülür ve + 4 °C’de stoklanır.

11. Agaroz jel (%1’lik)

Boyut	Örnek sayısı	Agaroz (gr)	1X TBE (ml)
Küçük	16	0.5	50
Orta	20	1.3	130

12. Agaroz jel (%2’lik)

Boyut	Örnek sayısı	Agaroz (gr)	1X TBE (ml)
Küçük	16	1.0	50
Orta	20	2.6	130

EK-3: TANIMLAMALAR

Allel: Bir genin değişik formları veya belli bir lokusta yer alan değişik nükleotit dizileri.

Anasal (Maternal) kalıtım: Belirli karakter veya özelliklerin yavrulara anne tarafından aktarılması (Örn: Mitokondri DNA'ları, yumurta yolu ile anneden yavru bireylere aktarılır).

Babasal (Paternal) kalıtım: Belirli karakter veya özelliklerin yavrulara baba tarafından aktarılması (Örn: Koniferlerde Kloroplast DNA'ları, polen yolu ile babadan yavru bireylere aktarılır).

Döl denemeleri: Yavru bireylerin başarısını karşılaştırarak, anne-baba bireylerin hangisinin istenilen özelliklere sahip olduğunu, özel deneme desenleri kurarak test edilmesidir. Yetişme ortamının sağladığı üstünlüklerle, iyi genlerden kaynaklanan kalıtsal üstünlükleri ayırt etmek üzere çok sayıda döl, kontrollü şartlarda karşılaştırılarak daha güvenli sonuçlar elde edilir.

Elit ağaç: Döl denemeleri yapılarak, büyüme hızı, gövde, dallanma ve büyüme şekilleri, tali ürün verimi, hastalıklara dayanıklılık gibi karakterler bakımından genotipik olarak üstünlükleri kanıtlanmış ağaçlardır.

Elit ağaç tohum bahçesi: Döl denemeleri sonucunda genotipik olarak üstünlükleri kanıtlanmış ağaçlardan (elit ağaçlardan) kurulan tohum bahçesidir.

Epistasi: Bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında görülen baskılayıcı etkiler durumudur.

Fenotipik seleksiyon (seçilim): Dış görünüş özelliklerine dayanılarak istenilen karakterler bakımından arzu edilen özellikte bireylerin (veya ağaçların) seçilmesi.

Gen havuzu: Bir popülasyondaki fertlerin taşıdığı bütün genlerin (kalıtsal materyalin) hepsinin birden ortaya konulmasıyla ve karıştırılmasıyla oluşturduğu varsayılan teorik bir kavramdır.

Genetik kontaminasyon (kirlilik): Bir popülasyonun gen havuzuna istenmeyen genlerin katılması ve o gen havuzunun yapısını değiştirmesidir.

Genetik sürüklenme: Bir popülasyonda iki ya da daha çok allel veya genotipin sıklıklarında meydana gelen rastgele değişimler.

Genotip: Ağacın üreme hücreleri ya da vejetatif üreme ile nesilden nesile normal olarak değişmeden geçen ve fenotipin ortaya çıkmasında etkili olan kalıtsal yapıdır.

Haplotip: Rekombine olmayan kloroplast genomundaki her bir allelin kombinasyonu sonucu oluşan yapı.

İzoenzim: Bir enzimin aynı katalitik aktiviteye sahip farklı formları.

Klon: Belirli bir anaç bireyden (ortetten) aşı ya da çelik yoluyla üretilen ve aynı genotip yapıya sahip olan fertlerin ait olduğu tüm gruptur.

Konal tohum bahçesi: Çelik, aşı kalemi vb. vejetatif materyalle üretilen fidanlarla kurulan tohum bahçeleridir.

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.

Nötr belirteç: Doğal seleksiyonun etkisinin görülmediği genetik belirteçtir.

Null allel: Aktiviteye sahip olmayan alleldir.

Ortet (donör ağaç): Kendisinden aşı kalemi ya da çelik gibi vejetatif üreyebilir materyalin alındığı birey ya da ağaçtır.

Panmiktik denge (Panmictic equilibrium): Bir popülasyonda genlerin bir araya gelmesi, yani eşleşmesi tercihli olmayıp, rastgele olur. Bu rastgele eşleşmenin yarattığı dengeye Panmiktik denge ya da panmiksiz adı verilir.

Plantasyon: Fidan dikimi yoluyla yapılan ağaçlandırmalardır.

Plus ağaç: Fenotipik (boy, gövde düzgünlüğü, dal açıları vb.) özelliklerine dayanılarak seçilen üstün nitelikli ağaçlara plus ağaç adı verilir.

Polen göçü: Bir bitki popülasyonunun erkek çiçeklerinden etrafa yayılan polenlerin, rüzgar veya canlılar aracılığı ile aynı türün başka popülasyonlarına taşınması.

Polen kontaminasyonu (kirliliği): Bir tohum bahçesine bahçe dışındaki bireylerden gelen yabancı polenlerin bahçedeki seçkin klonlara ait dişi çiçekleri dölleyerek istenmeyen genetik kalitede tohum oluşmasına yol açmasıdır. Aynı şekilde, uyum değeri yüksek bir doğal popülasyona, uyum değeri bilinmeyen ya da düşük bir popülasyondan polen karışması da polen kontaminasyonuna (kirliliğine) yol açar.

Polimorfik lokus: Bir popülasyondaki bireylerin bir lokustaki alleller bakımından farklı genotiplere sahip olma durumu.

Polimorfizm: Populasyonda bir karakterin genotipik olarak birden fazla alternatifinin bulunması durumu.

Populasyon: 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.

Ramet: Belirli bir ağaçtan alınan aşı kalemi ya da çeliklerin köklendirilmesi yoluyla elde edilen bireylerdir ve aynı klondan üreyen rametler, genotip olarak birbirinin aynısıdır.

Soy-içi üreme (Inbreeding): Akrabalar arasında üreme. Teknik olarak, çiftlerin populasyondan rastgele seçilmiş iki bireye göre, birbirine daha yakın akraba oldukları bir çiftleşme durumu.

Soy-dışı üreme (Outbreeding): Akraba olmayan bireyler arasında üreme.

Tohum bahçesi: Genetik olarak üstün ağaçların klon ya da tohumlarından kurulan ve genetik açıdan arzulanmayan polen kaynaklarından izole edilmiş, özel idare ve işletmeye tabi tutulan; sık, bol ve kolay tohum hasat edilen ağaçlandırmalardır.

ÖZGEÇMİŞ

B. Banu Bilgen 1978 yılında Antakya’da doğdu. İlkokul 5.sınıfa kadar Kahramanmaraş’ta, ilkokul 5.sınıf, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. Lisans öğrenimi için 1996 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümüne girdi. Aynı bölümden 2001 yılında mezun oldu. Ayrıca Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Çift Anadal programını bitirdi. 2001-2006 yılları arasında Özel Antalya Koleji’nde Biyoloji Öğretmeni olarak görev yaptı. Eylül 2003’de Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. Ocak 2006’da yüksek lisansını (M. Sc.) tamamlayarak doktora eğitimine başladı. Eylül 2006’dan beri Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.