

**TÜRKİYE'DEKİ KESTANE (*Castanea sativa* MİLL.)
POPÜLASYONLARININ
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNE KARŞI
BÖLGESEL
ADAPTASYONLARININ BELİRLENMESİ**

Fadime BEYAZYÜZ

**DOKTORA TEZİ
ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ŞEMSETTİN KULAÇ**

**EŞ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Elif GÜLBAHÇE MUTLU**

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEKİ KESTANE (*Castanea sativa* MİLL.)
POPÜLASYONLARININ
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNE KARŞI
BÖLGESEL
ADAPTASYONLARININ BELİRLENMESİ

Fadime BEYAZYÜZ tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.ok

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Şemsettin KULAÇ

Düzce Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Elif GÜLBAHÇE MUTLU

KTO Karatay Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Şemsettin KULAÇ

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Emine ARSLAN

Selçuk Üniversitesi

Prof. Dr. Hakan ŞEVİK

Kastamonu Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat SARGINCI

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 18/10/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18 Ekim 2023

Fadime BEYAZYÜZ

TEŐEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezimin ortaya çıkmasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danıŐmanım Doç. Dr. Şemsettin KULAÇ'a en içten dileklerimi, lisansüstü eğitimim boyunca yolumu aydınlatan sevgili eş danıŐmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif GÜLBAHÇE MUTLU'ya Őükranlarımı sunarım.

Tezin ortaya çıkmasında desteklerini hep yanımda hissettiğim Prof. Dr. Ertuğrul FİLİZ, Dr. Öğr. Üyesi Murat SARGINCI ve kıymetli jüri üyelerim, Prof. Dr. Emine ARSLAN ve Prof. Dr. Hakan ŞEVİK'e teŐekkür ederim. Bu alıŐma boyunca yardımını, desteğini esirgemeyen ve yürüdüğüm yolda tecrübeleriyle beni aydınlatan değerli hocam Doç. Dr. İsmail KOÇ ve arkadaşım Dr. Uğur CANTÜRK'e en içten dileklerimle teŐekkür ederim.

Eğitimim boyunca zaman zaman ihmal ettiğim, varlığıyla hayatımı Őenlendiren biricik oğlum ve sevgili EŐim Selim BEYAZYÜZ'e sabır ve özverileri için ayrıca minnettarım.

Eğitimimin ilk gününden bugüne kadar sürekli destekçim olan annem ve kardeŐime en içten sevgilerimi iletir, varlığıyla belki de hayatıma en büyük desteğim büyük ınarım rahmetli babamın bugünü görebilmesini çok isterdim...

Bu tez alıŐması, Düzce Üniversitesi BAP- 2021.02.02.1154 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiŐtir. ÇalıŐmamı destekleyen Düzce Üniversitesi BAP birimine teŐekkürlerimi sunarım.

Babam, Orhan KOCAMAN anısına,

18 Ekim 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BEYAN	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	x
SİMGELER.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
EXTENDED ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. KESTANE	5
2.1.1. Genel Özellikleri.....	6
2.1.2. Kestanenin Önemi.....	7
2.2. BİTKİLERDE GENETİK ÇEŞİTLİLİK	8
2.2.1. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Moleküler İşaretleyicilerin Kullanımı	8
2.2.1.1. ISSR Markörleri.....	9
2.2.1.2. SCoT Markörleri.....	10
2.3. İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNİN BİTKİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ.....	11
2.3.1. Kuraklık Stresi	12
2.3.1.1. Kuraklık stresinin bitkinin fizyolojik özellikler üzerindeki etkileri.....	12
2.3.1.2. Kuraklık stresinin biyokimyasal özellikler üzerindeki etkileri.....	13
2.4. KESTANENİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ VE STRES TOLERANSI İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÖZETİ.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. ÇALIŞILAN POPÜLASYONLAR	21
3.2. MOLEKÜLER ANALİZLER İÇİN BİTKİ MATERYALİNİN TOPLANMASI	22
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	22
3.2.2. DNA Konsantrasyon Tespiti	24
3.2.3. ISSR PCR Analizleri.....	25
3.2.4. SCoT PCR Analizleri.....	27
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
3.2.6. Moleküler Verilerin Analizi	29
3.3. FİZYOLOJİK ANALİZLER.....	32
3.3.1. Klorofil Konsantrasyon İndeksi Ölçümü.....	33
3.3.2. Fotosentez Parametre Ölçümleri	33
3.3.3. Ksilem Su Potansiyeli Ölçümü	34
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	35

3.4.1.1. Prolin Protokolü	35
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	37
4. BULGULAR	38
4.1. ISSR VE SCoT BELİRTEÇLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	38
4.2. GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	40
4.3. KURAKLIK STRESİNİN FİZYOLOJİK KARAKTERLERE ETKİSİ	47
4.3.1. Klorofil Konsantrasyon İndeksi Tayini (KKİ) Sonuçları.....	47
4.3.2. Fotosentez Parametre Ölçümleri Sonuçları.....	48
4.3.2.1. Kuraklık stresinin stoma iletkenliği (SI), terleme (T) ve net fotosentez (Anet) etkisi.....	49
4.3.3. Ksilem Su Potansiyeli (KSP) Ölçümleri Sonuçları	55
4.4. KURAKLIK STRESİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERLERE ETKİSİ 56	
4.4.1. Prolin Miktarı Tayini Sonuçları	56
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	58
6. ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Çalışma kapsamında yaprakları toplanan popülasyonlarına ait doğal kestane ormanlarının lokasyon haritası. 21
- Şekil 2 DNA izolasyonunun pellet oluşum aşamasına ilişkin görüntü. 24
- Şekil 3. Agaroz jelde DNA görüntüsü örneği. 25
- Şekil 4. Elektroforez görüntüsü. 29
- Şekil 5. Kuraklık stresi uygulanan fidanların görseli. 32
- Şekil 6. Klorofil konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan SPAD 502 cihaz görüntüsü. 33
- Şekil 7. Gaz değişim parametrelerini ölçmek için kullanılan LI-COR cihaz görüntüsü. 34
- Şekil 8. Ksilem su potansiyeli ölçüm görüntüsü. 34
- Şekil 9. Prolin ölçüm protokol diyagramı. 36
- Şekil 10. ISSR profilleri. Mrkr: Moleküler işaretleyici (100–1500 bp). 38
- Şekil 11. PCR amplifikasyonu ile oluşturulan SCoT profilleri. M: Moleküler işaretleyici (100–1500 bp). 38
- Şekil 12 ISSR verilerinden Nei (1978)'e göre UPGMA metodu ile elde edilen popülasyonlar arası genetik uzaklığa dayalı dendogram. 42
- Şekil 13. SCoT verilerinden Nei (1978)'e göre UPGMA metodu ile elde edilen popülasyonlar arası genetik uzaklığa dayalı dendogram. 43
- Şekil 14. AMOVA analiz sonuçları a) ISSR primerleri, b) SCoT primerleri. Turuncu renk: popülasyonlar içi; mavi renk :popülasyonlar arası'nı ifade etmektedir. 44
- Şekil 15. ISSR belirteçleri ile kestane genotipleinden elde edilen 1 ila 15 arasında olan küme sayısı (K) ve LnP(D)- türetilmiş ΔK kullanılarak ΔK tepe değeri 2 olarak tahmin edilen üyelik fraksiyonunun grafiği. 45
- Şekil 16. ISSR belirteçlerine dayanan 45 C.sativa genotipinin STRUCTURE yazılım analizi ile elde edilen popülasyon yapısı. Kırmızı renkli dikey çubuk Küme 1'i ve yeşil renk Küme 2'yi gösterir. Grafik kantitatif özellik lokus istatistiğini kullanarak her bir genotip için tahmin edilen üyelik katsayısını gösterir. (1): Bursa; (2): Düzce; (3):Kütahya; (4):İbradı;(5): Ordu; (6):Trabzon;(7):Selge;(8):Ovacık;(9): Deli Sarnıç 45
- Şekil 17. SCoT belirteçleri ile kestane genotiplerinden elde edilen 1 ila 14 arasında olan küme sayısı (K) ve LnP(D)- türetilmiş ΔK kullanılarak ΔK tepe değeri 3 olarak tahmin edilen üyelik fraksiyonunun grafiği. 46
- Şekil 18. SCoT belirteçlerine dayanan kestane genotiplerinin STRUCTURE yazılım analizi ile elde edilen popülasyon yapısı. Kırmızı renkli dikey çubuk Küme 1'i ve yeşil renk Küme 2'yi gösterir. Grafik Q istatistiği kullanarak her bir genotip için tahmin edilen üyelik katsayısını gösterir. (1): Bursa; (2): Düzce; (3): Kütahya ;(4):İbradı;(5): Ordu; (6):Trabzon;(7):Selge;(8):Ovacık;(9): Deli Sarnıç 46
- Şekil 19. Kuraklık stresi uygulanan popülasyonların klorofil konsantrasyon indeksi değerlerinin uygulama zamanlarına göre değişim grafiği. 48
- Şekil 20. Kurak grupların Sİ'nin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği. 50
- Şekil 21. Kurak grupların T değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği. 51

Şekil 22. Kurak grupların Anet değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.....	53
Şekil 23 Kurak grupların İSKE değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.	54
Şekil 24.Kurak grupların su potansiyeli değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.....	55
Şekil 25. Kurak ve kontrol grupların prolin değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği. *** Gruplar içi karşılaştırmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade eder($p<0,05$).	57



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kestane popülasyonlarına ait bilgiler.	22
Tablo 3. Çalışma için optimize edilen ISSR PCR miktarları.	25
Tablo 4. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları.	26
Tablo 5. ISSR PCR döngü sıcaklık ve süreleri.	27
Tablo 6. Çalışma için optimize edilen SCoT PCR miktarları.	27
Tablo 7. Çalışmada kullanılan SCoT primerlerinin baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları.	28
Tablo 8. SCoT PCR döngü sıcaklık ve süreleri.	28
Tablo 9. POPGEN programına dayalı analizler ve açıklamaları.	30
Tablo 9 (devam). POPGEN programına dayalı analizler ve açıklamaları.	31
Tablo 10. ISSR ve SCoT primerlerinin popülasyon bazında gözlenen polimorfik lokus sayısı ve oranı verileri.	39
Tablo 11. ISSR ve SCoT primerlerinin PBI değerleri.	40
Tablo 12. ISSR verilerine göre kestane popülasyonlarının genetik uzaklık değerleri. ...	41
Tablo 13. SCoT verilerine göre kestane popülasyonlarının genetik uzaklık değerleri. ...	41
Tablo 14. ISSR ve SCoT primerlerinden elde edilen parametrelere ait veriler (SH: standart hata).	43
Tablo 14(devam). ISSR ve SCoT primerlerinden elde edilen parametrelere ait veriler.	44
Tablo 15. KKI değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	47
Tablo 16. Stoma iletkenliği değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	49
Tablo 17. Popülasyonların T değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	51
Tablo 18. Popülasyonlar ile net fotosentez değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	52
Tablo 20. İçsel su kullanım etkinliği değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	54
Tablo 21. Ksilem su potansiyeli değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	55
Tablo 22. Prolin değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.	56

KISALTMALAR

A_{net}	Net Fotosentez
ABA	Absisik asit
Bç	Baz çifti
BSİ	Bağlı su içeriği
CTAB	Setil-trimetil-amonyum bromit (Cetyl Trimethylammonium Bromide)
dH₂O	Saf Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
GAA	Glasiyel Asetik Asit
GC	GuaninSitozin
h	Saat (hour)
HWE	Hardy-Weinberg Dengesi
ISSR	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
İSKE	İçsel su kullanım etkinliği
MCMC	Markov Zinciri Monte Carlo
MgCl₂	Magnezyum Klorür
Na	Toplam Gözlenen Alel Sayısı
NaCl₂	Sodyum Klorür
Ne	Etkili Alel Sayısı
NNS	Asidik Ninhidrin Çözeltisi
NTSYS	Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi (Numerical Taxonomy And Multivariate Analysis System)
PBİ	Polimorfizm Bilgi İçeriği
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLS	Polimorfik Lokus Sayısı
PLY	Polimorfik Lokus Yüzdesi
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAA	Sülfosalisilik Asit
SCoT	Start Codon Targeted
SPAD	Single-Photon Avalanche Diode
Sİ	Stoma iletkenliği
SKE	Su kullanım etkinliği
E	Transpirasyon (Terleme)
TBE	TRİS-Borik Asit-EDTA
T_m	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
UPGMA	Aritmetik Ortalama İle Ağırlıksız Çift- Grup Yöntemi
UV	Ultraviyole Işınım
V	Volt

SİMGELER

>	Büyüktür
%	Yüzde
~	Yaklaşık
CO ₂	Korbondioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
g	Gram
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
µl	Mikrolitre
H	Genetik Çeşitlilik
I	Shannon Bilgi İndeksi
µ	Mikro
°C	Derece

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ KESTANE (*Castanea sativa* MİLL.) POPÜLASYONLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNE KARŞI BÖLGESEL ADAPTASYONLARININ BELİRLENMESİ

Fadime BEYAZYÜZ

Düzce Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Şemsettin KULAÇ
Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Elif GÜLBAHÇE MUTLU

Ekim 2023, 82 sayfa

Türkiye kestane üretimi açısından dünyada üçüncü sıradadır. Ancak küresel iklim değişikliğine bağlı olarak çevresel streslerin artması kestane üretiminin azalmasına neden olmuştur. Bu çalışma, ülkemizde doğal olarak yetişen kestane popülasyonlarının genetik çeşitliliğini ve kuraklık toleransındaki potansiyel farklılıklarını araştırarak koruma genetiği ve ıslah çalışmalarına katkı sağlamayı amaçlamıştır. Bu bağlamda, Türkiye'nin dört coğrafi bölgesinin yedi iline ait (Düzce, Trabzon, Ordu, Kütahya, İzmir, Antalya, Bursa) doğal kestane ormanlarından toplanan 180 *Castanea sativa* genotipinin genetik çeşitlilik seviyeleri ISSR ve SCoT olmak üzere iki farklı moleküler markör sistemi ile belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, iklim değişikliğine karşı bölgesel adaptasyonların belirlenmesi kapsamında sera ortamında yirmi sekiz gün boyunca kuraklık stresi uygulanan altı popülasyona ait (Düzce, Bursa, Deli Sargın, Selge, Ovacık, İbradı) kestane fidanlarının fizyolojik (klorofil konsantrasyon miktarı, stoma iletkenliği, terleme miktarı, net fotosentez miktarı, içsel su kullanım etkinliği ve ksilem su potansiyeli) ve biyokimyasal (prolin miktarı) parametrelerindeki değişim belirlenmiştir. Moleküler verilerden (toplam lokus sayısı, polimorfik lokus sayısı, polimorfizm bilgi içeriği ve genetik çeşitlilik) elde edilen bulgular, SCoT belirteçlerinin *C.sativa* popülasyonları arasındaki genetik ilişkileri belirlemede daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Düze popülasyonunun genetik çeşitliliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, fizyolojik ve biyokimyasal ölçümlerden elde edilen bulgular, güney popülasyonlarının (İbradı, Deli Sarnıç ve Selge) genel olarak kuraklığa toleranslı ve Bursa popülasyonunun ise kuraklığa duyarlı olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra Düzce popülasyonunun da kuraklığa tolerans geliştirdiği belirlenmiştir. Moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal verilerinden elde edilen bulgular ışığında, Düzce popülasyonunun kuraklığa tolerans seviyesinin yüksek olması daha yüksek genetik çeşitliliğe sahip olmasından kaynaklanmıştır. Bu bağlamda Düzce popülasyonunun kuraklığa adaptasyon geliştirdiği söylenebilir. Sonuç olarak yapılacak koruma genetiği ve ıslah çalışmalarında Düzce popülasyonu önerilebilir.

Anahtar Sözcükler: *C. sativa*, ISSR, İklim değişikliği, Kuraklık stresi, SCoT.

ABSTRACT

DETERMINATION GENETIC DIVERSITY and REGIONAL ADAPTATIONS to CLIMATE CHANGE of CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) POPULATIONS in TÜRKİYE

Fadime BEYAZYÜZ

Düzce University

Graduate School, Department of Forest Engineering

Doctoral Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şemsettin KULAÇ

Co Supervisor: Assist. Prof. Dr. Elif GÜLBAHÇE MUTLU

October 2023, 82 pages

Türkiye ranks third in the world in terms of chestnut production. However, the increase in environmental stresses due to global climate change has led to a decrease in chestnut production. This study aims to contribute to conservation genetics and breeding studies by investigating the genetic diversity and potential differences in drought tolerance of naturally growing chestnut populations in Turkey. In this context, the genetic diversity levels of 180 *Castanea sativa* genotypes collected from natural chestnut forests of seven provinces of four geographical regions of Turkey (Düzce, Trabzon, Ordu, Kütahya, İzmir, Antalya, Bursa) were determined by two different molecular marker systems, ISSR and SCoT. In addition, changes in physiological (chlorophyll concentration, stomatal conductance, transpiration, net photosynthesis, intrinsic water use efficiency and xylem water potential) and biochemical (proline content) parameters of chestnut seedlings of six populations (Düzce, Bursa, Deli Sarnıç, Selge, Ovacık, Ibradı), which were subjected to drought stress for twenty-eight days in greenhouse environment, were determined to determine regional adaptations to climate change. Molecular data (total number of loci, number of polymorphic loci, polymorphism information content and genetic diversity) showed that SCoT markers are more advantageous in determining genetic relationships among *C. sativa* populations. In addition, it was determined that the genetic diversity of Düzce population was higher. On the other hand, physiological and biochemical measurements showed that the southern populations (Ibradı, Deli Sarnıç and Selge) were generally drought tolerant and the Bursa population was drought sensitive. In addition, it was determined that the Düzce population also developed drought tolerance. In the light of the findings obtained from molecular, physiological and biochemical data, the higher drought tolerance level of Düzce population was due to its higher genetic diversity. In this context, it can be said that Düzce population has developed adaptation to drought. As a result, Düzce population can be recommended for conservation genetics and breeding studies.

Keywords: ISSR, *C. sativa*, Climate change, Drought stress, SCoT.

EXTENDED ABSTRACT

DETERMINATION GENETIC DIVERSITY and REGIONAL ADAPTATIONS to CLIMATE CHANGE of CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) POPULATIONS in TURKEY

Fadime BEYAZYÜZ

Düzce University

Graduate School, Department of Forest Engineering

Doctoral Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şemsettin KULAÇ

Co Supervisor: Assist. Prof. Dr. Elif GÜLBAHÇE MUTLU

October 2023, 82 pages

1. INTRODUCTION

Chestnut trees are an important plant species in Türkiye's natural wealth. They grow in many regions of Türkiye and are important both for their natural beauty and the economic benefits (Turna, 2013). Chestnut trees can be affected by various diseases and pests. In order to maintain the health of these, it is important to carry out regular monitoring for diseases and pests, cultural measures (cleaning, pruning, etc.) and chemical control measures. Genetic diversity helps populations evolve adaptation mechanisms to climate change which lead to various stresses factors, including pests and diseases. For this reason, many researchers have emphasised the importance of genetic diversity (Anderson et al., 2011; Hoffmann et al., 2021, Chung et al., 2023). So, different molecular markers are used for genetic studies such as determining the genetic characteristics of plants and crop improvement. Inter-Sequence Simple Repeated (ISSR) markers are frequently preferred in studies of plant genetic differentiation (Filiz and Koç, 2011). Start Codon Targeted (SCoT) is a gene-targeted marker that targets the region surrounding the start codon. SCoT does not require prior genomic sequence information for primer design (Casosoli et al., 2001).

On the other hand, climate change give rise to drought stress on plant by there is less or more water in the soil (Mishra and Cherkauer 2010). Plants show various changes in gas exchange parameters under stress conditions such as drought. These changes can affect water and nutrient uptake, photosynthesis, and respiration rates. Drought stress also has been reported to severely inhibit photosynthetic pigments and reduce plant productivity, (Menconi et al., 1995), as well as reduce conductance and CO₂ uptake by closing stomata

(Anjum et al., 2011). Plants develop various physiological and biochemical changes to cope with the drought stress. Proline accumulation is one of these responses (Bian et al., 2021).

2. MATERIAL AND METHODS

In this study, leaf samples of chestnut genotypes were obtained from seven provinces (Düzce, Trabzon, Ordu, Kütahya, İzmir, Antalya, Bursa, Antalya, İzmir) and nine different populations from four geographical regions (Mediterranean, Marmara, Black Sea and Aegean) where chestnut is widely cultivated. Genomic DNA was isolated from young plant leaves using the CTAB method. ISSR PCR assays were performed by modifying the protocol described by Casosoli et al. (2001), while SCoT PCR assays were performed by Collard and Mackill (2009).

The PCR products were run on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (0.5ug/ml) in a 1X TBE buffer at 120V for 1.5-2.5h, with images were taken every 15 min. The total number of observed alleles (N_a), allele frequencies, effective alleles (N_e) were obtained from the scored data, genetic diversity (H) according to Nei (1972) and genetic distance matrix values, Shannon information index (I), percentage of polymorphic loci, number of polymorphic loci, GenAlEx6 (Peakall and Smouse 2006), and POPGENE v.1.32 (Yeh et al.,1999) softwares. Genetic relationship between genotypes was determined using the MVSP package software. Population structure was also determined using STRUCTURE v 2.3.4. software (Pritchard et al., 2000).

On the other hand, *C. sativa* seeds collected from three different populations of the Mediterranean region (Deli Sarnıç, İbradı and Selge); Aegean region (İzmir-Ovacık), Marmara region (Bursa) and Black Sea region (Düzce) were used to determine adaptations to drought stress. The effect of drought stress on chlorophyll concentration, leaf gas exchange parameters (stomatal conductance, transpiration, net photosynthesis) ; xylem water potential and proline content measurements accumulation of four year old (4+1) chestnut seedlings was investigated.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

As a result of PCR, a total of 86 loci were detected with ISSR primers and 100 loci with SCoT primers. The mean polymorphism information content (PIC) values of 11 different

ISSR primers were 0.38 and the mean PIC values of 14 SCoT primers were 0.34. In genetic studies, the PIC values of molecular markers, one of the indicators of marker quality, are used to detect polymorphism among individuals in a population. The average polymorphic locus ratio was 40.56% and 49.11% for ISSR and SCoT markers, respectively. In addition, it was determined that Düzce population was found to have the highest polymorphic locus ratio with 58.14% and 71% for ISSR and SCoT markers, respectively, and these values were higher than the average polymorphic locus ratios. There are several studies in the literature that are consistent with our study in that SCoT markers have a higher average locus ratio than ISSR (Xiao et al.,2020; Tikendra et al.,2021). The highest h and I values were observed in the Düzce population and were determined to be $h = 0.2288$ and 0.2848 ; $I = 0.3371$ and 0.4174 for ISSR and SCoT markers, respectively and thus the markers were able to amplify more common polymorphic loci. In the evaluation of genetic distance between populations calculated according to Nei (1978), according to ISSR, Selge and Kütahya populations were the most distant to each other (0.6109); Trabzon and İbradı populations were the closest to each other (0.1681); on the other hand, according to SCoT, Ordu and Bursa populations were the most distant to each other (0.3051); Deli Sarnıç and Kütahya populations were the closest to each other. The fact that the distance results were different for two different markers is thought to be due to the fact that these markers target different gene regions. Molecular analysis of variance (AMOVA) is a statistical model for measuring molecular variation in population genetic studies (Huang et al.,1996). In this study, AMOVA results for ISSR analysis showed 62% variation within populations and 38% between populations; according to the results with SCoT primers showed 52% variation within populations and 48% between populations. The population structure of the chestnut genotypes two different ($\Delta K=2$) gene pools were obtained with ISSR primers and three different ($\Delta K=3$) gene pools were obtained with SCoT primers.

For the second part of this study, physiological and biochemical measurements were made to determine the regional adaptations of chestnut saplings to climate change. In our study, it was observed that the water potential values of the regularly irrigated control groups were between -10.5 Bar (-1.05MPa) and -19 Bar (-1.9 MPa). It can be said that the water potential values in the second week of drought stress were between -20 Bar (-2.0MPa) and -30 Bar (-3.0MPa) and the saplings were affected by drought stress. In the fourth week of the drought, it was determined that the water potential values of the saplings were

between -35 Bar (-3.5MPa) and -50 Bar (-5.0MPa). It has been reported that the water potential of trees under drought stress can decrease from -1.5 MPa to -8.0 MPa before sunrise, and sometimes even lower to even lower values due to the stomata remaining closed under similar conditions (Waring and Running, 1998; Sargıncı et al., 2022). As a result, it can be said that each population in our study closed their stomas to combat drought in the 4th week of the application and therefore had the lowest water potential values. Studies in the literature reporting that water potential values decrease with increasing drought stress are parallel to our findings (Balok and Hilaire, 2002; Wu et al., 2013; Camisón et al., 2020). According to the findings of our study, increased drought stress caused a decrease in the amount of chlorophyll in other populations except Deli Sarnıç. Various studies have reported that chlorophyll amounts decrease with increasing drought duration consist with our findings (Da Silva-Pinheiro et al., 2016; Atar et al., 2020; Hosseini et al., 2020). The decrease in the amount of chlorophyll under drought stress limits the photosynthesis ability of plants and negatively affects overall plant health. Drought-sensitive and drought-tolerant plants exhibit different stomatal movements in response to water scarcity (Pinheiro et al., 2011). According to the results obtained, the increase in drought severity did not cause a significant change in the stomatal conductance and transpiration values of the Deli Sarnıç and Selge populations. In terms of net photosynthesis values, while the increase in drought severity did not cause a significant change in the Selge population, it was determined that the Deli Sarnıç population had significantly less net photosynthesis value in the 3rd week of the drought. Photosynthesis and some other related physiological traits have been reported to differ significantly between drought-tolerant and sensitive genotypes. Some populations are naturally more drought tolerant than others and are clearly better suited to arid environments (Gomes-Laranjo et al., 2006). In the light of this information, it can be said that these two populations from the Mediterranean region may have naturally adapted to arid conditions. Moreover, proline measurements of our study showed that increasing drought severity caused significant proline accumulation in each population ($p < 0.05$). It was determined that proline accumulation in the Düzce population was higher than the others in the 1st, 3rd and 4th weeks of the drought ($p < 0.05$). Proline accumulation under stress has been associated with stress tolerance in many plant species, and proline concentration has generally been shown to be higher in stress-tolerant plants than in stress-sensitive plants (Anjum et al., 2011). In this context, according to the findings obtained from our study,

it can be said that the Düzce population has developed adaptation to drought compared to other populations.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

It was observed that ISSR and SCoT markers gave compatible results in the genetic diversity evaluation of 180 *C.sativa* genotypes used in the study. The results showed that SCoT markers are more advantageous in determining the genetic relationships between *C. sativa* populations. In this context, it may be recommended to use SCoT markers in genetic diversity studies for *C. sativa*. In the results of both markers used within the scope of the study, it was determined that the genetic diversity of the Düzce population was higher. On the other hand, the chestnut populations developed different tolerance to drought stress. In addition, it was thought that there were no significant changes in the physiological parameters of the Deli Sarnıç and Selge populations under increasing drought conditions, which means that these populations in the Mediterranean ecotype may have developed tolerance to drought. It was observed that the İbradı and Düzce populations made various physiological changes during drought periods. These physiological changes may be due to the develop tolerance to drought conditions. In addition, the fact that Düzce and İbradı populations still had live leaves at the end of the drought period supported that these populations could withstand drought. In addition, the fact that the level of genetic diversity is higher in the Düzce population indicates that this population may have developed adaptation to drought. In this context, Düzce population can be recommended for conservation genetic studies and breeding studies aimed at minimizing the risk of extinction caused by genetic factors. In addition, in order to obtain a chestnut genotype that is more resistant to drought conditions, it may be recommended to hybridize the Duzce population, which has a high diversity level and adaptation potential, with the Ibradi populations, which have a high adaptation potential. The results obtained from physiological evaluations against drought stress were made only on saplings. Since tolerance to environmental stress may change throughout the life of trees, it should be taken into account that the diversity of adaptation to drought stress may also vary depending on the age of trees and forests.

1. GİRİŞ

Kestane, *Fagales* takımına, *Fagaceae* familyasına ve *Castanea* cinsine ait çok amaçlı yaprak döken bir ağaçtır (Davis, 1970). *Castanea* cinsi ekonomik olarak önemli olan Çin kestanesi (*Castanea mollissima*), Japon kestanesi (*Castanea crenata*), Anadolu kestanesi (*Castanea sativa*) ve Amerikan kestanesi (*Castanea dentata*) türlerini içermektedir (Abdelhamid vd., 2014). Türkiye’de doğal olarak yetişen *C.sativa* ekolojik, sosyo-ekonomik ve kültürel öneme sahip orman ağacıdır (Özçağırın vd.,2014). *C. sativa* İspanya, Portekiz, İtalya, Fransa ve İngiltere'nin güney kesiminden Kafkasya’ya, Yunanistan ve Türkiye’de yayılış gösteren *Castanea* cinsinin tek yerli türüdür (Martín vd., 2007). Ayrıca, kestanenin gen merkezinin Kastamonu olduğu ve adını buradan aldığı da düşünülmektedir (Soylu, 1984). Kestane ağaçlarından elde edilen kestane meyvesi taze tüketilebilirken işlenerek farklı ürünlerin üretiminde kullanılabilir (Freitas vd., 2022). Ayrıca kestane ağaçlarından elde edilen ürünler arasında un, şeker, reçel, şarap, likör ve kahve yer almakta bu ürünlerin, Türkiye’nin geleneksel lezzetleri arasında olmasının yanı sıra turizm açısından da önemli bir katma değer sağladığı bilinmektedir (Atasoy ve Altıngöz, 2011). Kestane ağaçları, ekosistem için önemli bir yaşam alanı oluşturur ve diğer canlıların yiyecek kaynaklarından birini temsil eder ancak bu ağaçlar çeşitli hastalıklar ve zararlılar tarafından etkilenmektedir. Kestane ağaçlarını etkileyen biyotik streslerden bir kısmı aşağıda belirtilmiştir;

- *Kestane Yanıklığı (Cryphonectria parasitica)*: kestane ağaçlarının en önemli hastalıklarından biridir. Mantar kaynaklı bir hastalıktır ve ağaçların gövdelerinde kabuk lezyonlarına ve yanıklarına neden olmaktadır. Bu hastalık, ağaçların ölümüne veya zayıflamasına yol açabilir (Pereira-Lorenzo vd., 2010),
- *Kestane Yaprak Leke Hastalığı (Guignardia spp.)*: Bu hastalık, kestane yapraklarında lekeler oluşturan bir mantar enfeksiyonudur (Oduncuoğlu, 2016),
- *Kestane Kabuk Solgunluğu (Phytophthora spp.)*: Phytophthora mantarları, kestane ağaçlarının köklerini ve gövdelerini enfekte edebilen bir grup hastalık etmenidir. Bu hastalık, ağaçların zayıflamasına, solgunluğa ve ölümlerine neden olabilir (Şimşek vd., 2018).

Kestane ağaçlarını etkileyen zararlılar şu şekildedir;

- *Kestane Güvesi (Cydia splendana)*: Kestane güvesi, kestane meyvelerine zarar veren bir böcek türüdür. Larvalar, meyve içine girerek içerisinde beslenir ve meyvelerin kalitesini ve pazar değerini düşürebilir (Karagoz vd., 2009),
- *Kestane Gal Arısı (Dryocosmus kuriphilus)*: Bu zararlı, kestane ağacının tomurcuklarına saldırır ve gal adı verilen anormal büyümeler oluşturur. Bu gal yapıları, ağacın büyüme potansiyelini etkileyebilir ve verim kaybına neden olabilir (Avtzis vd., 2019).

Kestanenin maruz kaldığı bu hastalıklar ve zararların değişen iklim koşullarına bağlı olarak artacağı öngörülmektedir. Bu zararların etkisini ortadan kaldırmak adına çeşitli alanlarda çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Bu anlamda, genetik çeşitlilik çalışmaları son zamanlarda oldukça dikkat çekmektedir. Genetik çeşitlilik, popülasyonların hastalıklar, zararlılar, iklim değişikliği ve diğer stres etkenleri karşısında uyum sağlama kabiliyetini korumasına yardımcı olur (Anderson vd., 2011; Hoffmann vd., 2021, Chung vd., 2023). Genetik varyasyon, bir popülasyonun bireyleri arasındaki genetik farklılıkları ifade etmektedir. (Frankham vd.,2002). Bir popülasyon içindeki genetik varyasyon polimorfik genlerin sayısı ve yüzdesi, gen başına alel sayısı ve her genotip için heterozigot bölgelerinin oranı moleküler çeşitliliğin değerlendirilmesine ilişkin net bir gösterge sağlamaktadır (Al-Hadeithi ve Jasim, 2021). Genetik çeşitlilik popülasyonun toplam genetik varyasyonunun ölçüsü olarak da tanımlanabilir. Bir popülasyon ne kadar genetik çeşitlilik taşıyorsa, o popülasyonun adaptasyon yeteneği ve uzun vadeli hayatta kalma ihtimali o kadar yüksektir. Genetik çeşitliliğin yüksek olması, popülasyonun çevresel değişikliklere daha iyi uyum sağlayabilmesine ve dolayısı ile popülasyonların evrimsel süreçte hayatta kalma şansının artmasına yardımcı olur (Saccheri vd.,1998; Frankham vd., 2002). Bu nedenle, bir türün genetik çeşitliliğini korumak, evrimsel zaman boyunca hayatta kalma şansını artırabilir (Chung vd., 2023). Bu bağlamda kestane ağaçlarının genetik çeşitliliğinin yüksek olması, hastalıklar, zararlılar ve stres koşullarına karşı daha dirençli olmalarını sağlayabilir (Freitas vd., 2021). Bu, kestane ormanlarının sağlığını korumak, üretkenliği artırmak ve sürdürülebilirliğini sağlamak açısından önemlidir (Larue vd., 2021; Demasure vd., 2000; Fernández-López ve Alia 2003).

Popülasyonların genetik çeşitlilik düzeyini belirleyerek elde edilen mahsulün iyileştirilmesi için genomda herhangi bir gen ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası olan ve moleküler belirteç adı verilen çeşitli biyolojik araçlar kullanılmaktadır (Filiz ve Koç 2011; Yorgancılar vd., 2015). Yıllar içinde, genomun belirli bölgelerini hedef

alabilen ve böylece çok küçük genetik değişiklikleri saptayan yeni işaretleyici sistemler geliştirilmiştir (Choudhury vd., 2022). Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (ISSR) belirteçleri, yüksek bağlanma sıcaklığına bağlı olarak, verimli tekrarlanabilirlik, yüksek polimorfizm, düşük DNA gereksinimi, kolay kullanım ve yüksek genomik dağılıma bağlı olarak basitçe yüksek yeniden üretilebilirliğe sahiptir (González vd., 2002). Başlangıç hedefli kodon (SCoT) belirteçleri, genlerin başlangıç noktalarını belirlemek için kullanılan moleküler işaretçilerdir. Bu belirteçler, gen ekspresyonunu ve protein sentezini etkileyen özel bölgeleri hedef alarak çalışırlar (Collard ve Mackill, 2009). ISSR ve SCoT moleküler belirteçleri, bitki genotipini daha iyi ayırt edebilen ve germplazm kaynaklarının genetik arka planının ortaya çıkarılmasında önemli rol oynayan gen lokus bilgisi elde etmek için DNA'dan amplifiye edilir (Yılmaz ve Çiftçi, 2021). Orman ağaçlarının genetik çeşitliliğine ilişkin yapılan büyük ölçekli araştırmalar, genetik kaynakların envanteri, korunması ve yönetimi ile ilgilidir. Genetik çeşitlilik çalışmaları, türlerin coğrafi kökenine dair fikir vermektedir. Bitkilerin korunması için yapılan genetik çeşitlilik çalışmaları genellikle bir türün bütününe değil, seçilmiş popülasyonlara odaklanarak sağlanmaktadır (Fiřer vd., 2021). Koruma genetiği ve özellikle genetik izleme, bazı popülasyonların neden diğerlerinden daha fazla risk altında olduğunun anlaşılmasını sağlamaktadır (Van Rossum ve Raspé 2018; Van Rossum vd., 2020). Literatürde, kestane türünün genetik çeşitliliği için SSR belirteçleri (Cavallini vd., 2022; Alessandri vd., 2022; El Chami vd., 2021; Prgomet vd., 2013), EST-SSR (Alcaide vd., 2022, Mattioni vd., 2013), RAPD (Serdar vd., 2014), RAPD, AFLP, ISSR ve SSR belirteçleri (Abdelhamid vd., 2014), RAPD, ISSR belirteçlerinin birlikte kullanıldığı çalışmaları bulunmasına rağmen SCoT belirteçleri ile yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna ek olarak ISSR ve SCoT belirteçlerinin birlikte kullanıldığı çalışmaları çeşitli türlerde (Gogoi, vd.,2020; Motahari vd., 2021; Ghounim vd., 2022; Alzahrani vd., 2023) mevcut olmasına rağmen kestane kullanılmamıştır.

Değişen iklim koşullarına bağlı olarak bitkiler, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalmaktadır. Bu stresler bitkinin büyümesi ile ilgili moleküler mekanizmalarına zarar vererek bitkilerin gelişimini olumsuz etkilemektedir (Bita ve Gerats 2013). Abiyotik stres, canlı organizmaların çevresel faktörlerin olumsuz etkilerine maruz kaldığı durumları tanımlamaktadır (Schutzendubel ve Polle, 2002). Kuraklık stresi, bitki büyümesi ve verimliliğini olumsuz etkileyen en önemli abiyotik streslerden biridir ve değişen iklim koşullarında sürdürülebilir bitkisel üretim için ciddi bir tehdit

oluşturmaktadır (Anjum vd., 2011). Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin yaprak genişlemesinde azalma, bozulmuş fotosentetik mekanizma, erken yaprak yaşlanması, kloroplast lipidlerinin oksidasyonu ve pigmentlerin ve proteinlerin yapısında değişimler gözlemlendiği bildirilmiştir (Menconi vd., 1995). Ayrıca, kuraklık bitkilerin stoma iletkenliğini, CO₂ asimilasyonunu ve verimliliğin azalmasına yol açan fotosentetik pigmentlerini ciddi şekilde engellediği (Anjum vd., 2011) ve bunun yanı sıra kuraklık stresine maruz kalan bitkiler, hücre altı yapıları stabilize etmek ve homeostazi dengelemek için prolin gibi hücrel osmolitler üretir ve biriktirir (Bian vd., 2021). Prolin, kuraklık gibi bir dizi abiyotik stresin zararlı etkilerini azaltır ve hücreleri korur (Liu ve Wang, 2020). Kısaca, bitkilerin değişen iklim koşullarına adaptasyon ve dayanıklılığını belirlemek, gelecekte ormanların değişen iklim şartlarına uygun hale getirilmesi için önemlidir (Bowditch vd., 2022).

Amaç;

Bu tez çalışması kapsamında Türkiye'nin 4 farklı bölgesi ve 9 farklı popülasyonundan elde edilen kestane popülasyonları arasındaki ve içindeki genetik çeşitlilik iki farklı moleküler markör (ISSR ve SCoT) kullanılarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra küresel iklim değişikliğine karşı bölgesel adaptasyonlarının belirlenmesi amacıyla kuraklık stresi uygulanan kestane fidanlarının fizyolojik ve biyokimyasal ölçümleri gerçekleştirilerek kuraklığa adaptasyon potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal veriler değerlendirilerek ileride yapılacak koruma genetiği ve ıslah çalışmaları için kuraklığa adaptasyon potansiyeli yüksek kestane popülasyonlarının seçilebilmesi için önerilerde bulunulmuştur. Literatürde *C.sativa* için SCoT belirteçleri ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır bu kapsamda çalışmamız literatürde ilktir. Bu çalışma ISSR ve SCoT belirteçlerinin birlikte kullanılarak genetik akrabalıklarının belirlenmesi ve kuraklık stresinin oluşturduğu fizyolojik sürecin değerlendirilmesi yönünden yapılan ilk çalışmadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. KESTANE

Sınıflandırma bilimi olarak bilinen taksonomi, her canlının biyolojik olarak sınıflandırılmasını sağlayan kuralların bütünüdür. Bu çalışma kapsamında kullanılan kestane taksonomisi; *spermatophyta* (tohumlu bitkiler) bölümünde, *angiospermae* (kapalı tohumlu bitkiler) alt bölümünde, *dicotyledoneae* (çift çenekli bitkiler) sınıfında, *fagales* takımında ve *fagaceae* (kayingiller) familyasında, *castanea* cinsinde ve *castanea sativa* Mill. (Anadolu kestanesi) türünde bulunmaktadır (Davis, 1970).

Genel olarak tatlı kestane, asidik, derin ve iyi drene edilmiş toprakları tercih eden sıcak-ılıman bir tür olarak tanımlanabilir (Conedera vd., 2004). Kestane, daha sıcak iklime sahip bölgelerde, kuzey ve kuzeydoğu cephelerinde, nemli vadilerde ve daha yüksek rakımlarda güneşli ve sıcak bölgelerde doğal olarak bulunur (Poljak vd., 2022). Nemli ve soğuk ovalarda, günlük ve yıllık sıcaklıklarda büyük farklılıkların olduğu yüksek dağlık bölgelerde yetişmez (Medak vd., 2009). Kestane, doğal yayılış alanında, iklim ve enlemlere bağlı olarak 200 m'den 1800 m'ye kadar farklı yüksekliklerde ve yıllık yağışın 750 ila 1200 mm arasında değiştiği ve yıllık ortalama sıcaklığın 8° ila 15 °C arasında olduğu bölgelerde yetişmektedir (Anić,1942; Poljak vd., 2022).

Kestane, doğal olarak Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'nın bazı bölgelerinde yetişmektedir. Kestane ağaçları, Hazar Denizi'nden Atlas Okyanusu'na kadar geniş bir alanda yayılış gösterirken (Fernandez-Lopez ve Alia, 2003) en geniş yayılış alanlarının Fransa, İsviçre, İtalya ve Türkiye'de olduğu bilinmektedir (Markovski vd., 2014). Ayrıca Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Güney Batı ve Doğu Asya ile Kuzey Amerika'da çeşitli kestane türleri yayılış göstermektedir (Erdem, 1951; Yaltrık, 1993). Anadolu kestanesi Avrupa ve Güneybatı Asya'da yaygındır. Anadolu, kestanenin orijin aldığı ve ilk yetiştirildiği yerlerden biridir (Soylu, 2004). Kestanenin gen merkezlerinden ve kültüre alındığı en eski alanlardan birinin Anadolu olduğu da bilinmektedir (Villani vd., 1991; Aksoy vd., 2005). Türkiye, kestanenin yayılışının geniş bir bölümünü kapsayan ana dağılım alanlarından biridir. Kestane'nin Türkiye'deki yayılışı Kafkaslardan başlayarak Kuzey Anadolu boyunca Bulgaristan sınırına kadar uzanmakta, Marmara Bölgesi ve Batı Anadolu'da yayılış göstermektedir. Ayrıca Akdeniz'de Isparta ve Antalya Köprülü

Kanyon civarındaki Altunkaya (Selge) bölgesinde lokal olarak bulunmasının yanı sıra Artvin, Trabzon, Rize, Ordu, Giresun illeri kestane üretiminin yoğun olduğu yerler arasındadır (Kulaç vd., 2015). Bunun yanı sıra kestane ağaçları, Marmara Bölgesi ve Ege Bölgesi Bölgesi'nde bulunan ormanlık alanlarda ve dağlık bölgelerde yaygındır (Kulaç vd., 2018). Diğer yandan kestane 500-600 m yükseltilere kadar diğer ağaç türleri ile karışık veya tarımsal ürünlerle iç içe bulunmaktadır (Turna, 2013; Anonim, 2013). Marmara Bölgesi'nde ise Bursa, Yalova ve Balıkesir gibi illerde de kestane üretimi yaygınken, özellikle Bursa, Türkiye'deki kestane üretiminin büyük bir bölümünü karşılamaktadır (Turna, 2013). Ege Bölgesi'nde Aydın, Manisa, İzmir gibi iller kestane üretimi için önemli bölgelerdir ve bu bölgelerdeki iklim ve toprak koşulları, kaliteli kestane yetiştirmek için uygun ortam sağlamaktadır (Kaplan vd., 2017). Bu yönüyle ülkemiz dünyanın en büyük kestane üreticilerinden biri konumundadır (Yaltırık, 1993; Atasoy ve Altıngöz, 2011).

2.1.1. Genel Özellikleri

Kestane yaprakları 8-16 cm uzunluğunda, kenarları dişli ve koyu yeşil renkli olan genellikle 20-35 metre yüksekliğe kadar büyüyen ve yaprak döken bir ağaç türüdür (Soylu, 2004). Kestane ağacının çiçekleri, ilkbaharın başlarında uzun salkımlar halinde açar ve erkek çiçekler salkımın üstünde, dişi çiçekler ise alt kısımda yer alır. Kestane ağacının meyvesi, yuvarlak veya yuvarlağa yakın, dış yüzeyi sert, tüylü, içi beyaz ve düz bir kapağı olan bir kabuklu yemiştir (Manetti vd., 2001). Kabuğun altındaki etli kısım tatlı, nişastalı ve yüksek miktarda karbonhidrat içerir (Manetti vd., 2001; Aksoy vd., 2005). Kestane, koyu kahverengi kabuklu gövdesi kalın ve çatallı olan kestane ağacının odunu sert ve dayanıklı olmasının yanı sıra nispeten hafiftir (Pereira, vd., 2011; Dinis vd., 2011). Bu nedenle mobilya ve diğer ahşap ürünlerin yapımında kullanılabilir (Bellat vd., 2019). Ayrıca kestane ağaçlarının altında yetişen yenilebilir mantarların varlığı tespit edilmiştir (Baptista vd.,2010). Kestane ağaçlarının dünyada yaklaşık on üç türü olduğu bilinmektedir (Rutter vd., 1990). Bunlardan Anadolu kestanesi (*C. sativa* Mill.), Amerikan kestanesi (*C. dentata* Borkh.), Çin kestanesi (*C. mollissima* Bl.) ve Japon kestanesi (*C. crenata* Sieb. Zucc.) türleri ekonomik değeri olan ve kültürü yapılan kestane türleridir (Soylu, 1984; Rutter vd., 1990). 1768 yılında Miller tarafından *C. sativa* Mill. olarak adlandırılan (Davis, 1970) kestane türü, Anadolu veya Avrupa kestanesi olarak bilinen türün Türkiye'de doğal olarak bulunduğu bilinmektedir (Kayacık, 1981). Mevcut en son raporlara göre, miktar olarak dünyanın ana kestane üreticileri Çin (%77),

İspanya (%8), Türkiye (%3), Kore Cumhuriyeti (%2), İtalya (%2) ve Portekiz'dir (%1) (Henriques ve Borges, 2017). Ayrıca Çin, Türkiye ve İspanya, dünya çapında en yüksek verimliliğe sahip ülkelerdir ($>5 \text{ t ha}^{-1}$) (Freitas vd., 2021).

2.1.2. Kestanenin Önemi

Kestane ağacı, çeşitli tarım ve orman ürünleri ile ilişkili, çok işlevli olması bakımından büyük ilgi gören bir türdür (Santos vd., 2022). *C. sativa*, çok amaçlı kullanımlar için önemli potansiyele sahip ağaç türlerinin başında gelmektedir (Anonim, 2013). Kestane içeriğinde nişasta, şeker ve protein gibi insan beslenmesinde gerekli olan besin maddelerini içerdiğinden *ağaç ekmeği* olarak bilinir (Suna vd., 2021).

Kestane içerdiği besin maddeleri açısından insan diyetinde yer alan önemli bir besin takviyesidir ve kısa ya da uzun süreli enerji için gerekli olan karbohidratları içerir (Vasconcelos vd., 2010; Esposito vd., 2019). Kestane meyvesi vitamin (Askorbik asit, B1, B2, B3, B6 ve E) ve mineraller (K, Fe, Mg, Ca, Mn, P, Na, Zn) bakımından zengindir ve nispeten düşük doymamış yağ asitleri (oleik, linoleik ve palmitik asitler) içerir (Korel ve Balaban, 2009; Pinto vd. 2017; Başer vd., 2018). Bunun yanı sıra, iyi biyo-aktivite gösteren antioksidan özelliğe sahip doğal fenolikler ve flavonoidler içerir (Velioğlu vd., 1998; Yang vd., 2015; Gonçaves vd., 2012). Anadolu kestanesi dünyanın en önemli meyvelerinden biridir ve Avrupa Akdeniz ülkelerinde gelenekseldir (Ciucure vd., 2022). Kestane meyvesinin ayrıca bağırsak fonksiyonlarında da olumlu rolü vardır (Silva vd., 2016). Bunun yanı sıra kestane; meyve, odun ve tanen üretimi ile dolaylı olarak bal üretimi ile ilişkili ekonomik değeri ve aynı zamanda kültürel değeri nedeniyle Avrupa'da önemli bir kaynaktır (Ertan vd., 2015). Kestane ağaçlarında bulunan mineral içeriği genotip ve iklim koşullarının yanı sıra kestane ağaçlarının yetiştiği toprağın mineral bileşimi ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir (Vasconcelos vd., 2010). Kestane üretimi, kestane ağaçlarının kapladığı alan ve verimliliği gibi son yıllarda dünya çapında artmaktadır. Bu artan ilgi, büyük ölçüde kestanenin besleyici nitelikleri ve potansiyel sağlık için faydalarından kaynaklanmaktadır (Ertan vd., 2015).

2.2. BİTKİLERDE GENETİK ÇEŞİTLİLİK

Çevresel değişim, süreklilik içeren bir süreçtir ve popülasyonların bu değişime uyum sağlayarak evrimleşmesi için genetik çeşitlilik gereklidir (Frankham vd., 2002). Genetik bilimi, popülasyonları tanımlamak, popülasyon yapısını belirleyerek taksonomik belirsizlikleri çözmek, türler içindeki akrabalık ilişkilerini tanımlamak için geliştirilmiş, son derece önemli bir alandır. Genler, bir DNA molekülünün belirli bir bölümündeki (lokus) nükleotid dizileridir. Genetik çeşitlilik, doğal seçim yoluyla evrim için temel bilgileri sağlar (Fisher,1930). Bu nedenle bir türün popülasyonları içinde ve arasında korunması, gelecekteki çevresel değişikliklere uyum sağlama potansiyelini korumak için gereklidir (Eriksson vd.,1993). Genetik çeşitlilik, bitki popülasyonunun en iyi nasıl kullanılacağı hakkında yeterli bilgi sağlaması ve mahsulün genetik kaynaklarının verimli yönetimi gibi uygulamalar için temel ilgi alanıdır (Al-Hadeithi ve Jasim, 2021). Mahsul kaynaklarının genetik olarak iyileştirilmesi, yabancı akrabaların, geleneksel çeşitlerin ve modern ıslah tekniklerinin sürekli karışımına bağlıdır. Bu süreçlerin tümü, dayanıklı, yüksek verimli çeşitlerin seçilmesi için bir düzeyde çeşitliliğin değerlendirilmesini gerektirir (Turna, 2013). Popülasyonların çevresel değişimle başa çıkabilmesi genetik çeşitlilik gereklidir ve genetik çeşitliliğin kaybı genellikle azalan üreme yeteneği ile ilişkilendirilir (Frankham vd., 2002). Germplazm (tohumda bulunup kalıtsal özellikler ileten madde) kaynaklarının genetik varyasyonunu ve genetik ilişkisini anlamak bu anlamda önemlidir. Popülasyonlar içindeki ve arasındaki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi DNA analizi gibi çeşitli laboratuvar tabanlı teknikler kullanılarak rutin olarak moleküler düzeyde gerçekleştirilir (Frankham vd., 2002).

2.2.1. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Moleküler İşaretleyicilerin Kullanımı

Türleri koruma ihtiyacı, insan eylemlerinin doğrudan veya dolaylı bir sonucu olarak biyolojik çeşitliliğinin hızla tükenmesinden kaynaklanmaktadır. Pek çok tür hayatta kalabilmek için insan müdahalesine ihtiyaç duymaktadır. *Uluslararası Doğa Koruma Birliği* verilerine göre memelilerin %26'sı, kuşların %13'ü, amfibilerin %42'si ve açık tohumluların %40'ı tehdit altında olarak sınıflandırılmıştır. Diğer gruplarda da benzer sorunlar vardır. Ancak bunlar için güvenilir istatistikler sağlamak üzere değerlendirilen tür sayısı yetersizdir. Koruma genetiği, popülasyon ve türlerin yok olma riskini anlamak ve azaltmak için genetiğin uygulanmasıdır. Nadirlik, tehlike ve yok oluşa neden olan genetik faktörler (akraba evliliği ve genetik çeşitlilik kaybı), bu etkileri en aza indirmek

için genetik yönetim ve tehdit altındaki türlerdeki taksonomik belirsizlikleri çözmeye, biyolojilerini anlamaya ve yaban hayatı adli tıpına yardımcı olmak için genetik belirteçlerin kullanımı ile ilgilenmektedir (Frankham vd., 2002).

Genetik belirteçler, bireyler arasında ayırım yapmaya yardımcı olan belirli bir özellik veya gen(ler) ile bağlantılı belirleyici ya da işaretlerdir (Grover ve Sharma 2016). *Polimeraz Zincir Reaksiyonu*, (*PCR*) tekniğini kullanılarak, *in vitro* moleküler markör (belirteç) genetik materyalden çoğaltılır ve kullanılan markör tipine göre çeşitli ağırlıklarda amplifiye olan DNA dizilerindeki polimorfizmleri teşhis etmeye izin verir. Elde edilen veriler, fenotipik olarak benzer ancak genetik olarak farklı olan bireyler arasındaki açık genetik farklılaşmayı gösterebilir (Al-Hadeithi vd., 2021). Ayrıca, bu belirteçler, farklı genotipler arasındaki genetik varyasyonları (varsa) izlemek ve filogenilerini tasvir etmek için de kullanılmaktadır (Avisé, 2012).

Farklı belirteçler, farklı genetik niteliklere sahiptir (Mondini vd., 2009). Ancak ideal bir moleküler belirteç; polimorfik olmalı ve genom boyunca eşit olarak dağılmalıdır. Bununla birlikte genetik farklılıkların yeterli çözünürlüğünü sağlamasının yanı sıra çoklu, bağımsız ve güvenilir belirteçler üretmelidir. Diğer yandan basit, hızlı ve ucuz olmalıdır; az miktarda doku ve DNA örneğine ihtiyaç duymalıdır; farklı fenotiplere bağlantılı olmalıdır ve bir organizmanın genomu hakkında önceden bilgi gerektirmemelidir. Ancak, günümüzde bu özelliklerin hepsine aynı anda sahip hiçbir moleküler belirteç bulunmamaktadır (Mondini vd., 2009). Genetik bilimindeki son gelişmeler, çeşitli bitki türlerinde birçok yeni moleküler markörün geliştirilmesine olanak sunmaktadır. Ayrıca bu belirteçler artık genetik çeşitlilik analizi, popülasyon genetiği, genomik kaynakların karakterizasyonu, geliştirilmiş kültür tanımlaması, filogenetik ilişkilendirme ve agronomik öneme sahip genlerin tanımlanması için rutin olarak kullanılmaktadır (Al-Hadeithi ve Jasim 2021). ISSR ve SCoT moleküler belirteçleri, germplazmın genotipini daha iyi ayırt edebilen ve germplazm kaynaklarının genetik arka planının ortaya çıkarılmasında önemli rol oynayan gen lokus bilgisi elde etmek için DNA'dan amplifiye edilir (Yılmaz ve Çiftçi, 2021). Genel olarak markörlerin işaretleme etkinliği farklı türlerde farklılık göstermektedir (Zhao vd., 2021).

2.2.1.1. ISSR Markörleri

Moleküler markör metotları içerisinde PCR'a dayalı mikrosatellitleri de içine alan basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (ISSR) tekniği dizi bilgisi gerektirmemesi, basit primer

dizaynı yapılabilmesi ve hızlı kullanımı sayesinde sıklıkla tercih edilmektedir (Joshi vd., 2000). ISSR belirteçleri, Meyer vd. (1993) tarafından genellikle her iki uçta sabitlenen uzun bir mikro uydu dizisi olan tek bir primerin kullanımını içerir. İki özdeş ve zıt yönlü mikro uydu bölgesi tarafından kuşatılan DNA dizisi amplifiye edilir. Bu belirteçler geniş ölçüde polimorfik ve spesifiktir. Doğaları gereği ağırlıklı olarak çok lokusludur ve genomda çok sayıda lokus üretebilirler (Choudhury vd., 2022). İkili, üçlü, dörtlü ve beşli tekrarlanan nükleotitlere sahip yapıdaki primerleri kullanır ve basit mikrosatellit arası bölgeleri çoğaltmayı hedeflerler (Borner ve Branchard, 2001). ISSR tekniğinde kullanılan primerler DNA'nın 3' veya 5' uçlarındaki son kısımlarda mikrosatellit bölgelerine uzanan 1–4 dejenere nükleotit içermektedir. Bu lokusların uzunlukları 15-30 nükleotit arasında değişmekte ve çoğaltılan ürünler genelde 200–2000bp uzunlukta. Bununla birlikte, ISSR primerlerinde yüksek GC oranı yüksek bağlanma sıcaklığına sebep olmakta ve bu sayede daha kararlı bağlanma sağlanmaktadır (Filiz ve Koç, 2011). Bu nedenle her bir ISSR primerinin kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklığı, içinde bulunan baz çeşidi ve miktarına göre belirlenmektedir. ISSR'lar dominant markörlerdir fakat bazı durumlarda kodominant ayrıldığı da görülmüştür. Bu sayede homozigot ve heterozigotu ayırabilmektedir (Reddy vd., 2002). ISSR tekniğinde polimorfizm seviyesinin fazla olması genetik benzerlik, gen haritalama ve taksonomi çalışmalarında tercih edilmesinin yanı sıra, pek çok bitki türü için filogenetik çalışmalarda; popülasyon içi-popülasyonlar arası/tür içi-türler arası genetik varyasyon çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmesini sağlamaktadır (Zietkiewicz vd., 1994).

2.2.1.2. SCoT Markörleri

Başlangıç hedefli kodon (SCoT) belirteçleri, Collard ve Mackill (2009) tarafından ve esas olarak bitki genomundaki korunmuş bölgelerden geliştirilmiş, ATG başlangıç kodonunun ortaya çıkmasıyla sınırlandırılan belirteçlerdir. Ayrıca spesifik bir fonksiyonel gen ile ilişkili kopyalanmış bölgelere dayanabilir (Kumar vd., 2009). Nispeten yeni olarak kabul edilmekle birlikte daha iyi yeniden üretilebilirliğe ve polimorfizmi tespit etmede daha fazla yeterliliğe sahiptir. Zamanla, bu belirteç muazzam bir popülerlik kazanarak (Bhattacharyya vd., 2013) RAPD ve ISSR tekniklerinden üstün kabul edilmiştir (Choudhury vd., 2022). SCoT tekniği, genlerin ekson, intron veya promotör bölgelerinden, gen fonksiyonları ile doğrudan ilişkili olabilecek polimorfizmleri üreten gen hedefli dominant işaretleyicilerdir (Yadav ve Malik, 2016). Ancak, bazı istisnai durumlarda ekleme-delesyon mutasyonları nedeniyle kodominant ayrıldığı görülmüştür

(Collard ve Mackill, 2009). SCoT, PCR tabanlı bir moleküler belirteçtir ve 18 nükleotidlik primer uzunluğu, yüksek GC içeriği (%50-72) ve ~50°C'lik yüksek bağlanma sıcaklığı nedeniyle yüksek oranda tekrarlanabilir (Collard ve Mackill, 2009). Ayrıca rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD) markör sistemlerindeki gibi primer tasarımı için önceden genomik sekans bilgisine gerek yoktur ve elde edilen PCR ürünleri, standart agaroz jel elektroforezi ile kolayca görselleştirilir. Bu nedenle, bu belirteç, çeşitli bitki türü gruplarında yararlı olabileceği düşünülmektedir (Rai, 2023). SCoT markörleri, yüksek polimorfik doğası nedeniyle, gen düzeyinde çeşitliliği ortaya çıkarır ve belirli bir özellikte bağlantılıdır. SCoT markörleri rastgele kodlanan veya kodlamayan bölgeler yerine, direkt genin kendisinden türeyen ve belirli bir özellikte bağlantılı işaretçiler üretir. Bu nedenle RAPD veya ISSR gibi diğer işaretçilerine kıyasla fazla bilgilendiricidir (Collard ve Mackill, 2009; Chhajer vd., 2017). Aynı zamanda genetik ve genomik çalışmalarda ve farklı bitki grupları için mahsul iyileştirme programlarında avantajlıdır (Rai, 2023).

2.3. İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNİN BİTKİLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

İklim, biyoçeşitlilik ve ekosistem değişikliğinin ana itici güçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Gezegenimizdeki yaşam, esas olarak doğal sera etkisi sürecine bağlıdır. Bu atmosferik sera etkisi, dünya atmosferindeki gazların güneşin ısını tutmasıyla meydana gelen bir süreçtir. Sera etkisi, dünyayı yaşamak için rahat bir yer yapan şeylerden biridir. Ancak kentleşme, hızlı sanayileşme, ormansızlaşma, tarımsal atıkların yakılması, biyolojik olarak parçalanamayan ürünlerin aşırı kullanımı vb. gibi artan insan faaliyetleri nedeniyle sürekli değişen iklim koşulları çevre için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Ayrıca endüstrilerden, fabrikalardan, ekipmanlardan ve araçlardan salınan zehirli gazlar da iklim değişikliğinde önemli bir rol oynamaktadır (Chaudhry ve Sidhu, 2022). İklim değişikliği bitkilerin morfolojik, gelişimsel, hücresel ve moleküler süreçlerini olumsuz etkilemektedir (Chaudhry ve Sidhu, 2022). Zaman içinde mahsul verimi ile gıda arzı için ciddi bir tehdit oluşturan abiyotik stres kombinasyonlarının sıklığının ve yoğunluğunun artacağı öngörülmektedir (Pachauri vd., 2014). Kestane ekosistemleri iklim değişikliği, geleneksel meyve bahçelerinin terk edilmesi, orman yangını ve artan haşere ve hastalık insidansı gibi farklı stres faktörleri (doğal veya antropojenik) tarafından tehdit edilmektedir (Bellat vd., 2019).

2.3.1. Kuraklık Stresi

Kuraklık, düşük atmosferik nem ve yüksek hava sıcaklığına sahip ortamı olarak tanımlanır (Kim vd., 2019). Kuraklığa maruz kalan bitkiler, kuraklıktan kaçınma, koşullara adaptasyon sağlama ya da kuraklığa tolerans gibi farklı stratejilerle kendilerini su eksikliğine karşı dirençli hale gelir (Sargıncı ve Beyazyüz, 2022). Çoğu durumda, bitkiler bu stratejilerden birkaçını birleştirir (Chaves vd., 2003; Ansari vd., 2017). Araştırmacılar, bitkilerin büyüme hızlarındaki ve diğer bazı özelliklerindeki (fenolojik, morfolojik, anatomi ve kimyasal bileşim) farklılıkların, farklı yerel iklim koşulları ve bitki uyum kapasitesi ile ilişkilendirmiştir (Dinis vd., 2011; Freitas vd., 2021). Bitkiler kuraklıkla başa çıkmak için kuraklığa tolerans (dayanıklılık) ya da adaptasyon (uyum sağlama) geliştirirler (Kooyers 2015). Kuraklık toleransı, bitkilerin adaptif özellikler yoluyla düşük doku suyu içeriğine dayanma yeteneğidir. Bu adaptif özellikler, ozmotik ayarlama ve hücresel elastikiyet yoluyla hücre turgorunun korunmasını ve artan protoplazmik direncini içermektedir (Morgan, 1984). Kuraklığa adaptasyon ise hem hücresel hem de moleküler seviyelerde fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin koordinasyonunun sonucudur. Bu değişimler, ozmotik ayarlamayı ve daha sert hücre duvarlarını içerebilir. Bunun yanı sıra, kuraklık stresi bitkilerin fotosentetik ve savunma mekanizmalarını etkiler ve fotosentez, solunum, translokasyon, iyon alımı, karbohidratlar, besin metabolizması ve büyüme destekleyicileri gibi birçok reaksiyonu tetikleyerek bitki büyümesini geciktirir (Jaleel vd., 2008). Kuraklığa tolerans yoluyla adaptasyon, temel olarak morfo-fizyolojik değişiklikleri içermektedir (Yordanov vd., 2000; Basu vd., 2016).

2.3.1.1. Kuraklık stresinin bitkinin fizyolojik özellikler üzerindeki etkileri

Kuraklık stresi altında bitkilerin sürekli büyümesinden sorumlu fizyolojik parametrelerin; bağıl su içeriği, elektrolit sızıntısı, su kullanım etkinliği (SKE), stoma iletkenliği, fotosentez, terleme, klorofil yaprak flüoresansı ve klorofil renk indeksindeki değişim olduğu çalışmalarla kanıtlanmıştır (Anyia ve Herzog, 2004; Bahadur vd., 2011). Bu fizyolojik parametreler bitki türüne ve bunların kuraklık stresine dayanma yeteneklerine bağlıdır. Su kıtlığına yanıt olarak, kuraklığa duyarlı ve kuraklığa dayanıklı bitkiler, farklı stoma hareketleri sergilerler (Pinheiro vd., 2011). Stoma iletkenliğinin elektron taşıma hızı, SKE, solunum, terleme ve CO₂ difüzyonu gibi birçok fizyolojik parametre ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Ansari vd., 2019). Su potansiyeli düştükten sonra bile kuraklığa duyarlı zirai bitkilerin korunan stoma iletkenliği ve karbon asimilasyonu rapor

edilmiştir (Pinheiro vd., 2011). Stoma gözeneklerinden buharlaşma (terleme) yoluyla %95'in üzerinde su kaybı meydana gelir. Bu durumda bitkinin aldığı toplam CO₂ miktarı ile bitkiden çıkan su miktarının stoma gözenekleri yoluyla dengelenebilmesi önemlidir (Shimazaki vd., 2007). Öte yandan kuraklık stresi nedeniyle stomaların kapanması, çevre ile yaprak içi arasındaki gaz alışverişinde bir kısıtlamaya neden olur. Stoma kapanması fotosentez için bir kısıtlama olsa da su kaybını önlemede etkili bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Ansari vd., 2019; Koç, 2021a,b). Kuraklık stresinin hem yaprak alanını hem de birim yaprak alanı başına fotosentez oranını düşürerek fotosentezi azalttığı bilinmektedir (Basu vd., 2016). Kuraklık stresine bağlı olarak stomaların kapanması fotosentez oranının da azalmasına neden olmaktadır (Tezara,1999). Bitkilerin fizyolojik adaptasyon mekanizmalarından biri olan terlemede azalma ve buna bağlı olarak yaprak sıcaklığındaki artış kuraklık stresinin bir sonucudur (Koç ve Nzokou, 2022a). Stoma tarafından düzenlenen terlemede azalma, bitkilerin kuraklık stresine karşı genel bir tepkisidir ve bu da bitki su kullanım verimliliğini artırmaya destek olur (Bahadur vd., 2011). Diğer yandan; su, bitki büyüme ve gelişiminin her aşamasında gerekli olan vazgeçilmez bir faktördür. Yaprak su içeriği, bitki homeostazının önemli bir göstergesidir ve bitki dokularında bulunan nispi su miktarını gösterir. *Bağıl Su İçeriği (BSİ)* olarak adlandırılan, dokunun tutabileceği maksimum su miktarını belirleyen bu ölçüm, doku taze veya kuru ağırlık bazında ifade edilen su içeriği ölçümünü ortaya çıkarmıştır (Boyer, 1968). Bağıl su içeriği, hücre sel su eksikliğinin fizyolojik sonuçları açısından bitki su durumunun en uygun ölçülerinden biridir. Grover vd (2004), bitkilerde abiyotik stres gelişiminin hemen ardından BSİ'de düşüş ve su ilişkilerinde azalma olduğunu belirtmiştir. Streslerden, özellikle kuraklık stresinden olumsuz etkilenen bağıl su içeriği, kuraklık stresinin hafifletilmesi altında bitkilerin elde ettiği su potansiyeline kıyasla su durumunun daha iyi bir göstergesi olarak kabul edilir (Payam, 2011). Birçok rapor, su eksikliğinin BSİ'de azalmaya neden olduğunu göstermektedir (Sanchez vd., 2006; Sanchez vd., 2010; Rai vd., 2015). Kuraklık stresi nedeniyle yaprakların BSİ ve su potansiyelinde azalma, CO₂ asimilasyonunu, fotosentez hızını ve stoma iletkenliğini azalttığı bildirilmiştir (Flexas vd.,2008).

2.3.1.2. Kuraklık stresinin biyokimyasal özellikler üzerindeki etkileri

Kuraklık stresi, bitkiler üzerinde çeşitli biyokimyasal değişikliklere neden olan önemli bir çevresel faktördür. Bu stres koşulları altında bitkiler, hayatta kalabilmek ve normal işlevlerini sürdürebilmek için çeşitli adaptasyon mekanizmalarını devreye sokarlar (Chen

vd., 2007). Bu bağlamda bitkiler streslere maruz kaldıklarında prolin, glikoz, sükröz gibi osmotik aktif bileşiklerin üretimini artırarak, hücre içinde suyun tutulmasını sağlar ve böylece su kaybını sınırlayarak ve hücrel turgoru korumak için osmotik dengede bazı değişiklikler yapmış olurlar (Delauney ve Verma, 1993). Ayrıca, özellikle kuraklık stresin koşullarında bitkilerde prolin üretimi artar (Chen vd., 2007).

Hücreler arası CO₂ konsantrasyonunun azaldığı kuraklık stresi durumunda bitkide devam eden fotosentetik ışık reaksiyonları, moleküler oksijeni potansiyel olarak azaltılmış fotosentetik elektron taşıma bileşenlerinin birikmesine ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olur (Lawlor, 2002). Kuraklık stresi, ROS'un artmasına ve böylece hücre bileşenlerine zarar vererek oksidatif stresin oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle, bitkiler stres koşullarında antioksidan savunma mekanizmalarını harekete geçirerek, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla ROS üretimini dengelemeye ve zararlı etkilerini azaltmaya eğilimindedirler (Hossain vd., 2014; Wang vd., 2018). Prolin, stres altında hücrel yapıları ve işlevlerini korumak için çeşitli mekanizmalara katkıda bulunurken, ROS ile de bağlantılı bir rol oynar (Ansari, 2019). Bu bağlamda, kuraklık gibi stres koşullarda prolin, hücrelerin ROS üretimini azaltarak oksidatif stresin önlenmesine ve hücrelerin zarar görmesini engellenmeye yardımcı olur (Ansari, 2019). Böylece, hücrelerin ROS düzeylerinin dengelemesi ve oksidatif stresin azaltması sağlanır (Hossain vd., 2014; Wang vd., 2018; Wahab vd., 2022). Özetle, önemli bir amino asit olan prolinin, abiyotik stres koşullarında bitkilerin metabolizmasını ve büyümesini sürdürmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Prolin birikimi ile bitkilerin çeşitli abiyotik streslere karşı toleransı arasında pozitif bir ilişki vardır (Ghosh vd., 2022). Kuraklığın çok sayıda bitkide prolin birikimine neden olduğunu gösteren çeşitli araştırmalar mevcuttur (Yamada vd., 2005; Vendruscolo vd., 2007; Mohammadkhani ve Heidari, 2008; Oufir vd., 2009; El-Beltagi vd., 2020).

2.4. KESTANENİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ VE STRES TOLERANSI İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÖZETİ

Morfolojik ve ekolojik özellikler, vejetatif ve üreme alışkanlıkları, meyve büyüklüğü, odun özellikleri, adaptasyon kabiliyeti ve biyotik ve abiyotik streslere karşı direnç türler arasında değişkenlik gösterir. Literatürde, *Castanea* türlerinin farklı belirteçleri ile genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde tutarlı kümelenme modelleri bulunamadığı bildirilmiştir (Abdelhamid vd., 2014). Sawano vd. (1984) tarafından *Castanea* türleri

arasındaki genetik ilişki Japon, Çin, Japon-Çin melezi ve Avrupa kestanesi arasında 3 enzim sistemi kullanarak türe özgü belirteçler yer aldığı bildirilmiştir. Ayrıca, *C. sativa*'nın *Castanea* cinsindeki türler arasında en düşük genetik çeşitlilik seviyesine sahip olduğu da öne sürülmüştür (Villani vd., 1991; Huang vd., 1998; Huang vd., 1994). Bunun yanı sıra, *C. sativa* ekotiplerinin genel olarak yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğunu rapor eden çeşitli çalışmalar mevcuttur (Villani vd., 1991; Pereira- lorenzo vd., 2010; Cuestas vd., 2017; Poljak vd., 2017; Alessandri vd., 2020; Bouffartigue vd., 2020). Ayrıca Dinis vd. (2011) ve Pereira-Lorenzo vd. (2010), SSR belirteçleri kullanarak kestane bahçelerindeki çeşitliliğin büyük ölçüde hibridizasyondan ve ayrı ayrı mutasyonlardan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Mattioni vd. (2013), beş Avrupa ülkesinde (İtalya, Fransa, İspanya, Yunanistan ve Birleşik Krallık) 29 alana dağılmış 68 meşcereden 1.768 *C. Sativa* bireyinin genetik yapısını belirlemek için 73 basit dizi tekrarı (ISSR) markörü kullanmıştır. Araştırmacılar doğal meşcereler, yönetilen baltalıklar ve aşılınmış meyve bahçeleri olmak üzere üç farklı yetiştirme alanından örnekler almışlardır. Meyve bahçelerinden alınan bireylerin genetik çeşitliliğinin daha yüksek olduğunu ve bunun da aşılınmış klonların fazla olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, doğal meşcereler ve baltalıklar arasındaki korelasyon analizlerinde az, ancak etkili farklılıkların bulunduğunu ve uzun vadeli yönetim tekniklerinin popülasyonların genetik yapısını etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar üçü Yunanistan'da, biri İber Yarımadası'nın kuzeybatı kıyısında ve geri kalanının büyük bir gen havuzuna sahip Akdeniz havzası olmak üzere beş farklı gen havuzunun var olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçların *C. Sativa*'nın geniş dağılım alanı boyunca göç modellerinin net ve kesin bir resmini elde etmek için yeterli olmadığını da ileri sürmüşlerdir. Bunun nedeninin de türün ana menşeye merkezlerinden biri olarak bildirilen Türkiye ve komşu Kafkasya bölgesinden örneklerin eksik olması olduğunu belirtmişlerdir (Mattioni vd., 2013).

Ciordia vd. (2012), *C. sativa*'nın %50 ve %90 substrat doygunluğu ile iki farklı su rejiminde yetiştirilmesinden sonra fenotipik ifadede farklı varyasyon modelleri ortaya çıkardığını bildirmişlerdir. Kurak koşulların hem boy hem de ağırlık açısından bitki su potansiyelini azalttığı, kök gelişiminin arttığını, yaprak alanının azaldığını ve yaprak morfolojisini değiştirdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra kestane türleri ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, aynı koşullar altında kestane büyümesi öncelikle Yunanistan'dan alınan popülasyonlarda, ardından Güney İtalya ve Güney İspanya'dan

alınan popülasyonda, en son ise Kuzey İspanya ve Kuzey İtalya'dan gelen ekotiplerde başladığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2011). Bitkilerin bu farklı tepkileri (fenolojik, morfolojik, anatomi ve kimyasal bileşim) farklı yerel iklim koşulları ve bitki uyum kapasitesi ile ilişkilendirilebilmektedir (Dinis vd., 2011).

Serdar vd. (2014), Türkiye'de kestane yanıklığına dayanıklı kestane genotipleri bulmak için yaptığı araştırmada, Karadeniz bölgesindeki Sinop, Samsun, Artvin ve Bartın illerinden seçilen 14 kestane genotipinin morfolojik ve moleküler karşılaştırmasını RAPD belirteçleri kullanarak yapmıştır. Çalışma sonucunda coğrafi olarak çok yakın bölgelerde yer alan Samsun, Bartın ve Sinop kestanelerinin genotip olarak birbirlerinden oldukça farklı olduğu bildirilmiştir.

Abdelhamid vd. (2014), İsviçre, Fransa, İtalya ve Asya çeşitlerine ait 73 *C. sativa*, *C. crenata*, *C. mollissima* türleri arasındaki ve içindeki genetik değişkenliği tespit etmek için 4 DNA markörü (RAPD, ISSR, AFLP ve SSR) kullanmışlardır. Etkili multipleks oranı, polimorfizm bilgi içeriği ve markör indeksine ilişkin bulgular, AFLP'nin bu çalışmada kullanılan en etkili moleküler markör sistemi olduğunu ortaya koymuştur. RAPD yönteminin tür ilişkileri açısından kısmi bir uyum sağlanmasına rağmen, diğer markör sistemleri incelenen türleri net olarak ayrılmamış kümeler halinde sınıflandırmıştır. Çalışma sonucunda, RAPD markör verileri diğer markörleri daha yüksek bir korelasyon göstermiştir [sırasıyla AFLP, ISSR ve SSR ile ($r = 0,69$, $P < 0,01$), ($r = 0,77$, $P < 0,01$) ve ($r = 0,47$, $P < 0,01$)]. Varyans gruplar arasında ve içinde bölündüğünde, AFLP (%94.62) gruplar içinde daha fazla varyasyon gösterirken, ters RAPD (%67.87) gruplar arasında daha fazla varyasyon sağlamıştır. Genel olarak, sonuçlar AFLP'nin kestane genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi ve dolayısıyla bu değerli ağaç türünün korunması için etkili koruma stratejilerinin geliştirilmesi için etkili bir moleküler markör sistemini temsil ettiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra RAPD (%32,13) ve ISSR (%36,73) için grup içi varyans bileşenlerinin düşük olduğunu bu da coğrafi kökene atfedilebilecek genetik arka planın genetik çeşitliliğe katkıda bulunduğunu gösterdiğini bildirmişleridir. RAPD'e kıyasla ISSR'nin daha bilgilendirici doğasına ilişkin olarak bu çalışmada sunulan sonuçlar, daha önce Casasoli vd. (2001) tarafından bildirilen bulgularla uyuşmamaktadır. Ayrıca Küme ve PCoA analizleri, İsviçre *C. sativa* grubunda benzersiz bir genetik yapı olduğunu ve en değerli çeşitlerden bazıları için genetik çeşit içi homojenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu homojenlik muhtemelen uzun zaman önce güney İsviçre'deki yerel

yetiştiriciler tarafından yapılan seleksiyon baskısından veya çeşitlerin uygun toprak ve mikro iklim koşullarına adaptasyonundan kaynaklanıyor olabilir (Abdelhamid vd., 2014). Míguez-Soto vd. (2019), *C. Sativa* türünün Kuzey İber Yarımadası ve Akdeniz olmak üzere iki gen havuzunda gruplandırılan dokuz yabancı İber kökeninin adaptif varyasyonun şekillenmesinde doğal seleksiyonun rolünü değerlendirmek ve bu türün genetik yapısının açıklayabilmek amacıyla iki döl-üreme denemesinde çeşitli adaptif özellikler açısından değerlendirmişlerdir. Yıllık bir büyüme ritmi deneyi, kuruluştan sonraki ilk 3 yıl boyunca fenoloji, büyüme, gövde formu ve hayatta kalma açısından değerlendirilmiş ve periyodik bir kuraklık stresi deneyi hem iyi sulanan hem de kuraklık stresi uygulamalarında kuru ağırlık, büyüme, hayatta kalma ve diğer ilgili kuraklık özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Her iki denemede de rapor edilen yüksek genetik değişkenlik büyük ölçüde popülasyonlar arasındaki genetik çeşitlilikten kaynaklandığı ve fenolojinin enlem ve kserotermik indeks ile korelasyonları yoluyla popülasyonlar arasında klonal bir varyasyon tespit edilmiş, orta ve güney Akdeniz popülasyonlarının kuzey popülasyonlarından daha erken fenolojiye sahip olduğu ve kuraklığın bu farklılaşmada önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kuraklık stresi uygulamasında elde edilen sonuçlar, genel anlamda kserik popülasyonların daha gelişmiş kök sistemleri ve kuzey popülasyonlarına göre daha yüksek hayatta kalma oranlarıyla kuraklığa daha fazla uyum sağladığını doğrulamıştır. Ayrıca, popülasyonlar arasında gözlemlenen genetik değişkenlik, İber yarımadası *C.sativa* popülasyonlarının hızlı adaptif evrim geçirme potansiyeline sahip olduğunu belirlemiştir.

Alcaide vd. (2022), İspanya'nın farklı iklim koşullarına sahip bölgelerindeki dört doğal *C. sativa* popülasyonundan (Bergongo, Hervás, Constantina ve Montseny) alınan 136 ağaç genotipinin EST-SSR genetik belirteçleri adaptif çeşitliliğini ve kuraklığa toleransı değerlendirmiştir. 20 EST-SSR primerinden sekiz tanesi yüksek düzeyde polimorfizm göstermiş ve genetik çeşitliliği değerlendirmek için kullanılmıştır. Beklenen heterozigotluk (0.471) ve özel alel sayısı bakımından (11) en yüksek çeşitlilik düzeyine sahip olan Bergondo (kuzey popülasyonu)'nun polimorfik özellik gösteren tek popülasyonun olduğu bildirilmiştir. Bunu yanı sıra yapılan popülasyon yapısı (STRUCTURE) analizinde iki ($K = 2$) gen havuzu tespit edildiğini ve kümeler arasında sınırlı karışım ile kuzey-güney coğrafi modeline karşılık gelen iki ana gruba ayırdığını bildirmiştir. Her kümedeki popülasyonların karışım oranı (Q) ile değerlendirilen üyelik yüzdesini kuzey popülasyonları, Bergondo ve Montseny'nin, I. kümede (sırasıyla 0,87 ve

0,69 Q değerleri) ve güney popülasyonları,Hervás ve Constantina'nın, II. kümede (sirasıyla 0,92 ve 0,80 Q değerleri) gruplandırılmıştır. Ayrıca EST-SSR belirteçlerine dayalı olarak Constantina ve Bergondo popülasyonları arasındaki net ayırım fenotipik ölçümlere dayalı olarak yaprak semptomlarında gözlenen önemli farkla uyumlu olduğu ve Constantina fideleri su yoksunluğundan sonra en düşük *yaprak solması* değerlerine sahipken, Bergondo fideleri en yüksek değerlere sahip olduğu ve *C. sativa* popülasyonunda kuraklığa yanıtta önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Kestane türleri, genetik ve fizyolojik özelliklerine bağlı olarak değişen evre koşullarına yüksek uyum sağlama yeteneğine sahiptir (Ciordia vd., 2012). Enlem ve yükseklik gibi coğrafi parametreler kestane ağacı yetiştiriciliğinde önemli rol oynamaktadır (Freitas vd.,2021).

Popülasyonların kuraklığa verdikleri tepkileri analiz etmek oldukça karmaşıktır (Casasoli vd., 2006; Alcaide vd., 2022). Kestane popülasyonları kuraklığa karşı oldukça hassastır. Doğal ekolojilerinde sulama yapılmadan yetiştirilebilmesine rağmen toprak neminin azalması, kestane ağağlarının verim ve meyve kalitesinde azalmalara ve kestane mürekkep hastalığına neden olmaktadır (Ertan vd., 2016). Kestane popülasyonları ile ilgili yapılan bir çalışmada, Yunanistan'dan alınan kestane genotipleri Güney İtalya ve Güney İspanya'dan gelenlere daha erken büyümeye başladığı ve bunları Kuzey İspanya ve Kuzey İtalya'dan gelen kestane ekotiplerinin izlediği belirlenmiştir (Zhang vd., 2011). Literatürde Türkiye'nin *C.sativa* için menşe merkezlerinden biri olduğu ve karadeniz kıyılarından akdeniz bölgesine uzanan bir kesit boyunca yayılmış doğal kestane popülasyonları arasındaki genetik, morfolojik ve fizyolojik farklılaşmanın gözlendiği bildirilmiştir (Villani vd., 1991; Villani vd., 1992; Villani vd.,1999) Bu popülasyonların genetik farklılaşması makro iklimsel değişkenlerle, özellikle yağış miktarıyla ilişkilendirilmiştir (Pigliucci vd., 1990). Lauteri vd. (2004), kuraklığı hesaplama ve karşılaştırma yöntemi olan ksertermik indeks değerinin Kuzey İspanya'daki kestane popülasyonlarının, Akdeniz havzasında bulunan popülasyonlara göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Lauteri vd. (2004), *C.sativa*'nın mezik (daha geç fenoloji, daha yüksek büyüme) ekotiplerinin elverişli iklim koşullarına güçlü bir şekilde yanıt verdiğini, kserik (erken fenoloji, yavaş büyüme, yüksek kök gelişimi, düşük SKE ve daha uzun gençlik dönemleri) ekotiplerinin ise kuraklık sonrası hasar riskini azaltmak için yavaş yanıt verdiğini bildirmiştir.

Dinis vd. (2011), artan kuraklık süresinin kestane yaprak ve meyve gelişimi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu bildirmiştir. Bunu, Pérez-Girón vd. (2020)'nin İber Yarımadası'nın iki bölgesindeki meyve bahçelerinde temel fizyolojik parametreleri karşılaştıran kuzey İspanya ve Portekiz ile güney ve orta İspanya *C.sativa* popülasyonları çalışmasından elde edilen bulgular desteklemektedir. Pérez-Girón vd. (2020) çalışmasında, *C. sativa*'nın kuzey ekosistemlerinde yıllık fotosentez oranını ve net birincil C üretimi (solunumdan sonra depolanan ve biyokütleye dönüştürülen net C) en yüksek değerlere ulaştığını ve su mevcudiyeti ve sıcaklığın bu iki parametreyi en çok etkileyen iklim değişkenleri olduğunu bildirmişlerdir. Menéndez-Miguélez vd. (2015), art arda iki aydan fazla kuraklığa maruz kalan *C. sativa* ağaçlarının büyümesinin ciddi şekilde etkilendiğini bildirmiştir. Bu bağlamda, Maurel vd. (2004), kuraklığa maruz kalan *C. Sativa*'da stoma iletkenliği, transpirasyon oranı, topraktan yaprağa hidrolik iletkenlik, yaprak ve kök biyokütlesinde azalma meydana geldiğini, ksilemdeki absisik asit (ABA) konsantrasyonunun ise arttığını ve ayrıca stoma iletkenliğinin kök kaynaklı ABA ve hidrolik sinyaller, yani kökten yapraklara bağlı özsu akışı tarafından düzenlendiğini bildirmiştir. Ciordia vd. (2012) ve Gomes-Laranjo vd. (2012), İber Yarımadası'nın Kuzey (Asturias ve Galiçya, mezik veya orta derecede nemli ortam) ve Orta/Güney (Kanarya Adaları ve Endülüs, kserik ve daha kuru ortam) olmak üzere iki bölgesinden *C. sativa* fidelerini döllerini incelemiştir. Her iki çalışmadan elde edilen sonuçlar birleştirildiğinde, kısıtlı su kaynağı, K (özellikle kserik ekotiplerde), CO₂ asimilasyon oranı (A), terleme, stoma iletkenliği ve sonuç olarak fotosentetik verimliliğin azaldığı söylenebilir. Aynı yazarlar, ilk çeşitler yeniden sulamadan sonra daha iyi toparlanma kabiliyeti gösterdiğinden dolayı kuzeydeki çeşitlerin kuraklığa karşı merkezdekilerden daha toleranslı olduğunu düşünmüşlerdir. Ayrıca literatürde doğal meşçerelerden seçilen çeşitli Avrupa kestane ekotiplerinin genomdaki farklı evrimsel baskılara karşılık gelen farklı iklimlere adaptasyon sağladığı bildirilmiştir (Fernandes vd., 2022).

Bunun yanı sıra, Martínez-Sancho vd. (2017), *C. sativa*'nın yüksek sıcaklık ve ciddi kuraklık koşulları olmadığı sürece su yoksunluğundan sonra stomaların kapanmasının kolaylıkla sağlanamayacağını bildirmiştir. Yazarlar yaptığı araştırmada, kontrollerle karşılaştırıldığında kurak fidelerin daha düşük su potansiyeline sahip olduğu, boy ve gövde çapında azalmalar meydana geldiğini ve bunun yanı sıra hidrolik iletkenlikte genel bir doğal kayıp ve muhtemel damar embolisi olduğunu, Camisón vd. (2020) kuraklığa toleranslı *C. sativa* fidelerinde (orta İspanya'dan kserik ekotip) gs'nin sifıra yakın

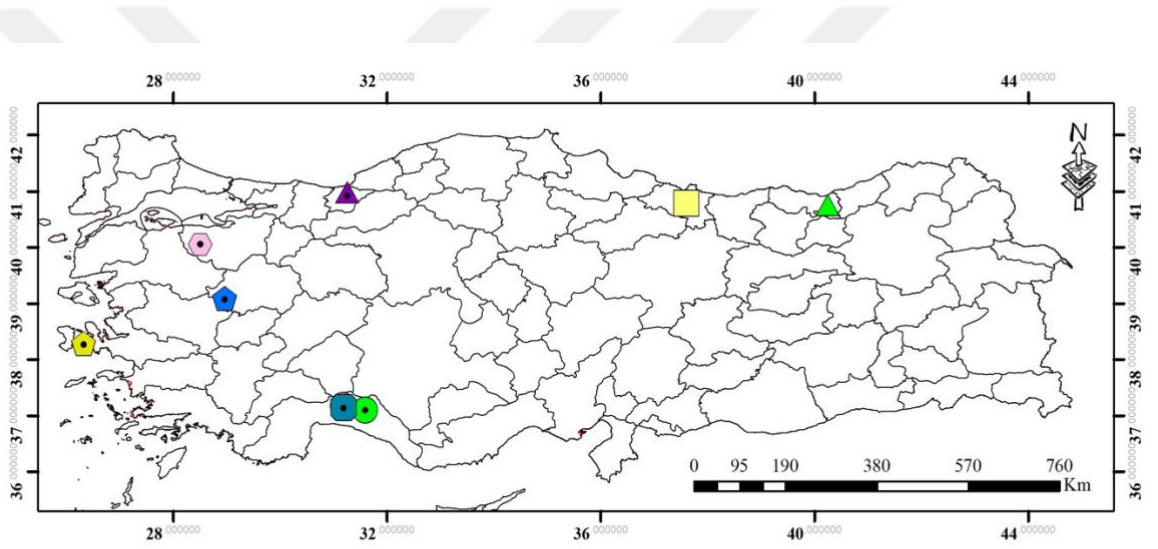
olduğunu, bağıl su içeriğinde (BSİ) azalma, boy ve ağırlık kaybı, gövde çapında artış, ara sıra düşme ile yaprak solması ve bitki geri dönüşü ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Stoma kapanması, yapraklarda Anet ve çözünebilir şeker birikiminin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Yazarlar, yaprak ve gvdelerdeki çözünebilir şeker birikiminin bitki osmoreglasyonunda bir rolü olabileceğini, yaprak biyokütlesindeki azalmaya, yaşlanan yapraklardan yeşil yapraklara azot (N) taşınması nedeniyle yapraklardaki N seviyesinde artışa neden olabileceğini bildirmiştir. Stres altındaki bitkilerde yüksek solunum seviyeleri, strese karşı koymak için çözünebilir şekerlerin metabolizmasıyla ilgili olduğunu ve aşırı olmayan kuraklık koşullarında kuraklığa toleranslı türlere atfedilebilecek toplam karbonhidrat içeriğinde veya C alığında değişiklik gzlenlmemiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞILAN POPÜLASYONLAR

Bu çalışmada Türkiye'nin dört coğrafi bölgesinin dokuz iline ait (Düzce, Trabzon, Ordu-Karadeniz bölgesi, Kütahya, İzmir- Ege bölgesi, Deli Sarnıç, İbradı, Selge- Akdeniz bölgesi, Bursa- Marmara bölgesi) doğal kestane ormanlarından yaprak örnekleri toplanarak Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında -80°C buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan kestane genotiplerinin toplandığı coğrafi bölge, il, ilçelere ait lokasyon haritası Şekil 1'de verilmiştir.



Legend

- | | | | | |
|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Antalya-Deli Sarnıç | Antalya-Selge | Düzce-Kurtsuyu | İzmir-Ovacık | Trabzon-Çaykara |
| Antalya-İbradı | Bursa-Kemalpaşa | Kütahya-Simav | Ordu-Gürgentepe | |

Şekil 1. Çalışma kapsamında yaprakları toplanan popülasyonlarına ait doğal kestane ormanlarının lokasyon haritası.

Çalışma kapsamında kullanılan kestane yapraklarının toplandığı coğrafi bölge, il, ilçelere ait iklim bilgisi ve toplanan birey sayısı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kestane popülasyonlarına ait bilgiler.

Lokasyon	İklim Tipi	Toplanan Birey Sayısı
İZMİR-Ovacık	Akdeniz İklimi	20
ANTALYA-Selge	Akdeniz İklimi	20
BURSA-Kemalpaşa	Akdeniz İklimi	20
ANTALYA- Deli Sarnıç	Akdeniz İklimi	20
ANTALYA-İbradı	Akdeniz İklimi	20
TRABZON-Çaykara	Karadeniz İklimi	20
DÜZCE-Kurtsuyu	Karadeniz İklimi	20
ORDU-Gürgentepe	Karadeniz İklimi	20
KÜTAHYA-Simav	Karasal İklim	20

3.2. MOLEKÜLER ANALİZLER İÇİN BİTKİ MATERYALİNİN TOPLANMASI

Trabzon-Çaykara, Ordu-Gürgentepe, Kütahya-Simav bölgelerinde doğal kestane ormanlarında aralarında en az 100 metre mesafe olan yirmi farklı kestane ağacından yaprak örnekleri toplanmıştır. Diğer popülasyonlar için ise Düzce Üniv. serasında bulunan Ovacık, Selge, Bursa, Deli Sarnıç, İbradı, Düzce bölgelerinden alınan tohumlardan yetiştirilen fidanlarından yaprak örnekleri kullanılmıştır. Toplanan her örnek alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta dondurulduktan sonra -80°C derin dondurucuya konulana kadar strafor içindeki kuru buzda muhafaza edilmiştir. Yaprak örnekleri deneyler için kullanılana kadar soğuk zincir bozulmadan -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.1. DNA İzolasyonu

Alınan genç bitki yapraklarından genomik DNA, Doyle ve Doyle (1990)'nun cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) metoduna göre izole edilmiştir. DNA izolasyon protokolünün uygulanması için öncelikle tampon çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Tris Çözeltisi

124,14 g Tris 750 ml distile su içinde çözdürüldükten sonra pH=8' ayarlanarak çözelti 1L olana kadar distile su eklendikten sonra otoklavda steril edilmiştir.

5M NaCl Çözeltisi

292.2 gr NaCl 700 ml distile su içinde çözdürüldükten sonra çözelti 1L 'e tamamlanmıştır.

0,25M EDTA Çözeltisi

93.06 gr. EDTA 700 ml distile su içinde çözdürülürerek pH=8'e ayarlandıktan sonra çözelti 1 L' e tamamlanmıştır.

CTAB Çözeltisi

25 ml 1M Tris çözeltisi,70 ml 5M NaCl çözeltisi ve 20 ml 0,25 M EDTA çözeltileri karıştırılarak 5 gr CTAB eklendi ve karışım iyice çözdürüldükten sonra elde edilen çözelti 200ml'e tamamlanıp pH=8'e ayarlanmıştır.

DNA izolasyon Protokolü;

1. 0.001 gr bitki örnekleri tartılarak 2.0 ml santrifüj tüpüne konulmuş ve doku homojenizatörü cihazında tüplerin içine birer bilye konularak 2 dk parçalanmıştır.
2. Tüplerin üzerine 750 ul %1 v/v CTAB+β Mercaptaetanol çözeltisi eklenerek 65°C de 30 dk inkübe edilmiştir.
3. Tüpler 12.000g×10 dk santrifüjlendikten sonra pellet aspire edilip, süpernatant yeni tüpe alınarak üzerine 5 ul RNase eklenmiştir.
4. 37°C de 15 dk inkübe edilmiştir.
5. Tüplere 750 ul Kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve tüpler hafifçe çalkanmıştır.
6. 12.000g×5 dk santrifüjlenmiştir.
7. Süpernatant yeni 1.5 ml santrifüj tüplerine alınmıştır.
8. Eski tüplerde kalan pellet üzerine 300ul CTAB+β Mercaptaetanol çözeltisi eklenerek 12.000g×5 dk santrifüjlenmiştir.
9. Santrifüjlenen tüplerin süpernatantı yeni kullanılan 1.5 ml santrifüj tüplerindeki karışıma eklenmiştir.

10. Bu tüplere 0,6 hacim izopropil alkol eklenerek tüpler hafifçe çalkalanarak pellet oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3).

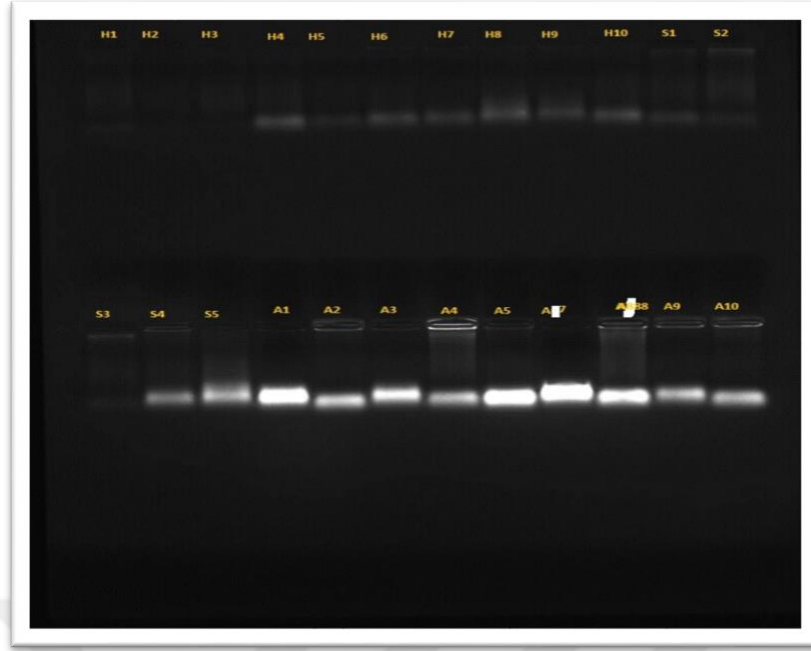


Şekil 2 DNA izolasyonunun pellet oluşum aşamasına ilişkin görüntü.

11. 15.000g×5 dk santrifüjlenmiştir.
12. Süpernatant pellete zarar gelmeden dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
13. 1 ml %70 etanol eklenerek 12.000×5 dk santrifüjlenmiştir.
14. Pellete zarar gelmeden dikkatlice etanol dökülmüş ve tüpler iyice kurutulmuştur.
15. Kuruyan pellet 200ul pcrPCR suyu içinde çözündürülerek -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA Konsantrasyon Tespiti

İzolasyon işleminden sonra temiz ve güçlü bir bant görüntüsü almak için elde edilen DNA’ların $A_{260/280}$ oranı nanodrop cihazında belirlenmiştir. Nanodrop cihazında konsantrasyonu belirlenen numuneler %8’lik agaroz jelde yürütülerek netleştirilmiştir. Bu aşamada, her bir stok DNA’dan 2 μ l alınarak 4 μ l yükleme boyası (5X loading dye) ilave edilmiş ve 1X TBE çözeltisinde 90V akımda 40dk yürütülerek görüntü alınmıştır.



Şekil 3. Agaroz jelde DNA görüntüsü örneği.

Şekil 4'te görüntüsü alınan bazı DNA örnekleri gösterilmiştir. Agaroz jel UV görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.2.3. ISSR PCR Analizleri

ISSR primerlerinin PCR analizi için optimize edilen reaksiyon miktarları Tablo 3'te verilmiştir. Çalışmada kullanılan ve Tablo 4'te baz dizilimi ve bağlanma sıcaklıklarının verilen 20 adet ISSR primeri BM Laboratuvar Sistemleri (Ankara, Türkiye)'nden temin edilmiştir. PCR analizleri Casosoli vd. (2001)'nin protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır.

Tablo 2. Çalışma için optimize edilen ISSR PCR miktarları.

dH ₂ O	Primer	DNA	Master mix	Toplam hacim
9,1 ul	2,4 ul	1ul	12,5 ul	25 ul

İzole edilen 180 (9 popülasyon×20 birey) adet kestane DNA'sı, polimorfizm seviyesi yüksek, temiz ve güçlü bantlar vererek seçilen 20 farklı ISSR primerleri ile PCR işlemine tâbi tutulmuştur. ISSR-PCR reaksiyonu; 10ng DNA, 20uM primer olmak üzere Go Taq DNA Green Master Mix (Promega) kullanılarak toplam 25uL hacimde Tablo 5'te

belirtilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. PCR işlemleri Thermo ve Sensoquest Termal Cyler PCR cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin baz dizimleri ve bağlanma sıcaklıkları.

Primer numarası	Primer kodu	Primer Dizisi (5'–3')	Tm (°C)	Referans
1	UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	Zietkiewics vd.,1994
2	UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	50	Zietkiewics vd.,1994
3	UBC 815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	52	Zietkiewics vd.,1994
4	UBC 818	CACACACACACACACAG	52	Zietkiewics vd.,1994
5	UBC 820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	52	Zietkiewics vd.,1994
6	UBC 823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52	Zietkiewics vd.,1994
7	UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	52	Zietkiewics vd.,1994
8	UBC 825	ACACACACACACACT	50	Zietkiewics vd.,1994
9	UBC 828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	50	Zietkiewics vd.,1994
10	UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52	Zietkiewics vd.,1994
11	UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52	Zietkiewics vd.,1994
12	UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	52	Zietkiewics vd.,1994
13	UBC 843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	52	Zietkiewics vd.,1994
14	UBC 844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	52	Zietkiewics vd.,1994
15	UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	52	Zietkiewics vd.,1994
16	UBC 848	CACACACACACACARG	52	Zietkiewics vd.,1994
17	UBC 852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA	52	Zietkiewics vd.,1994
18	UBC 858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	52	Zietkiewics vd.,1994
19	UBC 873	GACAGACAGACAGACA	48	Zietkiewics vd.,1994
20	UBC 879	CTTCACTTCACTTCA	38	Zietkiewics vd.,1994

R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T); D = (A, G, T); H = (A, G, T); V = (A, C, G)

Tablo 4. ISSR PCR döngü sıcaklık ve süreleri.

Ön Denaturasyon	94°C	4 dk	35 döngü
Denaturasyon	94°C	30 sn	
Bağlanma	38-52°C	1 dk	
Uzama	72°C	2 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	

3.2.4. SCoT PCR Analizleri

Çalışmada kullanılan ve Tablo 7’de baz dizilimi ve bağlanma sıcaklıkları verilen 20 adet SCoT primeri BM Laboratuvar Sistemleri (Ankara, Türkiye)’nden temin edilmiştir. PCR analizleri Collard ve Mackill (2009)’nin belirttiği protokol modifiye edilerek uygulanmıştır. SCoT primerlerinin PCR analizi için optimize edilen ürün miktarları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 5. Çalışma için optimize edilen SCoT PCR miktarları.

dH ₂ O	Primer	DNA	Master mix	Toplam hacim
9.9 ul	1.1 ul	1.5 ul	12.5 ul	25 ul

İzole edilen 180 (9 popülasyon× 20 birey) adet DNA ürünü, polimorfizm seviyesi yüksek, temiz ve güçlü bantlar vererek seçilen 20 farklı SCoT primerleri ile PCR işlemine tâbi tutulmuştur. PCR reaksiyonu; 10ng DNA, 20uM primer olmak üzere Go Taq DNA Green Master Mix (Promega) kullanılarak 25 uL toplam hacimde Tablo 6’da belirtilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. PCR aşamalarını gösteren SCoT-PCR profili Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan SCoT primerlerinin baz dizimleri ve bağlanma sıcaklıkları.

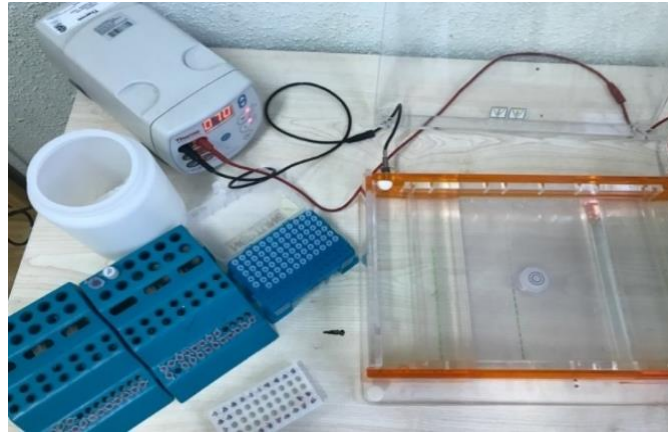
Primer numarası	Primer kodu	Primer Dizisi (5'-3')	Tm (°C)	Referans
1	1	CAACAATGGCTACCACCA	50	Collard ve Mackill, 2009
2	22	AACCATGGCTACCACCAC	56	Collard ve Mackill, 2009
3	29	CCATGGCTACCACCGGCC	72	Collard ve Mackill, 2009
4	30	CCATGGCTACCACCGGCG	72	Collard ve Mackill, 2009
5	5	CAACAATGGCTACCACGA	50	Collard ve Mackill, 2009
6	6	CAACAATGGCTACCACGC	56	Collard ve Mackill, 2009
7	7	CAACAATGGCTACCACGG	56	Collard ve Mackill, 2009
8	8	CAACAATGGCTACCACGT	50	Collard ve Mackill, 2009
9	9	CAACAATGGCTACCAGCA	50	Collard ve Mackill, 2009
10	10	CAACAATGGCTACCAGCC	56	Collard ve Mackill, 2009
11	11	AAGCAATGGCTACCACCA	50	Collard ve Mackill, 2009
12	12	ACGACATGGCGACCAACG	61	Collard ve Mackill, 2009
13	13	ACGACATGGCGACCATCG	61	Collard ve Mackill, 2009
14	31	CCATGGCTACCACCGCCT	67	Collard ve Mackill, 2009
15	33	CCATGGCTACCACCGCAG	67	Collard ve Mackill, 2009
16	16	ACCATGGCTACCACCGAC	56	Collard ve Mackill, 2009
17	34	ACCATGGCTACCACCGCA	61	Collard ve Mackill, 2009
18	18	ACCATGGCTACCACCGCC	67	Collard ve Mackill, 2009
19	19	ACCATGGCTACCACCGGC	67	Collard ve Mackill, 2009
20	20	ACCATGGCTACCACCGCG	67	Collard ve Mackill, 2009

Tablo 7. SCoT PCR döngü sıcaklık ve süreleri.

Ön Denaturasyon	94°C	4 dk	35 döngü
Denaturasyon	94°C	30 sn	
Bağlanma	50-72°C	1 dk	
Uzama	72°C	2 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	

3.2.5. Agaroz Jel Elektrofözezi

Elektrofözeze tamponu olarak TBE (Tris Borate Edta) kullanılmıştır. 10X TBE çözeltilisi hazırlamak için 108 gr Tris (Merck Millipore) ve 55 gr. Borik asit (Merck Millipore) 800 ml saf su içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözündürüp homojen hale getirildikten sonra bu karışıma 40 mL 0,5 M EDTA (pH 8.0) eklenmiştir. Tüm çözeltilinin pH değeri 8.0 olacak şekilde ayarlanmış ve çözeltili saf su ile 1L'e tamamlanmıştır. Elektrofözeze aşaması için hazırlanan 10X TBE stok çözeltilisinden 100 ml alınarak saf su ile 1L'e tamamlanarak 1X TBE olacak şekilde seyreltilmiştir. Elektrofözeze işlemi agaroz jel kullanılarak 1X TBE çözeltilisi içinde gerçekteştirilmiştir (şekil 5). Agaroz jel, 100 ml 1X TBE çözeltilisine 2 gr agaroz eklenip mikrodalga fırında toz agaroz eriyene kadar bekletilmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra 70°C'e kadar soğutulan bu karışım, içine 4 ul etidyum bromür (Sigma E1385, ABD) eklenerek yatay elektrofözeze tankına dökülmüş ve katılaştıktan sonra kuyucuklara moleküler analizlerden elde edilen PCR ürünleri yüklenmiştir. PCR ürünleri 120V'da 1-2 saat süre koşturulmuş ve her 15 dk'da bir görüntü alınmıştır.



şekil 4. Elektrofözeze görüntüsü.

Sistemin çalışması durduktan sonra UV transilluminatör cihazında DNA bantları tespit edilerek görüntü alınmıştır.

3.2.6. Moleküler Verilerin Analizi

ISSR ve SCoT belirteçleri ile çoğaltılan DNA dizilerinin profil görüntüleri değerlendirilerek; temiz, parlak olan bant varsa '1' yoksa '0' olarak ikili (binary) matrikste

dayalı olarak skorlanmıştır. Skorlanan verilerinden elde edilen toplam gözlenen alel sayısı , alel frekansları, etkili alel sayısı, dengede bir popülasyonun genetik varyasyonunu hesaplamak için kullanılabilecek matematiksel bir denklem olan Hardy-Weinberg Dengesine (HWD) uygunluk değerleri, her bir bireyin popülasyonlara atanma değerleri ile Nei (1973)'e göre genetik çeşitlilik, ve genetik uzaklık matriks değerleri, Shannon bilgi indeksi, polimorfik lokus yüzdesi (PLY), polimorfik lokus sayısı (PLS), GenAlEx6 (Peakall ve Smouse 2006) ve POPGENE v.1.32 (Yeh vd., 1999) programları kullanılarak belirlenmiştir. Değerlendirilen parametreler ve açıklamaları Tablo 9'da ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Genotipler arasındaki genetik ilişki, Mega7 paket programı ile Jaccard'ın (1908) katsayısı aracılığıyla hesaplanan, bireysel genotipler arası binary genetik mesafelere dayanarak oluşturulan ve Aritmetik Ortalama ile Ağırlıksız Çift- Grup Yöntemi (UPGMA) kullanan bir paket program olan MVSP 3.21 ile belirlenmiştir.

Tablo 8. POPGEN programına dayalı analizler ve açıklamaları.

Veri adı	Açıklaması
Gen Frekansı	Ham verilerin her lokusundaki gen frekanslarını tahmin eder.
Alel Sayısı	Sıfır olmayan frekansa sahip alellerin sayısını belirler.
Etkili Alel Sayısı	Belirli bir gen veya lokus için popülasyon içinde bulunan genetik çeşitliliği veya genetik varyasyonu ifade eder ve beklenen heterozigotluğu elde etmek için gereken eşit frekanstaki alel sayısıdır (Hartl ve Clark 1989, s.125).
Polimorfik lokuslar (PLS)	Alel frekanslarından bağımsız olarak polimorfik olan tüm lokusların yüzdesini ifade eder.
Gen Çeşitliliği	$H = \sum(1 - p_i^2 - q_i^2)/n$ formülünü kullanarak Nei'nin (1973) gen çeşitliliğini tahmin eder.
Gen Akışı	G_{ST} veya F_{ST} tahmininden gen akışını tahmin eder (Slatkin ve Barton 1989).
Shannon İndeksi	Gen çeşitliliğinin bir ölçüsü olarak Shannon'ın bilgi indeksini (Lewontin 1972) tahmin eder.
Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)	Popülasyonlar arası genetik farklılaşmayı ifade eder.

Tablo 9 (devam). POPGEN programına dayalı analizler ve açıklamaları.

Genetik Uzaklık:	Gruplar veya çoklu popülasyonlar için Nei'nin (1972) genetik kimliğini ve genetik mesafesini ve Nei'nin (1978) tahmin eder.
Dendrogram:	UPGMA kullanarak Nei'nin genetik mesafelerine dayalı bir dendrogram çizer.

Ayrıca popülasyon yapısı genetik varyantların popülasyonlar arasındaki dağılımındaki farklılıkları, üyeleri benzer varyasyon modellerini paylaşan gruplara örnekleri yerleştirerek bir Bayes yinelemeli algoritması kullanan STRUCTURE v 2.3.4. (Pritchard vd., 2000) programı ile belirlenmiştir. STRUCTURE, hem girilen verilere dayalı olarak popülasyonları tanımlamasının yanı sıra bulunan varyasyon modellerine en uygun olan popülasyonu temsil eden bireyleri bu popülasyona atar. Bu paket program, Markov Zinciri Monte Carlo (MCMC) tahminini uygulayan sistematik bir Bayes kümeleme yaklaşımı kullanır. Program her biri verilerde tanımlanan alel frekanslarının bir alt kümesiyle karakterize edilen K varsayılan popülasyon veya genetik grubun verilerine bir model uygular (Porras-Hurtado vd.,2013). Her analiz sırasında, her bir grup için bireylere, toplamı bir olan üyelik katsayıları atanır. Bireysel Q matrisi olarak adlandırılan üyelik katsayısı matrisi, analiz edilen bireylerin sayısı için satırlar ve K kümesi için sütunlar ile oluşturulur. Her popülasyon için ortalama bireysel üyelik katsayıları, popülasyon Q matrisini oluşturur (Porras-Hurtado vd., 2013). İki popülasyon arasındaki alel frekansındaki farkın bir ölçüsü olan Fixation index, sabitleme değeri, (Fst), Wright'ın F istatistiğine dayalı popülasyon yapısıyla açıklanabilecek genetik varyans miktarını ölçen bir değerdir (Wright, 1965). Bu değer iki popülasyon arasındaki alel frekansındaki farkın bir ölçüsüdür. Fst=0 değeri, alt popülasyonlar arasında farklılaşma olmadığını, her popülasyondaki alel frekanslarının benzer olduğunu, Fst=1 değeri ise alel frekanslarının farklı olduğunu yani tam farklılaşmayı gösterir (Bird vd., 2017, Luo vd., 2019). ISSR ve SCoT PCR'larından elde edilen sonuçları var (1)-yok(0) değerlerine göre STRUCTURE paket programı kullanılarak oluşturulan dosyaların internet üzerinden STRUCTURE HARVESTER uygulaması ile ΔK tablosu elde edilmektedir. ΔK (oluşan küme sayısını) değeri doğru küme sayısını belirlemeye yardımcı olur.

3.3. FİZYOLOJİK ANALİZLER

Çalışmada Akdeniz bölgesinin İbradı, Selge ve Deli Sarnıç popülasyonundan; Marmara bölgesinin Bursa popülasyonundan, Ege bölgesinin İzmir-Ovacık popülasyonundan ve Karadeniz bölgesinin Düzce popülasyonundan 30-80 cm çaplarında ve birbirlerine olan uzaklıkları 15-50 m arasında değişmekte olan 20 farklı kestane ağaçlarından alınan tohumlar Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Silvikültür ABD laboratuvarlarında +2°C olan ortamda 15 gün süreyle çıplak-soğuk katlamaya alındıktan sonra +8°C'de çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen tohumlar Orman Fakültesine ait tünel seralar içerisinde yetiştirilerek damla sulama sistemi ile haftada iki gün sulanmışlardır. Vejetasyon süresince düzenli ot bakımları yapılmıştır. Seralarda yetiştirilen kestane fidanları Nisan 2023'te replikaj yapmak üzere sökülmüş ve çıplak köklü fidanlar kök budaması yapılarak 1:1:1 oranında tarla toprağı, perlit, torf içeren 25×50 cm altı delikli polietilen tüplere konulup köklerin yeterince gelişip toprağına adapte olması beklenmiştir. Kuraklık stresi uygulaması için her bir popülasyonu temsil eden 4+1 yaşında fenolojik özellikleri birbirine benzer beş fidan kullanılmıştır (Şekil 6).



Şekil 5. Kuraklık stresi uygulanan fidanların görseli.

Kuraklık uygulamaları Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi tünel serasında gerçekleştirilmiştir. Köklerin toprağına tutunduğundan emin olunduktan sonra 22 Mayıs 2023 ila 12 Haziran 2023 tarihleri arasında hiç sulama yapılmamıştır. Kuraklık uygulaması başlangıcından itibaren her yedi günde bir ölçüm yapılmıştır. Birinci hafta

ölçümleri 22.05.2023; ikinci hafta ölçümleri 29.05.2023; üçüncü hafta ölçümleri 05.06.2023; dördüncü hafta ölçümleri ise 12.06.2023 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Klorofil Konsantrasyon İndeksi Ölçümü

Kuraklık stresi uygulanan altı farklı kestane popülasyonunun yapraklarına ait klorofil içeriği miktarı SPAD biriminde konsantrasyon göstergesini belirleyen fotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür. SPAD ölçer, ışığın diferansiyel geçirgenliğini ölçerek bir yapraktaki göreceli klorofil konsantrasyonunu tahmin eder (Chang ve Robison, 2003). Klorofil konsantrasyon ölçümleri SPAD-502 Plus cihazıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 7). Kuraklığa maruz bırakılan bütün fidanların yapraklarının damarlara gelmeyen kısımlarında 3 tekrarlı olarak uçtan geriye doğru 3. 4. ve 5. yapraklarda ölçümler yapılmıştır.



Şekil 6. Klorofil konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan SPAD 502 cihaz görüntüsü.

3.3.2. Fotosentez Parametre Ölçümleri

Yaprak gaz değişkenlerinin ölçümleri bir ışık kaynağına bağlı (Kırmızı, yeşil, mavi) LI-COR cihazı (LI-6800, Lincoln, NE, ABD) kullanılarak her fidan için seçilen dört yaprak (üsten 3-6. yapraklar) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her ölçüm öncesinde cihazın kalibrasyonu fotosentez foton akı yoğunluğu (PPFD), referans CO₂ ve hava akış hızı sırasıyla 1200 $\mu\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$, 400 $\mu\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$, 500 $\mu\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ olarak ayarlanmıştır.



Şekil 7. Gaz değişim parametrelerini ölçmek için kullanılan LI-COR cihaz görüntüsü.

Yaprak gaz değişkenleri kapsamında net fotosentez veya asimilasyon oranı (A_{net} , $\mu\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$), stoma iletkenliği (S_i , $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), terleme miktarı (T , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) her deneme grubu için fidanın üstten 3. ila 5. yaprağında dört tekrarlı olacak şekilde kuraklık uygulanmaya başlamasından itibaren haftalık olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 8).

3.3.3. Ksilem Su Potansiyeli Ölçümü

Ksilem su potansiyeli Scholander vd., (1965)'nin basınç odası tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Her bir popülasyona ait 3'er fidanda ölçümler yapılmıştır. Kök boğazı hizasının üst kısmından keskin bir bıçakla hafif bir eğimle kesilmiştir.



Şekil 8. Ksilem su potansiyeli ölçüm görüntüsü.

Kesim yüzeyinden geriye doğru yaklaşık 2-3 cm'lik kısımdaki kabuk soyularak ksilem açığa çıkarıldıktan sonra cihaza yerleştirilip tüpün vanası açılarak, kesim yüzeyinde su belirinceye kadar cihazın odacığına azot gazı basıncı dolması sağlanmıştır. Kesim yüzeyi el büyüteci ile gözlenirken su damlacıkları olduğu anda cihazın sübabı kapatılarak manometreden oda içindeki basınç okunmuştur. Okunan değer, ölçümü istenen, gövde ksilemi su potansiyeline, yani örnekleme anındaki mevcut bitki su gerilimine eşit kabul edilmiştir (Şekil 9).

3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Biyokimyasal analizler için Prolin miktarı spektrofotometrik olarak Asit-Ninhidrin metodu ile belirlenmiştir (Bates vd., 1973). Bu bağlamda, dört hafta boyunca kuraklık uygulanan ve bu uygulamaların her yedi günde alınan örneklerle gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4.1.1. Prolin Protokolü

Prolin analizi için gerekli olan %3 sülfosalisilik asit çözeltisi, asidik ninhidrin çözeltisi ve Prolin çözeltisi hazırlıkları aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

- *%3 Sülfosalisilik Asit (SSA) Çözeltisi*

3 gr. SAA 80 ml saf su içinde çözdürüldükten sonra çözelti 100 ml'e tamamlanmıştır.

- *Asidik Ninhidrin Çözeltisi (NNS)*

30 ml glasiyel asetik asit (GAA) 20 ml 6M ortofosforik asit ve 1.25 gr ninhidrin 75°C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Çözelti mavi-mor renk alınca soğumaya bırakılmıştır.

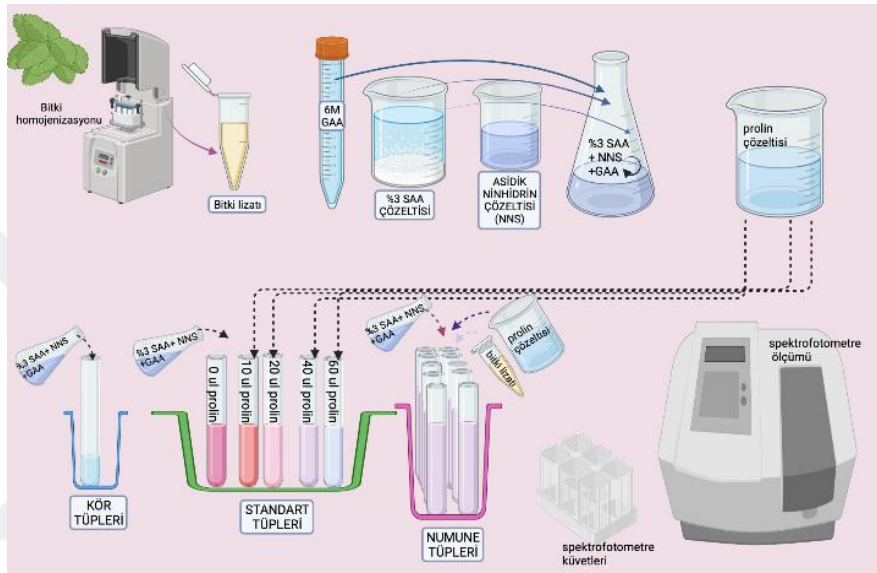
- *Prolin Çözeltisi*

0.01 gr prolin 10 ml %3 SSA çözeltisi içinde çözdürülmüştür.

Prolin analizi kör tüplerinin hazırlanması, standart tüplerinin hazırlanması ve numune tüplerinin hazırlanması olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Prolin protokol diyagramı Şekil 8’de gösterilmiştir. Prolin analizi basamakları sırasıyla;

- *Kör Hazırlığı*

İki adet kör tüpü hazırlanmıştır. İki ayrı cam tüpün her birine 1 ml GAA, 1ml %3 SSA ve 1ml NNS eklenerek iyice vortekslenmiştir.



Şekil 9. Prolin ölçüm protokol diyagramı.

- *Numune Hazırlığı*

Öncelikle 0.2 gr bitki numunesi tartılarak 2ml ependorf tüpüne konulur, bunun üzerine 1.5 ml %3 SAA eklenerek ve 2 adet paslanmaz çelik bilye atılarak 27Hz.’de 3 dk homojenizatör cihazında homojenize edilir. Homojenizasyon işleminden sonra 12.000g’ de 10 dk santrifüj edilir. Tüpün üst fazı (süpernatant)’nda kalan sıvıdan 1 ml alınarak cam tüplere konulur. Bunun üzerine 1 ml GAA, 1ml %3 SAA ve 1ml NNS eklenerek cam tüpün kapağı kapatılır ve iyice vortekslenmiştir.

- *Standart Hazırlığı*

Standart çözeltisi için 5 adet cam tüpe 0 ul (1. Tüp),10 ul (2. Tüp),20 ul (3. Tüp), 40 ul (4. Tüp), 60 ul (5. Tüp) prolin çözeltisi konulduktan sonra %3 SAA ile 100 ul hacmine tamamlamak için sırasıyla tüplere 100ul, 90ul, 80ul, 60ul, 40ul %3 SAA çözeltisi

eklenmiştir. Daha sonra bu tüplerin her birine 1 ml GAA, 1ml %3 SAA ve 1ml NNS eklenerek cam tüpün kapağı kapatılarak iyice vortekslenmiştir.

- *Spekrofotometre Ölçümü*

Karışımlar spektrofotometrede 520 nm absorbans değerinde okutulmuştur. Hazırlanan standartlara göre hesaplanan sonuçlar “mg ml⁻¹ tazeağırlık⁻¹” olarak sonuçlar kısmında verilmiştir (Carillo ve Gibon, 2011).

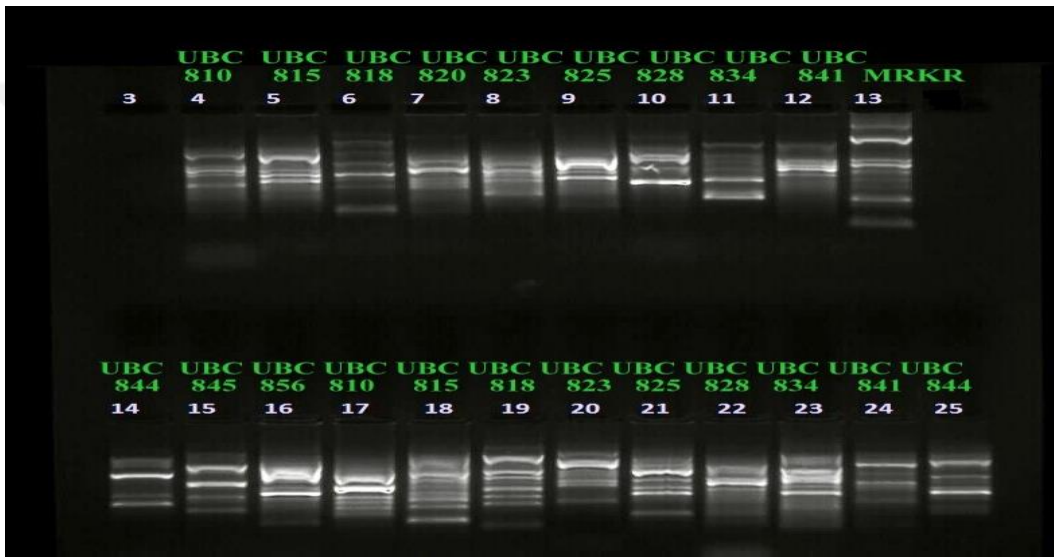
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Kuraklık stresinin her bir muamelesi için tam rastgele tasarıma sahip 6 farklı kestane popülasyonu ve her popülasyon için 5 fidan olmak üzere toplam 30 fidan kullanılmıştır. Veriler SPSS paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm fizyolojik ve biyokimyasal değişkenler IBM SPSS Statistics Standard Concurrent User V 26 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler birim sayısı (*n*), yüzde (%), ortalama ± standart sapma değerleri olarak verilmiştir. Ölçümlerin gruplara göre karşılaştırılmasında Karışık Desen ANOVA analizi kullanılmıştır. Karışık Desen ANOVA analizlerinde ana etkilerin karşılaştırılmasında Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. *p* <0.05 değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

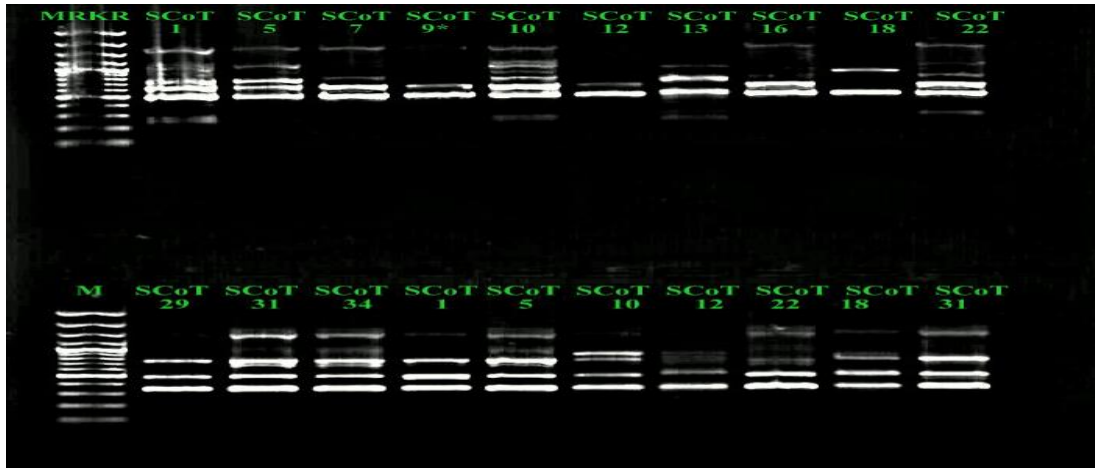
4. BULGULAR

4.1. ISSR ve SCoT BELİRTEÇLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, *C. sativa* türlerinin genetik çeşitliliğinin değerlendirilebilmesi için 20 farklı ISSR ve 20 farklı SCoT primeri, saflık oranı yüksek ve her bölgeyi temsil eden dokuz farklı kestane DNA'sı ile taranmıştır. Tarama sonucunda toplam 11 ISSR ve 14 SCoT primerinde bant oluşumu gözlenmiştir. ISSR ve SCoT belirteçlerinden elde edilen bantların agaroz jel görüntüleri sırasıyla Şekil 11 ve Şekil 12'de örnek olarak verilmiştir.



Şekil 10. ISSR profilleri. Mrkr: Moleküler işaretleyici (100–1500 bp).



Şekil 11. PCR amplifikasyonu ile oluşturulan SCoT profilleri. M: Moleküler işaretleyici (100–1500 bp).

Elde edilen bulgulara göre, 180 kestane genotipinin 11 ISSR ve 14 SCoT belirteçleri ile gerçekleştirilen PCR işlemleri sonucunda, ISSR primerlerinde toplamda 86 ve SCoT primerlerinde ise toplam 100 lokus saptanmıştır. Polimorfik lokus sayısı ISSR için 314 iken SCoT için 404 olduğu belirlenmiştir (Tablo 10). Popülasyon bazında yapılan genetik çeşitlilik analizine göre ortalama polimorfik lokus oranı sırasıyla ISSR ve SCoT belirteçlerinde %40.56 ve %49.11 olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra ISSR ve SCoT belirteçlerinde %58.14 ve %71 oranı ile Düzce popülasyonu en yüksek polimorfik lokus oranına sahip olduğu (Tablo 10) ve bu değerlerin ortalama polimorfik lokus oranlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 10. ISSR ve SCoT primerlerinin popülasyon bazında gözlenen polimorfik lokus sayısı ve oranı verileri.

Popülasyon	ISSR		SCoT	
	Polimorfik lokus sayısı	Polimorfik lokus oranı (%)	Polimorfik lokus sayısı	Polimorfik lokus oranı (%)
Deli Sarnıç	16	%18.60	49	%49
İbradı	35	%40.70	42	%42
Selge	44	%51.16	56	%56
Ordu	30	%34.88	50	%50
Trabzon	41	%47.67	42	%42
Düzce	50	%58.14	71	%71
Kütahya	26	%30.23	35	%35
Ovacık	35	%40.70	51	%51
Bursa	37	%43.02	46	%46

Genetik çalışmalarda, belirteç kalitesinin göstergelerinden biri olan moleküler belirteçlerin polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) değerleri popülasyonun bireyleri arasındaki polimorfizmi tespit etmek için kullanılır. Eş baskın veya baskın belirteçler için PBİ değerleri 0 ile 1 arasında değişir ve elde edilen değer ne kadar yüksekse belirtecin o derece anlamlı olduğu anlamına gelir. Bu çalışmada, 11 farklı ISSR primerinin *C. sativa* genotipleri için PBİ değerleri ortalamasının 0.38 ve 14 SCoT primerinin PBİ değerleri ortalamasının 0.34 olduğu belirlenmiştir. Her bir belirtecin PBİ değerleri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. ISSR ve SCoT primerlerinin PBİ değerleri.

ISSR Primer kodu	PBİ	SCoT Primer Kodu	PBİ
UBC 810	0.37	1	0.32
UBC 815	0.39	5	0.30
UBC 818	0.46	7	0.41
UBC 820	0.40	8	0.41
UBC 823	0.37	9	0.19
UBC 825	0.41	10	0.22
UBC 828	0.42	12	0.38
UBC 834	0.35	13	0.38
UBC 836	0.40	16	0.44
UBC 841	0.42	18	0.39
UBC 844	0.38	19	0.31
UBC 845	0.29	20	0.41
UBC 856	0.35	22	0.35
Ortalama	0.38	29	0.20
		31	0.35
		34	0.40
		Ortalama	0.34

PBİ değeri 0.5'ten büyük olan belirteçlerin çok bilgilendirici olduğu, 0.25 ile 0.50 arasındaki değerlerin bilgilendirici olduğu, 0.25' ten düşük olan değerlerin ise çok bilgilendirici olmadığı bildirilmiştir (Bostein vd.,1980). Bu bağlamda, çalışma kapsamında kullanılan 11 ISSR ve 14 SCoT belirteçlerinin *C. sativa* türü için “bilgilendirici belirteç” kapsamında olduğu belirlenmiştir.

4.2. GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında, ISSR ve SCoT belirteçleri ile toplam 180 adet kestane genotipinin amplifiye edilmiş, Nei (1978)'nin UPGMA yöntemi ile popülasyonlar arası genetik uzaklık hesaplanmıştır. Sonuç olarak ISSR'a göre birbirine en uzak iki popülasyonun

Akdeniz bölgesine ait Selge ile Ege bölgesine ait Kütahya popülasyonu (0.61) ve Akdeniz bölgesine ait Deli Sarnıç ve Marmara bölgesine ait Bursa popülasyonu (0.61) olduğu; SCoT'a göre ise birbirine en uzak popülasyonların Karadeniz bölgesine ait Ordu ve Marmara bölgesine ait Bursa (0.30) olduğu belirlenmiştir (Tablo12 ve 13).

Tablo 12. ISSR verilerine göre kestane popülasyonlarının genetik uzaklık değerleri.

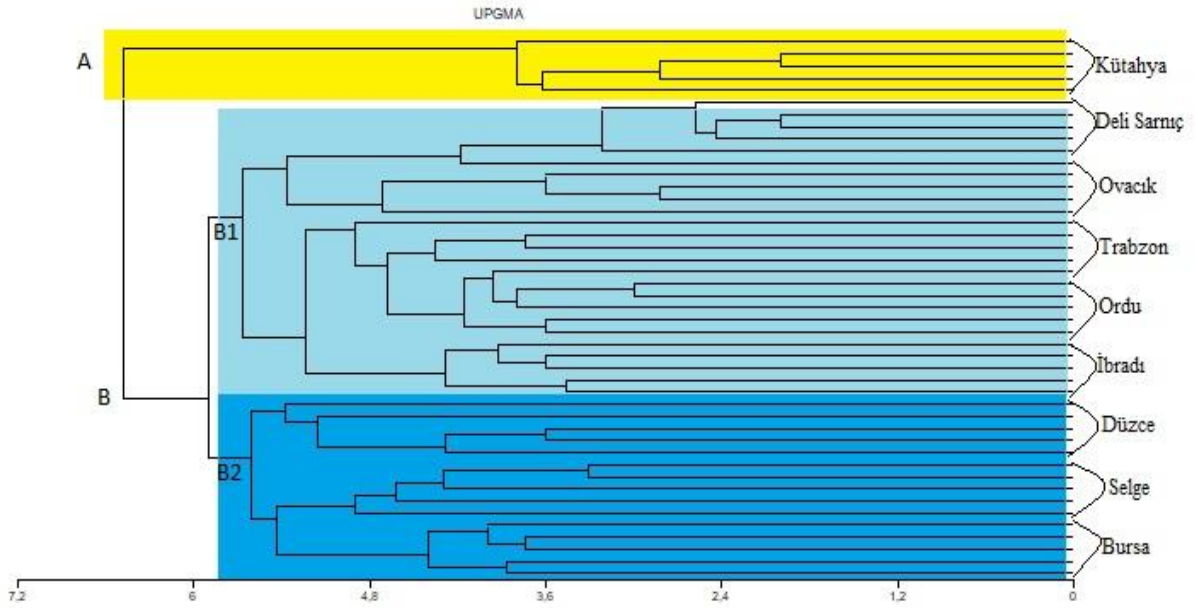
Popülasyon	Bursa	Düzce	Kütahya	İbradı	Ordu	Trabzon	Selge	Ovacık	Deli Sarnıç
Bursa	****								
Düzce	0.2410	****							
Kütahya	0.4701	0.4700	****						
İbradı	0.2866	0.2907	0.5709	****					
Ordu	0.2810	0.2438	0.5066	0.2604	****				
Trabzon	0.3209	0.2934	0.5134	0.1681	0.1205	****			
Selge	0.2274	0.2218	0.6109	0.2129	0.3093	0.3236	****		
Ovacık	0.3660	0.2561	0.5403	0.3210	0.2357	0.2760	0.2810	****	
Deli Sarnıç	0.6126	0.4447	0.4586	0.4280	0.3302	0.2851	0.4910	0.2302	****

Tablo 13. SCoT verilerine göre kestane popülasyonlarının genetik uzaklık değerleri.

Popülasyon	Bursa	Düzce	Kütahya	İbradı	Ordu	Trabzon	Selge	Ovacık	Deli Sarnıç
Bursa	****								
Düzce	0.2927	****							
Kütahya	0.1763	0.2692	****						
İbradı	0.2014	0.2120	0.2992	****					
Ordu	0.3051	0.2564	0.2009	0.2440	****				
Trabzon	0.1941	0.2447	0.1120	0.2732	0.1697	****			
Selge	0.2713	0.2427	0.1931	0.2940	0.2158	0.1339	****		
Ovacık	0.2820	0.2170	0.2100	0.2782	0.1532	0.2027	0.1694	****	
Deli Sarnıç	0.2260	0.2911	0.0639	0.2865	0.1998	0.1279	0.1630	0.1957	****

ISSR ve SCoT verilerinden Nei (1978)'e göre UPGMA metodu ile elde edilen popülasyonlar arası genetik uzaklığa dayalı dendogramlar sırasıyla Şekil 13 ve Şekil 14'te verilmiştir. Elde edilen veriler ışığında ISSR 'a ait dendrogram incelendiğinde A ve B olarak adlandırılan iki ana kümeye ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 13). A kümesinde Kütahya; B kümesinde ise Deli Sarnıç, Ovacık, Trabzon, Ordu, İbradı ve C kümesinde Düzce, Selge ve Bursa popülasyonları bulunmaktadır. Ayrıca B kümesi B1 ve B2 olmak

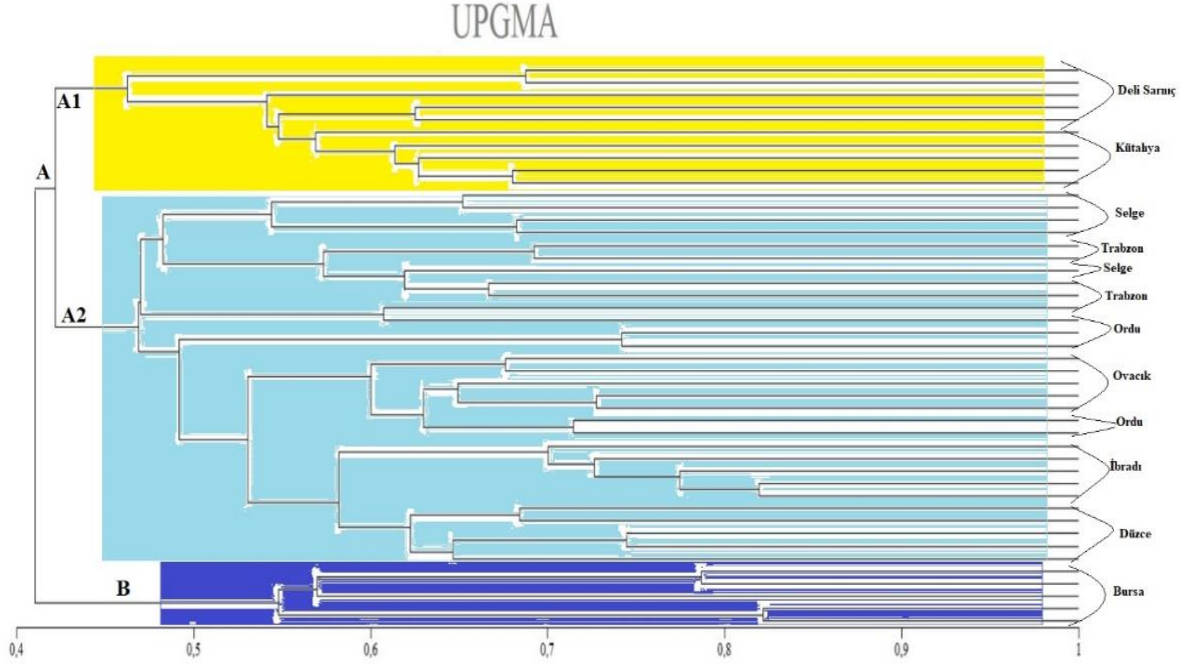
üzere 2 alt kümeye ayrılmıştır. B1 alt kümesinde Deli Sarnıç ve Ovacık, Trabzon, Ordu, İbradı popülasyonları ve B2 alt kümesinde alt kümesinde Düzce, Selge ve Bursa popülasyonları bulunmaktadır.



Şekil 12 ISSR verilerinden Nei (1978)'e göre UPGMA metodu ile elde edilen popülasyonlar arası genetik uzaklığa dayalı dendrogram.

SCoT'a ait dendrogram incelendiğinde A ve B olarak adlandırılan iki ana kümeye ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 14). A kümesinde Deli Sarnıç, Kütahya, Selge, Trabzon, Ordu, Ovacık, İbradı ve Düzce popülasyonları bulunurken B kümesinde Bursa popülasyonu bulunmaktadır. Ayrıca A kümesi A1 ve A2 olmak üzere iki alt kümeye ayrılmıştır, A1 kümesinde Deli Sarnıç ve Kütahya bulunurken A2 alt kümesinde Selge, Trabzon, Ordu, Ovacık, İbradı ve Düzce popülasyonları gruplanmıştır.

Sonuç olarak ISSR ve SCoT'nin UPGMA dendrogramı küçük sapmalarla genotiplerin benzer şekilde gruplandırılmasını sağlamıştır. Genotiplerin kümelenmesindeki sapma, hedef genomun boyutundaki farklılıklar nedeniyle ortaya çıkabilir (Costa vd., 2016). Bu çalışmadaki kümelenme modelinde SCoT ve ISSR belirteçlerinin lokasyon spesifikliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 13. SCoT verilerinden Nei (1978)'e göre UPGMA metodu ile elde edilen popülasyonlar arası genetik uzaklığa dayalı dendrogram.

Diğer yandan çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, her iki belirteç için de popülasyon bazında gözlenen en yüksek alel sayısı, etkili alel sayısı, Nei gen çeşitlilik indeksi ve Shannon Bilgi indeksi değerleri Düzce popülasyonunda olduğu ve bu parametrelerinin SCoT belirteçlerinde ISSR'a göre daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 14).

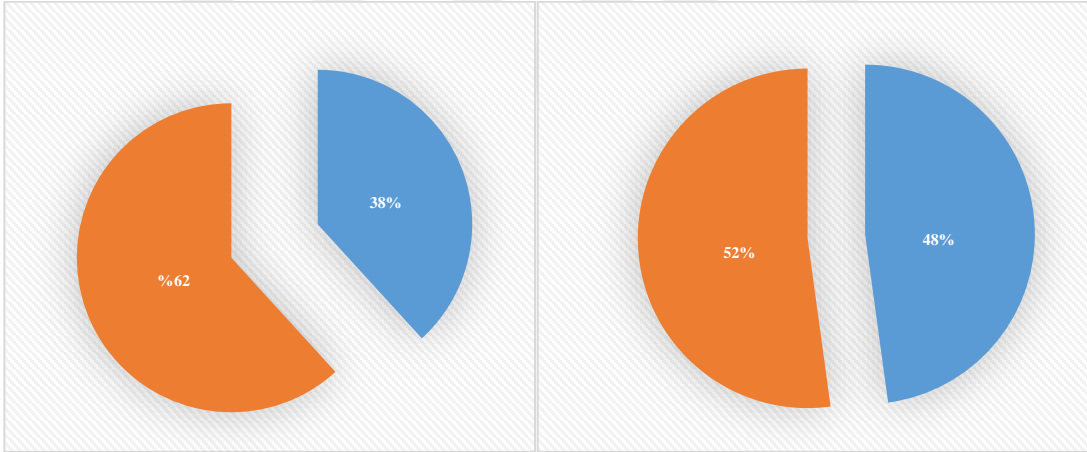
Tablo 14. ISSR ve SCoT primerlerinden elde edilen parametrelere ait veriler (SH: standart hata).

	Gözlenen alel sayısı \pm SH		Etkili alel sayısı \pm SH		Gen çeşitliliği \pm SH		Shannon bilgi indeksi \pm SH	
	ISSR	SCoT	ISSR	SCoT	ISSR	SCoT	ISSR	SCoT
Deli Sarınc	1.186 \pm 0.391	1.490 \pm 0.502	1.124 \pm 0.279	1.357 \pm 0.398	0.072 \pm 0.156	0.201 \pm 0.214	0.107 \pm 0.228	0.293 \pm 0.306
İbradı	1.407 \pm 0.494	1.420 \pm 0.496	1.259 \pm 0.345	1.301 \pm 0.385	0.154 \pm 0.193	0.171 \pm 0.208	0.229 \pm 0.2840	0.249 \pm 0.300
Selge	1.511 \pm 0.502	1.560 \pm 0.498	1.325 \pm 0.355	1.408 \pm 0.400	0.193 \pm 0.198	0.230 \pm 0.213	0.288 \pm 0.289	0.335 \pm 0.305
Ordu	1.348 \pm 0.479	1.500 \pm 0.502	1.237 \pm 0.353	1.371 \pm 0.404	0.137 \pm 0.195	0.208 \pm 0.216	0.202 \pm 0.283	0.302 \pm 0.309
Trabzon	1.476 \pm 0.502	1.420 \pm 0.496	1.324 \pm 0.376	1.310 \pm 0.394	0.187 \pm 0.205	0.174 \pm 0.212	0.276 \pm 0.297	0.253 \pm 0.304

Tablo 15(devam). ISSR ve SCoT primerlerinden elde edilen parametrelere ait veriler.

Düzce	1.581 ± 0.496	1.710 ± 0.456	1.394 ± 0.378	1.497 ± 0.372	0.228 ± 0.204	0.284 ± 0.195	0.337 ± 0.295	0.417 ± 0.277
Kütahya	1.302 ± 0.462	1.3500 ± 0.479	1.179 ± 0.295	1.237 ± 0.351	0.109 ± 0.172	0.137 ± 0.194	0.165 ± 0.256	0.202 ± 0.282
Ovacık	1.407 ± 0.494	1.510 ± 0.502	1.291 ± 0.382	1.371 ± 0.399	0.165 ± 0.207	0.209 ± 0.214	0.241 ± 0.298	0.305 ± 0.306
Bursa	1.430 ± 0.498	1.460 ± 0.500	1.281 ± 0.357	1.334 ± 0.394	0.165 ± 0.198	0.188 ± 0.212	0.245 ± 0.289	0.275 ± 0.305

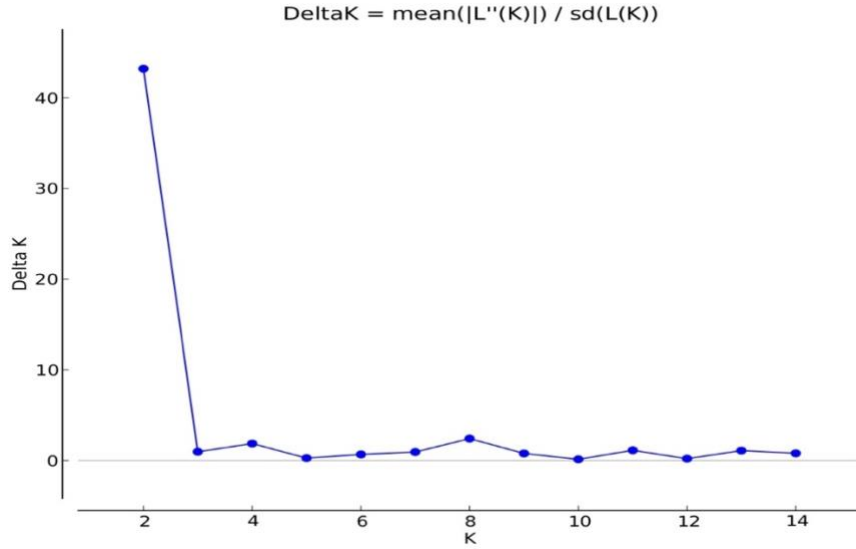
Bu çalışmada, AMOVA analizi, var olan genetik çeşitliliğin popülasyon içi, popülasyonlar arasında ne oranlarda dağıldığını görebilmek amacı ile yapılmıştır. ISSR analizi için yapılan AMOVA sonuçlarına göre popülasyonlar içerisinde %62 oluşan varyasyon, popülasyonlar arası %38 olarak; SCoT primerleri ile yapılan sonuçlara göre ise genetik çeşitlilik popülasyonlar içerisinde %52 oluşan varyasyon, popülasyonlar arası %48 olarak bulunmuştur (Şekil 15 a,b).



Şekil 14. AMOVA analiz sonuçları a) ISSR primerleri, b) SCoT primerleri. Turuncu renk: popülasyonlar içi; mavi renk :popülasyonlar arası'nı ifade etmektedir.

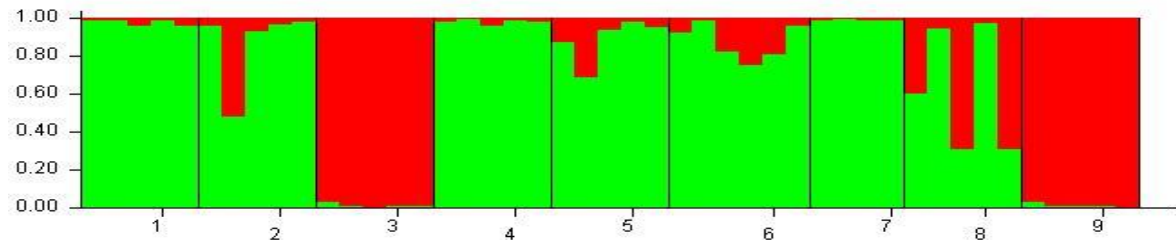
Çalışma kapsamında kullanılan kestane genotiplerinin popülasyon yapısı STRUCTURE yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Bu programdan elde edilen üyelik verilerine dayanarak, genotiplerin %80 olasılığı karşılık gelen popülasyonlar olarak belirlenirken, diğerleri karışım modeli (admixture) olarak kategorize edilmiştir. Evanno'nun yöntemine göre, gerçek küme sayısının değerini belirlemeye yardımcı olan ΔK değeri STRUCTURE HARVESTER uygulaması ile değerlendirilmiştir. ISSR primeri veri

setindeki grup sayısı iki ($\Delta K=2$) olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu değer, ISSR primerleri ile iki farklı gen havuzu elde edildiğini göstermektedir (Şekil 16).



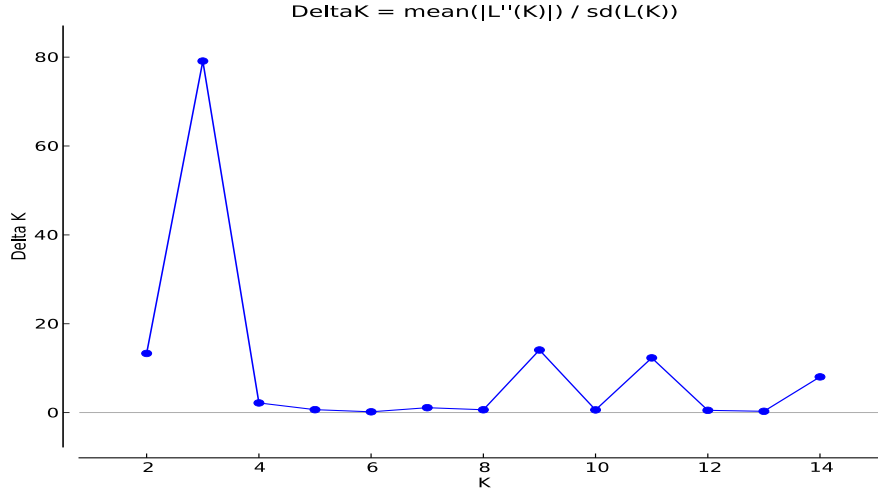
Şekil 15. ISSR belirteçleri ile kestane genotiplerinden elde edilen 1 ila 15 arasında olan küme sayısı (K) ve LnP(D)- türetilmiş ΔK kullanılarak ΔK tepe değeri 2 olarak tahmin edilen üyelik fraksiyonunun grafiği.

Kantitatif özellik lokusu, derecesi değişen ve poligenik etkilere, yani iki veya daha fazla genin ürünü ve bunların çevresine atfedilebilen belirli bir fenotipik özellik ile ilişkili bir DNA bölgesidir. Bu kantitatif özellik lokuslar genellikle farklı kromozomlarda bulunur. Fenotipik özellikteki varyasyonu açıklayan kantitatif özellik lokusların sayısı, bir özelliğin genetik yapısını gösterir. Bu, örneğin bitki boyunun küçük etkiye sahip birçok gen veya büyük etkiye sahip birkaç gen tarafından kontrol edildiğini gösterebilir. Bu bağlamda ISSR belirteçleri ile elde edilen sonuçlara göre, Kütahya ve Deli Sarıç popülasyonları birinci kümede (kırmızı renkli); Bursa, Düzce, İbradı, Ordu, Trabzon, Selge ve Ovacık popülasyonları ise ikinci kümede (yeşil renkli) gruplanmıştır (Şekil 17).



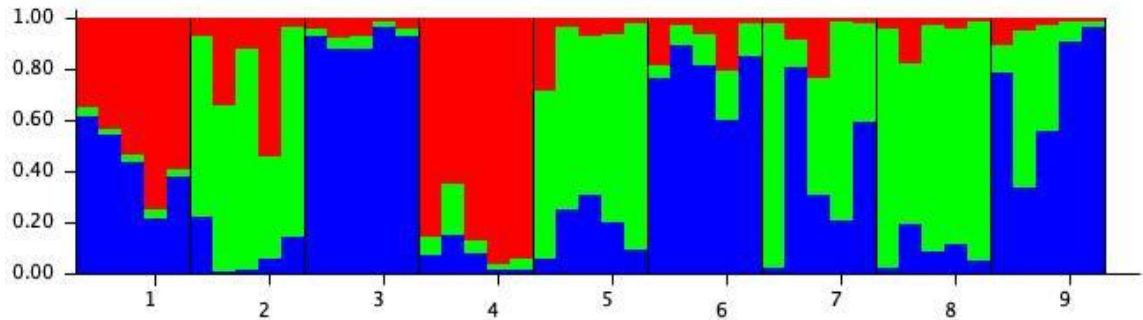
Şekil 16. ISSR belirteçlerine dayanan 45 C.sativa genotipinin STRUCTURE yazılım analizi ile elde edilen popülasyon yapısı. Kırmızı renkli dikey çubuk Küme 1'i ve yeşil renk Küme 2'yi gösterir. Grafik kantitatif özellik lokus istatistiğini kullanarak her bir genotip için tahmin edilen üyelik katsayısını gösterir. (1): Bursa; (2): Düzce; (3):Kütahya; (4):İbradı;(5): Ordu; (6):Trabzon;(7):Selge;(8):Ovacık;(9): Deli Sarıç

SCoT belirteçleri için üç farklı popülasyon elde edilmiştir ($\Delta K=3$). Sonuç olarak bu değer, SCoT primerleri ile üç farklı gen havuzu elde edildiğini göstermektedir (Şekil 18).



Şekil 17. SCoT belirteçleri ile kestane genotiplerinden elde edilen 1 ila 14 arasında olan küme sayısı (K) ve LnP(D)- türetilmiş ΔK kullanılarak ΔK tepe değeri 3 olarak tahmin edilen üyelik fraksiyonununun grafiği.

STRUCTURE analizi sonuçlarından elde edilen ΔK değerine bağlı grafik dokuz *C.sativa* popülasyonunun yapısını kantitatif özellik lokus haritalamasını göstermektedir. Bu grafiğe göre, SCoT belirteçleri Kütahya, Trabzon ve Deli Sarnıç popülasyonları birinci kümede (mavi renkli); Bursa ve İbradı Popülasyonları 2. Kümede (kırmızı renkli) ve Düzce, Ordu, Selge ve Ovacık popülasyonları ise 3. Kümede (yeşil renkli) gruplandırmıştır (Şekil 19).



Şekil 18. SCoT belirteçlerine dayanan kestane genotiplerinin STRUCTURE yazılım analizi ile elde edilen popülasyon yapısı. Kırmızı renkli dikey çubuk Küme 1'i ve yeşil renk Küme 2'yi gösterir. Grafik Q istatistiği kullanılarak her bir genotip için tahmin edilen üyelik katsayısını gösterir. (1): Bursa; (2): Düzce; (3): Kütahya ;(4):İbradı;(5): Ordu; (6):Trabzon;(7):Selge;(8):Ovacık;(9): Deli Sarnıç.

4.3. KURAKLIK STRESİNİN FİZYOLOJİK KARAKTERLERE ETKİSİ

Abiyotik streslerden biri olan kuraklık, bitkilerin köklerden aldığı besini sürgünlere taşıyamamasına neden olmaktadır (Rouphael vd., 2012) ve bu durumda bitki hücrelerindeki fotosentez mekanizması ile ilgili tilakoid membran, besin (azot, kalsiyum, potasyum vb.), nem ve enerji eksikliğinden dolayı zarar görmektedir ve bunun sonucunda bitkilerin fizyolojik süreçleri de olumsuz etkilenerek bitkilerin klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır (Fang ve Xiong 2014).

4.3.1. Klorofil Konsantrasyon İndeksi Tayini (KKİ) Sonuçları

Klorofil içeriği miktarına ait varyans analiz tablosu, Tablo 15’te verilmiştir. İlgili tablo incelendiğinde, kontrol gruplarının KKİ değerlerinde haftalar ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ve kurak gruplarının KKİ değerlerinin kontrol gruplarına göre önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,005$;Tablo 15).

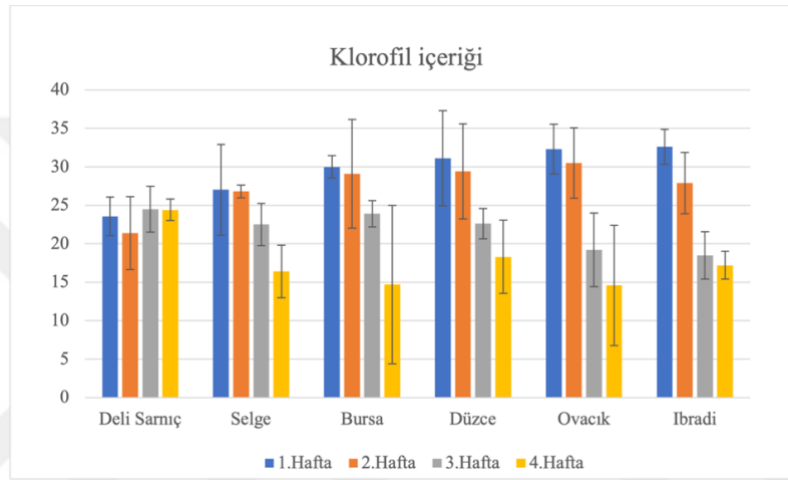
Tablo 16. KKİ değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasına göre karşılaştırılması.

		KKİ						
		Deli Sarnıç	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	İbradı	<i>p</i>
		<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	
1. HAFTA	Kontrol	39,8±1,6	39,3±1,3	42,2±2,4	41,9±9,7	43,4±4,2	43,8±2,4	0,63
	Kurak	23,5±2,52	27±55,88 ^{xya}	30,0±1,45 ^{xc}	31,1±6,19 ^{xd}	32,3±3,23 ^{xd}	32,6±2,29 ^{xb}	0,05
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	
2. HAFTA	Kontrol	39,7±2,8	39,5±1,5	39,4±1,19	39,5±2,7	41,4±3,9	42,6±5,0	0,61
	Kurak	21±4,73	26,8±0,85 ^x	29,1±7,091 ^x	29,4±6,19 ^{xy}	30,5±4,58 ^x	27,9±3,98 ^x	0,12
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	
3. HAFTA	Kontrol	39,5±3,9	38,3±4,6	39,7±2,0	38,8±3,9	41,9±2,2	40,1±3,0	0,90
	Kurak	24,5±2,97	22,5±2,73 ^{xyab}	23,9±1,7 ^{xb}	22,6±1,97 ^{yb}	19,2±4,79 ^{yb}	18,5±3,08 ^{ya}	0,05
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	
4. HAFTA	Kontrol	38,7±1,13	39,1±0,7	39,8±2,3	37,1±1,2	41,4±1,2	41,8±1,1	0,71
	Kurak	24,4±1,39	16,4±3,41 ^{yb}	14,7±10,29 ^{ya}	18,3±4,76 ^{ya}	14,6±7,82 ^{ya}	17,2±1,81 ^{ya}	0,19
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	<i>p</i><0,05	
Test İstatistikleri [§]		<i>p</i>=0,635	<i>p</i>=0,026	<i>p</i>=0,007	<i>p</i>=0,007	<i>p</i><0,001	<i>p</i><0,001	

$$F=1926,958; p<0,001; \eta^2=0,991$$

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [∇]Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [§]Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [†]Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Harflendirme ^{a, b, c} satır bazlı, ^{x, y, z} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.

Kuraklık uygulamasının 1.haftasında Ovacık ve İbradı popülasyonlarının klorofil miktarı Deli Sarnıç, Selge ve Bursa'ninkinden daha yüksektir ($p=0,05$). Kuraklık uygulamasının 3.haftasında Bursa, Düzce ve Ovacık popülasyonlarının klorofil miktarı diğer popülasyonlara göre daha yüksektir ($p=0,05$). Kuraklık uygulamasının 2. ve 4.haftalarında klorofil içeriği değerlerinde popülasyonlar arası kıyaslamada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 15). Deli Sarnıç popülasyonu dışındaki bütün popülasyonlarda kuraklık süresinin artması klorofil konsantrasyon değerlerinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 20).



Şekil 19. Kuraklık stresi uygulanan popülasyonların klorofil konsantrasyon indeksi değerlerinin uygulama zamanlarına göre değişim grafiği.

Bu bağlamda elde edilen sonuçlara göre Selge ve Bursa popülasyonlarının klorofil miktarı 4.haftada en düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Düzce, Ovacık ve İbradı popülasyonlarının klorofil miktarı kuraklığın 3. haftasında azalmaya başladığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Kuraklığın 4. haftasında ise bütün popülasyonların klorofil miktarının benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

4.3.2. Fotosentez Parametre Ölçümleri Sonuçları

Kuraklık uygulanan Deli Sarnıç, Selge, Bursa, Düzce, Ovacık ve İbradı popülasyonlarına ait kestane fidanlarının yaprak gaz değişim parametrelerindeki (stoma iletkenliği, terleme net asimilasyon) istatistik sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.3.2.1. Kuraklık stresinin stoma iletkenliği (Sİ), terleme (T) ve net fotosentez (Anet) etkisi

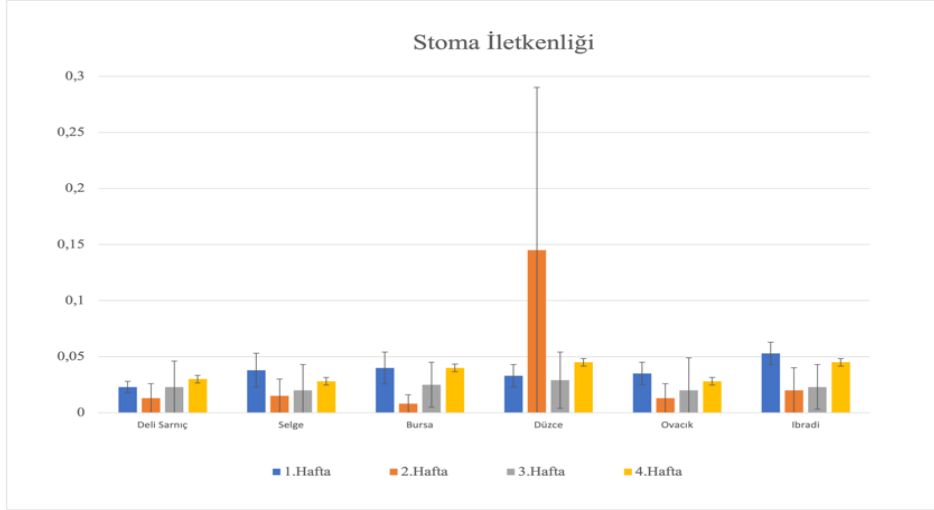
6 kestane popülasyonunun kontrol ve kurak gruplarına ait Sİ'ne ait bulgular Tablo 16 ve Şekil 21'de belirtilmiştir. Düzenli sulanan kontrol gruplarının Sİ değerlerinde haftalar ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ve kontrol gruplarının Sİ değerleri kurak gruplara göre önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir (Tablo 16). Bu, fidanların kurak şartlar altında stomalarını kapattığını göstermektedir.

Tablo 17 Stoma iletkenliği değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.

		Sİ ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)						Test İstatistikleri†
		Deli Sarnıç	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	İbradı	p
		n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	
1. HAFTA	Kontrol	0,255±0,30	0,192±0,05	0,197±0,02	0,207±0,04	0,277±0,34	0,280±0,28	0,634
	Kurak	0,023±0,005 ^a	0,028±0,015 ^{ab}	0,04±0,014 ^{xyb}	0,033±0,01 ^{xzab}	0,035±0,01 ^{ab}	0,053±0,01 ^{xb}	0,020
Test İstatistikleri [∇]		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
2. HAFTA	Kontrol	0,207±0,04	0,160±0,06	0,107±0,036	0,175±0,039	0,165±0,049	0,112±0,045	0,569
	Kurak	0,013±0,005 ^a	0,015±0,006 ^a	0,008±0,005 ^{xa}	0,145±0,048 ^{yb}	0,013±0,005 ^a	0,02±0,008 ^{ya}	0,001
Test İstatistikleri [∇]		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	
3. HAFTA	Kontrol	0,185±0,01	0,195±0,04	0,137±0,005	0,140±0,11	0,197±0,02	0,177±0,17	0,315
	Kurak	0,023±0,005 ^a	0,020±0,008 ^a	0,025±0,006 ^{xab}	0,029±0 ^{zb}	0,02±0 ^a	0,023±0,005 ^{ya}	0,049
Test İstatistikleri [∇]		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
4. HAFTA	Kontrol	0,179±0,034	0,175±0,036	0,125±0,17	0,129±0,008	0,185±0,04	0,169±0,41	0,172
	Kurak	0,03±0,014	0,028±0,005	0,04±0 ^y	0,045±0,019 ^x	0,028±0,005	0,045±0,006 ^x	0,058
Test İstatistikleri [∇]		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
Test İstatistikleri [‡]		p=0,312	p=0,268	p=0,004	p<0,001	p=0,069	p<0,001	
F=602,872; p<0,001; η²=0,971								

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [∇] Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [‡] Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [†] Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). Harflendirme ^{a, b, c} satır bazlı, ^{x, y, z} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.

Elde edilen bulgular, kuraklık şiddetinin artması Deli Sarnıç, Selge ve Ovacık popülasyonlarının stoma iletkenliği değerlerinde değişikliğe neden olmadığını göstermektedir (p>0,05; Tablo16).



Şekil 20. Kurak grupların Sİ'nin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.

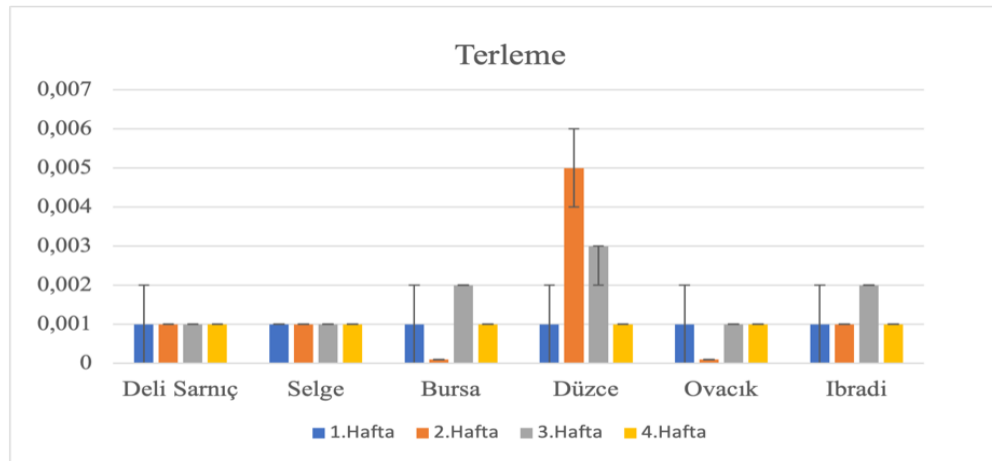
Düzce popülasyonu kuraklığın 2.haftasında en yüksek Sİ değerine sahipken 3.haftadada bu değer düşüğü ve kuraklığın 4.haftasında ise diğer popülasyonlarla benzer seviyeye geldiği belirlenmiştir (Şekil 21). İbradı popülasyonunda kuraklığın 2.haftasında Sİ'nin azaldığı bunu takip eden 3.hafta ölçümlerinde değişim göstermediği ve 4.haftada yükselerek diğer popülasyonlarla benzer seviyeye geldiği belirlenmiştir (Tablo 16).

Terleme (T) miktarına ait bulgular Tablo 17 ve Şekil 22'de verilmiştir. Kontrol gruplarının T değerlerinde haftalar arası ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ve kontrol gruplarının T miktarının kurak gruplarına göre önemli yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 17). Kontrol gruplarına ait fidanlar, düzenli sulanmaya bağlı olarak terleme oranlarında önemli değişim göstermemiştir. Kurak gruplarda ise sıcaklık değişimleri ve su yoksunluğuna bağlı olarak kontrol gruplarına göre terleme miktarında azalma meydana gelmiştir. Kuraklığın 1. ve 4.haftasında kurak gruplara ait popülasyonların T değerlerinin benzer olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$; Tablo 17). Kuraklığın 2.haftasında Düzce popülasyonunun T değeri diğerlerinden daha yüksektir. Kuraklığın 3.haftasında ise Düzce popülasyonunun T değeri azalmış ve diğer popülasyonlarla eşit seviyeye gelmiştir (Şekil 22).

Tablo 18. Popülasyonların T değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.

		T (mmol m ⁻² s ⁻¹)						Test İstatistikleri †
		Deli Sarnıç	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	Ibradi	p
		n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	
1. HAFTA	Kontrol	0,028±0,06	0,028±0,04	0,021±0,06	0,019±0,09	0,03±0,02	0,029±0,07	0,0621
	Kurak	0,001±0,001	0,001±0	0,001±0,001 ^x	0,001±0,001 ^x	0,001±0,001 ^{xy}	0,001±0,001 ^x	0,491
Test İstatistikleri [∇]		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	
2. HAFTA	Kontrol	0,027±0,01	0,028±0,03	0,029±0,05	0,023±0,08	0,02±0,07	0,02±0,07	0,080
	Kurak	0,001±0 ^a	0,001±0 ^a	0,001±0 ^{xa}	0,005±0,001 ^{yb}	0±0 ^{xa}	0,001±0 ^{xa}	0,001
Test İstatistikleri [∇]		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	
3. HAFTA	Kontrol	0,035±0,09	0,049±0,09	0,027±0,02	0,019±0,035	0,022±0,04	0,026±0,05	0,104
	Kurak	0,001±0 ^a	0,001±0 ^a	0,002±0 ^{ya}	0,003±0 ^{xa}	0,001±0 ^{xa}	0,002±0 ^{ya}	0,047
Test İstatistikleri [∇]		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	
4. HAFTA	Kontrol	0,026±0,019	0,029±0,009	0,028±0,008	0,026±0,006	0,024±0,001	0,027±0,02	0,475
	Kurak	0,001±0	0,001±0	0,001±0 ^x	0,001±0 ^x	0,001±0 ^y	0,001±0 ^x	0,239
Test İstatistikleri [∇]		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	
Test İstatistikleri [‡]		p<0,173	p<0,420	p=0,009	p<0,001;	p=0,029;	p=0,049;	
F=1144,070; p<0,001; η²=0,985								

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [∇]Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [‡]Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [†]Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Harflendirme ^{a, b, c} satır bazlı, ^{x, y, z} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.



Şekil 21. Kurak grupların T değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.

Ayrıca kuraklık şiddetinin artması Deli Sarnıç ve Selge popülasyonlarının T değerlerine anlamlı bir etkide bulunmamıştır ($p>0,05$; Tablo 17). Bursa ve İbradi popülasyonlarının T

miktarı kuraklığın 3.haftasında artış göstermiş ve 4.haftada diğer popülasyonlarla benzer seviyeye gelmiştir (Tablo17). Düzce popülasyonunda 2.haftada T miktarı artarken 3.haftada azalmış ve 4.haftada ise bir önceki hafta ile benzer değerlerde seyrederek diğer popülasyonlarla benzer seviyeye gelmiştir (Tablo17).

Net fotosentez (Anet) miktarına ait bulgular, Tablo 18 ve Şekil 23'te verilmiştir. Kontrol gruplarının Anet değerlerinde haftalar arası ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ve kurak gruplarının Anet değerleri kontrol gruplarına göre önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 18). Kuraklık şiddetinin artması Selge popülasyonunun Anet'ine anlamlı etkide bulunmamıştır ($p>0,05$;Tablo17). Deli Sarnıç, Düzce, Ovacık ve İbradı popülasyonlarının Anet değerleri kuraklığın 3.haftasında azalmış ve 4.haftada artarak diğer popülasyonlarla benzer seviyeye gelmiştir ($p<0,05$;Tablo17).

Tablo 19. Popülasyonlar ile net fotosentez değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.

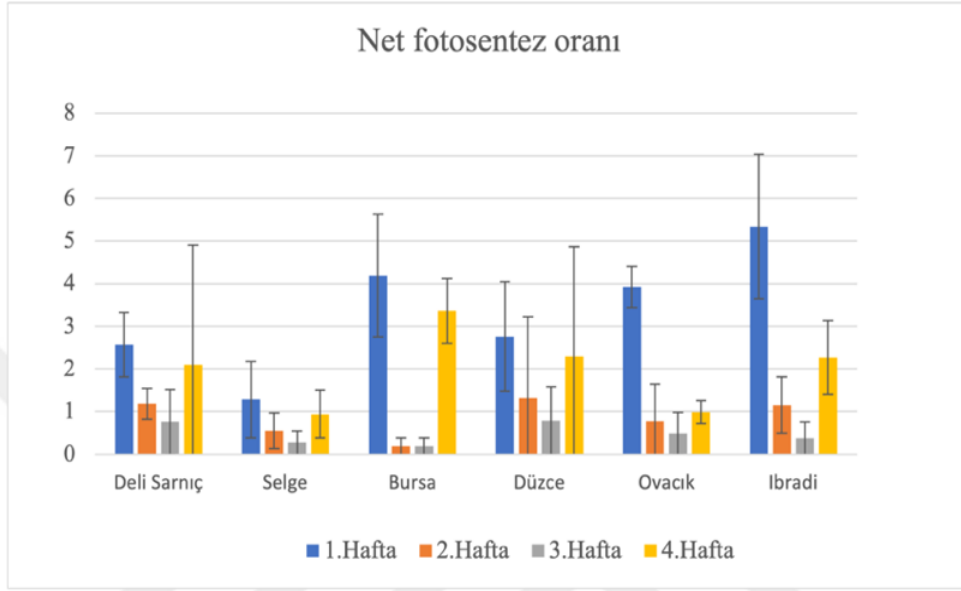
		Net fotosentez (asimilasyon) oranı (Anet $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)						Test İstatistikleri †
		Deli Sarnıç	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	İbradı	
		$n=4$	$n=4$	$n=4$	$n=4$	$n=4$	$n=4$	p
1.HAFTA	Kontrol	8,88±2,64	7,78±2,99	8,56±3,16	8,75±2,48	8,52±2,38	8,35±2,45	0,992
	Kurak	2,57±0,75 ^{ab}	1,28±0,90 ^a	4,19±1,44 ^{xb}	2,76±1,28 ^{xab}	3,92±0,49 ^{xab}	5,34±1,69 ^{xb}	0,002
Test İstatistikleri [∇]		$p<0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$	$p<0,05$	
2. HAFTA	Kontrol	8,91±2,28	7,02±4,60	7,48±1,88	9,18±2,70	7,27±5,41	7,09±0,80	0,897
	Kurak	1,18±0,36 ^{aa}	0,55±0,42 ^a	0,19±0,19 ^{ya}	1,32±1,90 ^{xyb}	0,78±0,86 ^{yz}	1,15±0,66 ^{ya}	0,001
Test İstatistikleri [∇]		$p<0,005$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,05$	
3. HAFTA	Kontrol	11,64±5,24	10,63±1,33	6,63±4,64	11,14±4,16	8,39±1,89	9,24±1,04	0,353
	Kurak	0,76±0,19 ^{yc}	0,27±0,19 ^a	0,19±0,68 ^{xza}	0,79±0,79 ^{yc}	0,49±0,13 ^{zb}	0,38±0,24 ^{zab}	0,047
Test İstatistikleri [∇]		$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	
4. HAFTA	Kontrol	8,5±2,38	13,3±3,61	10,94±2,89	13,93±5,28	10,31±4,43	9,09±2,20	0,251
	Kurak	2,10±2,81 ^x	0,94±0,57	3,36±0,76 ^{xz}	2,29±2,58 ^x	0,99±0,27 ^y	2,27±0,87 ^{xy}	0,341
Test İstatistikleri [∇]		$p<0,05$	$p<0,001$	$p<0,05$	$p<0,005$	$p<0,001$	$p<0,05$	
Test İstatistikleri [∇]		$p=0,004$	$p=0,175$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	

$$F=446,225; p<0,001; \eta^2=0,961$$

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [∇]Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [∇]Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [†]Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Harflendirme ^{a, b, c} satır bazlı, ^{x, y, z} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.

Kuraklığın 1.haftasında Selge popülasyonunun Anet değeri Bursa ve İbradı popülasyonlarından daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$;Tablo18). 2.haftada Düzce

popülasyonu diğerlerinden daha yüksek Anet'e sahiptir Kuraklığın 3.haftasında Düzce ve Deli Sarnıç popülasyonlarının Anet değerleri diğer popülasyonlardan daha yüksektir ($p<0,05$;Tablo18). Kuraklık uygulamasının 4.haftasında ise popülasyonların Anet değerleri benzer seviyelerdedir ($p>0,05$;Tablo18).



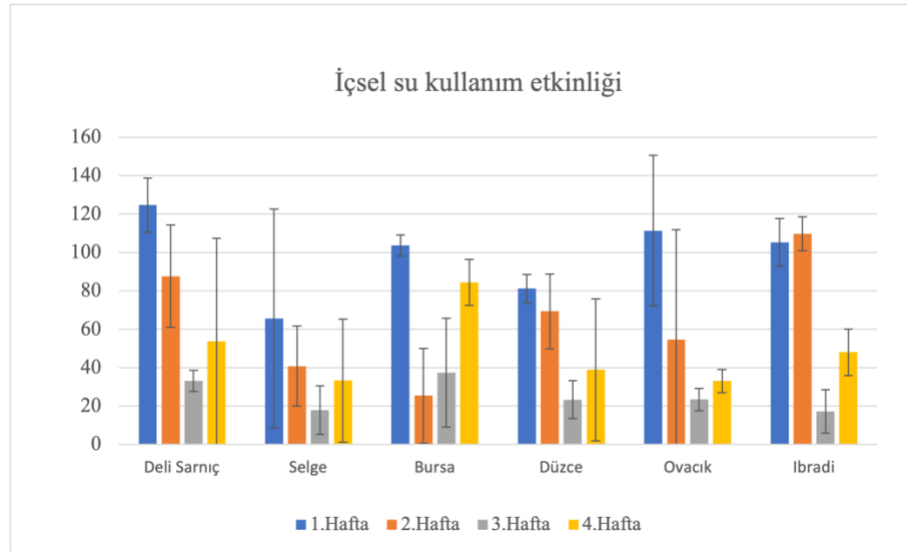
Şekil 22. Kurak grupların Anet değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.

İçsel su kullanım etkinliğine ait bulgular Tablo 20 ve Şekil 25'te verilmiştir. Kontrol gruplarının İSKE değerlerinde haftalar arası ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Tablo 20). Kuraklık stresinin 1., 3. ve 4.haftalarında popülasyonlar arası İSKE değerleri benzerdir ($p>0,05$;Tablo19). Kuraklığın 2.haftasında İbradı popülasyonunun İSKE değeri Bursa popülasyonundan yüksektir ancak 3.haftada bu değer azalarak diğer popülasyonlarla eşit seviyeye gelmiştir (Tablo19). Ayrıca kuraklık şiddetinin artması yalnızca Selge popülasyonunun İSKE'ne anlamlı bir şekilde etki etmemiştir ($p>0,05$). Kuraklığın 2.haftasında Deli Sarnıç, Bursa ve Ovacık popülasyonlarının İSKE değerlerinde azalma gözlenmiş 3.haftadan sonra bütün popülasyonların İSKE değerleri benzer seviyelere gelmiştir. Bunun yanı sıra Düzce ve İbradı popülasyonları kuraklığın 3.haftasında azalmış ve 4.haftada benzer seviyelerde kalmışlardır (Tablo19).

Tablo 20. İçsel su kullanım etkinliği değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.

		İçsel su kullanım etkinliği (İSKE, $\mu\text{mol mol}^{-1}$)						Test İstatistikleri †
		Deli Sarnıç	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	Ibradi	<i>p</i>
		<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	<i>n=4</i>	
1.HAFTA	Kontrol	64,05±34,6	60,11±43,4	57,51±18,8	63,31±9,65	67,66±46,9	54,83±31,6	0,606
	Kurak	124,6±14,13 ^{sz}	165,6±57,06	103,6±5,56 ^x	151,2±7,35 ^x	111,3±39,02 ^x	105,2±12,48 ^x	0,110
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	
2. HAFTA	Kontrol	62,36±32	65±199,1	69,69±57,05	59,2±33,09	69,84±49,73	61,04±27,79	0,738
	Kurak	187,6±26,70 ^{yab}	140,8±20,88 ^a _b	125,4±24,66 ^{ya}	169,3±19,53 ^x _{ab}	154,6±57,23 ^{yab}	109,7±8,8 ^{zb}	0,011
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	
3. HAFTA	Kontrol	69,7±44,28	68,3±84,63	67,5±110,09	69,3±46,75	64,4±54,38	70,5±38,76	0,528
	Kurak	233,1±5,46 ^z	217,9±12,66	237,4±28,34 ^y	223,349,88 ^y	223,4±5,83 ^y	217,2±11,31 ^y	0,315
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	
4. HAFTA	Kontrol	69,26±24,65	67,1±15,13	69,33±29,06	66,5±46,58	67,4±39,77	68,14±53,8	0,099
	Kurak	253,7±51,56 ^y	233,2±16,02	284,3±12,07 ^{xy}	238,8±37,93 ^x _y	233,0±5,60 ^y	248,0±12,45 ^y _z	0,141
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	<i>p</i><0,0001	
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i><0,001	<i>p</i>=0,069	<i>p</i>=0,003	<i>p</i>=0,010	<i>p</i><0,001	<i>p</i><0,001	
<i>F</i>=452,192; <i>p</i><0,001; $\eta^2=0,952$								

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [∇]Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [∇]Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [†]Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır (*p*<0,05). Harflendirme ^{a, b, c} satır bazlı, ^{x, y, z} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.



Şekil 23 Kurak grupların İSKE değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.

4.3.3. Ksilem Su Potansiyeli (KSP) Ölçümleri Sonuçları

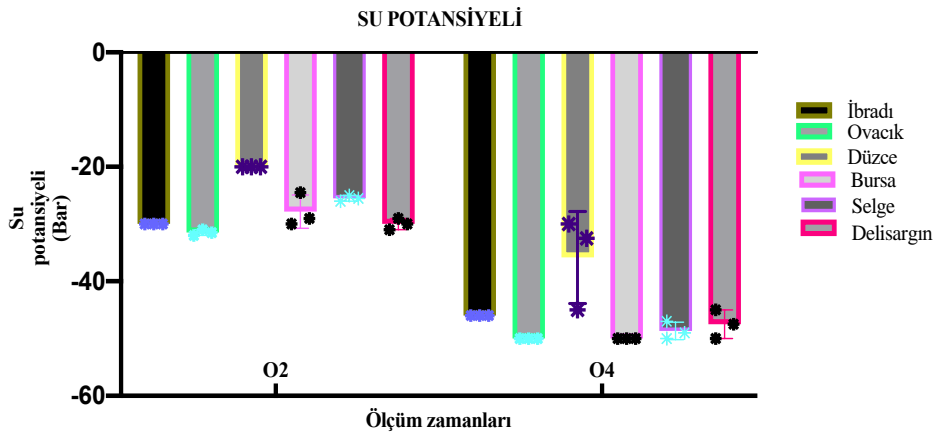
Su potansiyeli ölçümlerine ait bulgular Tablo 21 ve Şekil 26'da verilmiştir. Kontrol gruplarının KSP değerlerinde haftalar arası ve popülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ve kurak gruplarının KSP değerleri kontrol gruplarına göre önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 21). Kuraklığın 2.ve 4. haftasında popülasyonlar arasındaki KSP değerleri benzerdir ($p>0,05$;Tablo21). Elde edilen bulgulara göre kuraklık şiddetinin artması popülasyonların su potansiyelinin azalmasına neden olmuştur ($p<0,05$; Şekil 26).

Tablo 21. Ksilem su potansiyeli değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasında göre karşılaştırılması.

		Ksilem Su Potansiyeli (KSP, Bar)						Test İstatistikleri †
		Deli Sarıç	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	Ibradi	<i>p</i>
		<i>n=3</i>	<i>n=3</i>	<i>n=3</i>	<i>n=3</i>	<i>n=3</i>	<i>n=3</i>	
2.HAFTA	Kontrol	-10,5±0,7	-10,5±1,4	-10±0,7	-10,5±1,4	-14±0,7	-12,5±0,7	0,58
	Kurak	-30,0±0,57 ^x	-25,50±0,28 ^x	-27,83±1,69 ^x	-20,0±0,00 ^x	-31,5±0,28 ^x	-30,0±0,00 ^x	0,128
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	
4. HAFTA	Kontrol	-12,1±1,4	-10,9±0,7	-11,09±0,7	-10,5±0,001	-13,5±0,001	-19±0,0001	0,98
	Kurak	-47,50±1,44 ^y	-48,67±0,88 ^y	-50,00±0,00 ^y	-35,83±4,64 ^y	-50,0±0,00 ^y	-46,0±0,01 ^y	0,198
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	
Test İstatistikleri [∇]		<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001;	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	

$F=18,03$; $p<0,001$

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [∇]Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [∇]Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [†]Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Harflendirme ^{a, b, c} satır bazlı, ^{x, y, z} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.



Şekil 24. Kurak grupların su potansiyeli değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.

*** Gruplar içi karşılaştırmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade eder ($p<0,05$).

4.4. KURAKLIK STRESİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERLERE ETKİSİ

Bitkilerin kuraklık stresine karşı kendilerini koruyabilmeleri hücre sel su potansiyelini düzenleyebilecekleri osmotik düzenlemeler gerektirir. Bu düzenlemelerde prolin birikimi kuraklık stres düzeyini belirler (Yang vd., 2009).

4.4.1. Prolin Miktarı Tayini Sonuçları

Kuraklık stresi uygulanan altı farklı kestane popülasyonunun prolin miktarına ait bulgular Tablo 22 ve Şekil 27’de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre kontrol gruplarının prolin birikimlerinin popülasyonlar arasında da uygulama zamanları arasında da benzer olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). Kuraklık uygulamasının her haftasında kuraklık uygulanan bütün popülasyonlara ait fidanların prolin değerlerinin kontrollerine göre önemli oranda artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,001$). Kuraklık stresi uygulanan fidanların prolin analiz sonuçlarına göre, hem popülasyonlar arasında hem de uygulama zamanları arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmiştir ($p<0,001$; Tablo 22).

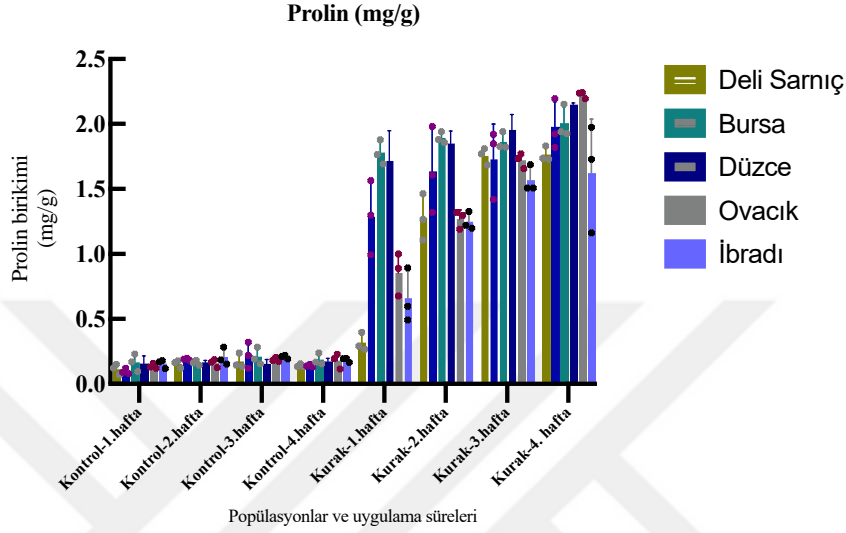
Tablo 22. Prolin değerlerinin uygulama zamanlarına ve popülasyonlar arasına göre karşılaştırılması.

		Prolin (mg/g)						Test İstatistikleri [†]
		Deli Sarınc	Selge	Bursa	Düzce	Ovacık	Ibradı	<i>P</i> değeri
		<i>n</i> =4	<i>n</i> =4	<i>n</i> =4	<i>n</i> =4	<i>n</i> =4	<i>n</i> =4	
1.HAFTA	Kontrol	0,11±0,04 ^a	0,10±0,02 ^a	0,17±0,07 ^a	0,16±0,06 ^a	0,14±0,020 ^a	0,16±0,032 ^a	<i>p</i> =0,4688
	Kurak	0,32±0,04 ^{ab}	1,29±0,16 ^{ab}	1,78±0,54 ^b	1,72±0,13 ^b	0,86±0,094 ^{ab}	0,66±0,120 ^{ab}	<i>p</i> <0,001
Test İstatistikleri [‡]		<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	
2.HAFTA	Kontrol	0,15±0,003 ^a	0,19±0,01 ^a	0,16±0,020 ^a	0,17±0,015 ^a	0,16±0,030 ^a	0,21±0,069 ^a	<i>p</i> =0,5252
	Kurak	1,28±0,18 ^{ab}	1,64±0,33 ^{ab}	1,89±0,043 ^b	1,85±0,094 ^b	1,27±0,068 ^{ab}	1,25±0,069 ^{ab}	<i>p</i> =0,0013
Test İstatistikleri [‡]		<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	
3.HAFTA	Kontrol	0,17±0,057 ^a	0,22±0,10 ^a	0,21±0,066 ^a	0,15±0,035 ^a	0,19±0,016 ^a	0,21±0,014 ^a	<i>p</i> =0,7594
	Kurak	1,76±0,064 ^{ab}	1,73±0,27 ^{ab}	1,86±0,067 ^b	1,96±0,11 ^b	1,72±0,058 ^{ab}	1,57±0,10 ^{ab}	<i>p</i> =0,0348
Test İstatistikleri [‡]		<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	
4.HAFTA	Kontrol	0,14±0,007 ^a	0,14±0,005 ^a	0,19±0,025 ^a	0,17±0,013 ^a	0,18±0,034 ^a	0,19±0,098 ^a	<i>p</i> =0,2873
	Kurak	1,77±0,056 ^{ab}	1,98±0,19 ^{ab}	2,01±0,12 ^{bc}	2,12±0,13 ^{ab}	2,11±0,02 ^{ab}	1,62±0,42 ^{ab}	<i>p</i> =0,0238
Test İstatistikleri [‡]		<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	<i>p</i> <0,005	
Test İstatistikleri [‡]		<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	

F: Karışık Desen ANOVA, Etki Büyüklüğü (η^2), [‡]Aynı ölçüm zamanında kontrol grupları ile kurak grupları arasındaki karşılaştırma; [†]Kuraklık uygulanan popülasyonların zamanları arasında karşılaştırma, [‡]Gruplar arası karşılaştırma, Tanıtıcı istatistikler *ortalama ± standart sapma* olarak verildi. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Harflendirme ^{a, b, c, d, f} satır bazlı, ^{x, y, z, t} kurak gruplar için sütun bazlı yapılmıştır. Aynı harfler arasında farklılık yoktur.

Ibradı popülasyonunda kuraklık uygulamasının ikinci haftasında prolin birikimi önceki haftaya göre artmış ve ikinci haftadan dördüncü haftaya kadar aynı değerlerde kalmıştır.

1.hafta ölçümlerinde Bursa ve Düzce popülasyonunda; 2. Hafta ölçümlerinde Selge, Bursa ve Düzce popülasyonlarında; 3. ve 4. haftalarda ise Düzce popülasyonunda prolin birikiminin diğerlerinden yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, Düzce popülasyonunun prolin birikimi açısından diğerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 25. Kurak ve kontrol grupların prolin değerlerinin uygulama zamanlarına göre karşılaştırma grafiği.
*** Gruplar içi karşılaştırmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade eder($p<0,05$).

Ayrıca, her bir popülasyonda prolin birikimi artan kuraklık süresine bağlı olarak artış göstermiştir ($p<0,001$). Bu bağlamda Deli Sarnıç popülasyonunda kuraklık uygulamasının ilk üç haftasında prolin birikimi artmış ve üçüncü ve dördüncü haftalarda ise benzer değerlerde kalmıştır ($p<0,001$). Selge, Bursa, Düzce ve Ovacık popülasyonlarında kuraklık süresinin artışı prolin birikiminde anlamlı artışa neden olmuştur ($p<0,001$).

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında Türkiye’de doğal yayılış gösteren *C. sativa*’nın 9 farklı popülasyonunun genetik çeşitliliği ISSR ve SCoT olmak üzere iki farklı iki farklı moleküler belirteç kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, ISSR primerlerinde toplamda 86 ve SCoT primerlerinde ise toplamda 100 lokus saptanmıştır. Ayrıca, toplam polimorfik lokus sayısı ISSR için 314 iken SCoT için 404 olduğu belirlenmiştir. Polimorfik lokuslar, DNA dizilimindeki varyasyonlar sonucu oluşurlar. Farklı belirteçler, farklı tipteki varyasyonları (örneğin, baz değişiklikleri, eklemeler, eksilmeler) tespit edebilir. Bu da polimorfik lokus sayısındaki farklılıklara neden olabilir (Ku vd., 2010). Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan belirteçler, farklı genetik bölgeleri hedef aldığından farklı polimorfik lokusların tespit edilmesine yol açmıştır. Popülasyon bazında yapılan genetik çeşitlilik analizine göre ortalama polimorfik lokus oranı ISSR ve SCoT belirteçlerinde sırasıyla %40,56 ve %49,11 olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra ISSR ve SCoT belirteçlerinde %58,14 ve %71 oranı ile Düzce popülasyonu en yüksek polimorfik lokus oranına sahip olduğu ve bu değerlerin ortalama polimorfik lokus oranlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürde *C. sativa* için ISSR ve SCoT belirteçlerinin birlikte bulunduğu çalışmaya rastlanmamış olmasına rağmen çeşitli türlerde yapılan ISSR ve SCoT belirteçlerinin birlikte bulunduğu çalışmalar SCoT belirteçlerinin daha yüksek ortalama lokus oranına sahip olması bakımından bizim çalışmamızla uyumludur (Xiao vd.,2020; Motahari vd.,2021; Tikendra vd.,2021; İgwe vd.,2021). Diğer yandan Casasoli vd. (2001), *C. sativa*’nın Bursa ve Hopa popülasyonlarını RAPD, ISSR ve izozim markörlerine dayalı genetik bağlantı haritasını oluşturduğu araştırmasında ISSR (polimorfik bant/primer=3.0) tarafından ortaya çıkarılan polimorfizm seviyesinin RAPD (polimorfik bant/primer=2.6) primerleri tarafından tespit edilen polimorfizmden daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Bunun yanı sıra Alcaide vd. (2022)’nin çalışmasında İspanya’nın farklı iklim koşullarına sahip bölgelerindeki dört doğal *C. sativa* popülasyonundan (Bergongo, Hervás, Constantina ve Montseny) alınan 136 ağaç genotipinin EST-SSR genetik belirteçleri adaptif çeşitliliğini ve kuraklığa toleransını değerlendirmiştir. Araştırmacılar, sekiz adet yüksek düzeyde polimorfizm gösteren EST-SSR primerlerinden heterozigotluk (0.471) ve özel alel sayısı bakımından (11) en yüksek çeşitlilik düzeyine sahip olan Bergondo (kuzey popülasyonu)’nun polimorfik özellik

gösteren tek popülasyonun olduğu bildirilmiştir (Alcaide vd.,2022). Diğer yandan genetik çalışmalarda, belirteç kalitesinin göstergelerinden biri olan moleküler belirteçlerin polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) değerleri popülasyonun bireyleri arasındaki polimorfizmi tespit etmek için kullanılır. Eş baskın veya baskın belirteçler için PBİ değerleri 0 ile 1 arasında değişir ve elde edilen değer ne kadar yüksekse belirtecin o derece anlamlı olduğu anlamına gelir. PBİ değeri 0,5'ten büyük olan belirteçlerin çok bilgilendirici olduğu, 0,25 ile 0,50 arasındaki değerlerin bilgilendirici olduğu, 0,25' ten düşük olan değerlerin ise çok bilgilendirici olmadığı bildirilmiştir (Bostein vd.,1980). Bu bağlamda, çalışma kapsamında kullanılan 11 ISSR ve 14 SCoT belirteçlerinin *C. sativa* türü için "bilgilendirici belirteç" kapsamında olduğu belirlenmiştir. Literatürde bizim çalışmamızda olduğu gibi ISSR ve SCoT markör sistemlerini kullanarak farklı bitki türlerinin genetik çeşitliliğinin değerlendirmesini kapsayan çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen kestane türü için bu iki belirteçin beraber kullanıldığı bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda tartışma farklı bitki türleri üzerinden yapılmıştır. Çalışmamıza paralel olarak, kestane ile aynı familyada (Fagaceae) olan mazi meşesi (*Quercus infectoria*)' nin 10 popülasyonu için yapılan bir çalışmada kullanılan ISSR ve SCoT belirteçlerinin ortalama PBİ değerlerinin sırasıyla 0,35 ve 0,37 olarak bulunduğu (Rahmani vd., 2015) ve Fagaceae familyasına ait İran meşesi (*Quercus brantii*)'nin 125 genotipi için ise ISSR ve SCoT belirteçlerinin sırasıyla 0,30 ve 0,38 olduğu (Alikhani vd., 2014) bildirilmiştir. Bu çalışmaların aksine bizim çalışmamızda *C. Sativa* genotipleri için ISSR belirteçlerinin ortalama PBİ değerleri daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca Abdelhamid vd. (2014)'nin yaptığı bir çalışmada, İsviçre, Fransa, İtalya ve Asya çeşitlerine ait *C. Sativa*, *C. crenata*, *C. mollissima* türleri arasındaki ve içindeki genetik değişkenliği tespit etmek için 4 DNA markörü (RAPD, ISSR, AFLP ve SSR) kullanılmış ve AFLP'nin kestane genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi için etkili bir moleküler markör sistemini temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Diğer yandan çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, her iki belirteç için de popülasyon bazında gözlenen en yüksek alel sayısı, etkili alel sayısı, Nei gen çeşitlilik indeksi ve Shannon Bilgi indeksi değerleri Düzce popülasyonunda olduğu ve bu parametrelerinin SCoT belirteçlerinde ISSR'a göre daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, Mattioni vd (2013)'nin Avrupa ülkelerinde doğal *C. Sativa* meşcereleri için ISSR markörü ile elde edilen Fransa, Yunanistan, İtalya ve İspanya için Nei (1978)'nin gen çeşitliliği değerlerini sırasıyla 0.202; 0.2195; 0.2348 ve 0.2176

olarak ve polimorfik lokus değerlerini ise sırasıyla %61.64; %67.12; % 71.69; %63.45 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda ISSR markörü ile elde edilen bulgularda Türkiye'nin Düzce bölgesine ait *C. sativa*'nın genetik çeşitlilik değeri (0.228) Mattioni vd. (2013)'in çalışmasındakinden daha yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada, moleküler varyans analizi (AMOVA) analizi var olan genetik çeşitliliğin popülasyon içi, popülasyonlar arasında ne oranlarda dağıldığını görebilmek amacı ile yapılmıştır. ISSR için yapılan AMOVA sonuçlarına göre popülasyonlar içerisinde %62 oluşan varyasyon, popülasyonlar arası %38 olarak; SCoT ile yapılan sonuçlara göre ise genetik çeşitlilik popülasyonlar içerisinde %52 oluşan varyasyon, popülasyonlar arası %48 olarak bulunmuştur. Hem ISSR hem de SCoT belirteçleri kullanılarak belirlenen genetik çeşitliliğin popülasyon içinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. AMOVA, popülasyon genetiği çalışmalarında moleküler varyasyonun ölçümü için kullanılan bir istatistik modelidir (Huang vd., 2021). Popülasyonların kısmi veya tam izolasyonu, genetik sürüklenme, diferansiyel gen akışı ve doğal seçim nedeniyle genetik farklılaşma ile sonuçlanır (Lande, 1976). Çünkü coğrafi uzaklık (Wright 1943), peyzaj özellikleri (örneğin daę, nehir, çöl) (Lait & Burg 2013), ekolojik faktörler (örneğin tuz konsantrasyonu, iklimsel gradyanlar) (Luppi vd. 2003; Yang vd. 2014), popülasyonlar arasında farklılık gösterecek, popülasyonlar arasındaki gen akışı eşit olmayan bir şekilde dağılacaktır. Kısaca, AMOVA bir genetik veri setindeki popülasyon kümelenmesini tespit etmek için kullanılmaktadır (Dupanloup vd., 2002; Meirmans, 2012). Abdelhamid vd. (2014), İsviçre, Fransa, İtalya ve Asya çeşitlerine ait 73 *C. Sativa*, *C. crenata*, *C. mollissima* türleri arasındaki ve içindeki genetik değişkenliği tespit etmek için 4 DNA markörü (RAPD, ISSR, AFLP ve SSR) kullandıkları bir çalışmada grup içi varyans analizinin gruplar arasına göre RAPD (%32.13) ve ISSR (%36.73) belirteçlerinde daha düşük olduğunu belirtmiştir. Bu düşüklüğün sebebinin türlerin coğrafi kökenlerine bağlı olabileceğini belirten araştırmacılar elde edilen sonuçlara göre ISSR belirteçlerinin RAPD'e göre daha bilgilendirici nitelikte olduğunu bildirmiştir (Abdelhamid vd., 2014). Genel olarak, orman ağacı türleri popülasyonlar içinde yüksek, popülasyonlar arasında ise düşük düzeyde genetik çeşitlilik göstermektedir (Hamrick vd., 1992; Alikhani vd., 2014; Míguez-Soto vd., 2019, Motahari vd., 2021). Bu bağlamda sonuçlarımızı literatür ile uyumludur.

Bir organizmanın genomunda her gen, o gen için lokus adı verilen belirli bir yerde bulunur. Bu lokuslardaki alelik varyasyonlar türler içinde fenotipik varyasyona neden olur (örneğin saç rengi, göz rengi). Bununla birlikte, çoğu alelin fenotip üzerinde

gözlemlenebilir bir etkisi yoktur. Bir popülasyon içinde mutasyonla oluşan yeni aleller ya yok olur ya da popülasyon boyunca yayılır. Bir popülasyon farklı izole popülasyonlara bölündüğünde (coğrafi veya ekolojik faktörler nedeniyle), bölünmeden sonra meydana gelen mutasyonlar yalnızca izole popülasyonda mevcut olacaktır. Alel frekanslarının rastgele dalgalanması da popülasyonlar arasında genetik farklılaşma yaratır. Popülasyonlar arasındaki alel frekansları arasındaki farkları inceleyerek ve genetik mesafeyi hesaplayarak, iki popülasyonun ne kadar zaman önce ayrıldığını tahmin edebiliriz (Nei, 1972). Bu bağlamda çalışma kapsamında Nei (1978)'nin genetik uzaklık dendogramı bulgularına göre dokuz farklı kestane popülasyonu için kullanılan ISSR ve SCoT belirteçlerinde iki kümeye ayrıldığı gözlenmiştir. SCoT' a ait dendogram incelendiğinde Deli Sarnıç ve Kütahya popülasyonu diğer popülasyonlardan ayrılmışken ISSR' da yalnızca Kütahya popülasyonu diğer popülasyonlardan ayrılmıştır. Ayrıca popülasyon yapısı için kullanılan STRUCTURE programında ISSR primerleri ile iki farklı ($\Delta K=2$) ve SCoT primerleri ile üç farklı ($\Delta K=3$) gen havuzu elde edilmiştir. ISSR belirteçleri ile elde edilen sonuçlara göre, Kütahya ve Deli Sarnıç popülasyonları bir kümede, Bursa, Düzce, İbradı, Ordu, Trabzon, Selge ve Ovacık popülasyonları ise ikinci bir kümede gruplandırırken SCoT belirteçleri Kütahya, Trabzon ve Deli Sarnıç popülasyonları birinci kümede; Bursa ve İbradı Popülasyonları ikinci bir kümede ve Düzce, Ordu, Selge ve Ovacık popülasyonlarını ise üçüncü bir kümede gruplandırmıştır. Genetik verilerde farklı varyasyonlar bulunabilir farklı belirteçler rastgele varyasyonlara maruz kalabilir ya da farklı belirteçler farklı gen gruplarını hedef alabilir bu da elde edilen küme sayısının farklı olmasına neden olabilir. ISSR ve SCoT'nin UPGMA dendogramı küçük sapmalarla genotiplerin benzer şekilde gruplandırılmasını sağlamıştır. Genotiplerin kümelenmesindeki sapma, hedef genomun boyutundaki farklılıklar nedeniyle ortaya çıkabilir (Costa vd., 2016). Bu çalışmadaki kümelenme modelinde SCoT ve ISSR belirteçlerinin lokasyon spesifikliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürde ISSR ve SCoT belirteçleri kullanılarak amplifiye edilen *C. sativa* genotipleri için popülasyon yapısı ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sonuçlar farklı bitki ve/veya markör türleri üzerinden tartışılmıştır. Tikendra vd. (2021), bir orkide türü olan *D. chrysotoksum*'un 11 popülasyonunun genetik çeşitliliğini ISSR ve SCoT mörkerleri kullanarak araştırdığı çalışmada hem ISSR hem de SCoT belirteçleri için popülasyonlarda yüksek derecede karışıma sahip üç ($K=3$) gen havuzu belirlendiğini bildirmiştir. Alcaide vd. (2022), İspanya'nın farklı iklim koşullarına sahip bölgelerindeki dört doğal *C. sativa* popülasyonundan (Bergongo, Hervás, Constantina ve Montseny)

alınan 136 ağaç genotipinin EST-SSR genetik belirteçleri adaptif çeşitliliğini ve kuraklığa toleransını değerlendirdiği çalışmada popülasyon yapısı (STRUCTURE) analizinde iki ($K = 2$) gen havuzu tespit edildiğini ve kümeler arasında sınırlı karışım ile kuzey-güney coğrafi modeline karşılık gelen iki ana gruba ayırdığını bildirmiştir. Her kümedeki popülasyonların karışım oranı (Q) ile değerlendirilen üyelik yüzdesini kuzey popülasyonları Bergondo ve Montseny'nin I. kümede (sırasıyla 0,87 ve 0,69 Q değerleri) ve güney popülasyonları Hervás ve Constantina'nın II. kümede (sırasıyla 0,92 ve 0,80 Q değerleri) gruplandırılmıştır. Ayrıca EST-SSR belirteçlerine dayalı olarak Constantina ve Bergondo popülasyonları arasındaki net ayrım fenotipik ölçümlere dayalı olarak yaprak semptomlarında gözlenen önemli farkla uyumlu olduğu ve Constantina fideleri su yoksunluğundan sonra en düşük 'yaprak solması' değerlerine sahipken, Bergondo fideleri en yüksek değerlere sahip olduğu ve *C. sativa* popülasyonunda kuraklığa yanıtta önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasının ikinci bölümü için kestane fidanlarının iklim değişikliğine karşı bölgesel adaptasyonlarının belirlenmesi kapsamında fizyolojik ve biyokimyasal ölçümler yapılmıştır. Çalışmamızda düzenli sulanan kontrol gruplarının su potansiyeli değerleri -10,5Bar (-1,05MPa) ile -19Bar (-1,9MPa) arasında olduğu gözlenmiştir. Kuraklık stresinin ikinci haftasındaki su potansiyeli değerlerinin -20Bar (-2,0MPa) ile -30Bar (-3,0MPa) arasında olduğu ve fidanların kuraklık stresinden etkilendikleri söylenebilir. Kuraklığın dördüncü haftasında ise fidanların su potansiyeli değerleri -35 Bar (-3,5MPa) ile -50 Bar (-5,0MPa) arasında olduğu belirlenmiştir. Su potansiyeli toprakta ya da bir bitkide bulunan 1 mg suyun potansiyel enerji durumunu ifade etmek için kullanılan terimdir (Kramer, 1969; Waring ve Running, 1998; Kirkham, 2014; Lambers ve Oliveira, 2019, Sargıncı vd., 2022). Bitki su potansiyeli topraktaki nem miktarına, fidanın suyu alma kapasitesine, ve stomaların kapanarak nem kaybını kontrol edebilme yeteneğine bağlıdır (McDonald, 1984; Kaçar vd., 2009). Kuraklık stresi altındaki ağaçların, gün doğumu su potansiyeli -1,5 MPa'dan -8,0 MPa'a kadar düşebildiği hatta bazen benzer şartlar altında stomaların kapalı kalmasından dolayı daha da küçük değerlere indiği bildirilmiştir (Waring ve Running, 1998; Sargıncı vd., 2022). Sonuç olarak çalışmamızdaki her popülasyonun uygulamanın 4.haftasında kuraklıkla mücadele edebilmek için stomalarını kapattığını ve bu nedenle en düşük su potansiyeli değerlerine sahip olduğu söylenebilir. Her iki ölçüm zamanında da su potansiyeli bakımından popülasyonların arasında önemli bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Bu bağlamda bizim sonuçlarımıza paralel olarak Camisón vd. (2020) kuraklığa toleranslı *C. sativa* fidelerinde

artan kuraklık stresine bağı olarak bağı su içeriğinde azalma meydana geldiğini bildirmiştir. Bunun yanı sıra, Atta vd. (2012)'in çalışmasında bir çalı türü olan (*Acacia ehrenbergiana* H.) ve Afrika akasyası (*Acacia tortilis* subsp.) fidanlarında yaprak su potansiyelini kuraklık uygulaması ile azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, kuraklık stresli Arizona külü (*Fraxinus velutina* Torr) ve Fagaceae familyasına ait meşe cinsine ait *Quercus lobata* Née türlerinde de gün ortası su potansiyelinin kontrol fidanlarından azaldığını bildirilmiştir (Balok ve Hilaire, 2002). Ayrıca; Wu vd. (2013), Fagaceae familyasına ait bir meşe cinsinde (*Quercus variabilis* Bl) kuraklık stresinin artması ile yaprak su potansiyelinin azaldığını bildirmiştir. Kuraklık stresinin artması ile su potansiyeli değerlerinin azaldığını bildiren bu çalışmalar bizim bulgularımızla paraleldir. Canlılar için hayati öneme sahip olan klorofil, fotosentezin ana etken maddesidir ve bitkideki klorofil miktarı, başta saha koşulları, sıcaklık ve bitki türleri olmak üzere çeşitli çevresel faktörlere karşı çok hassas tepkiler gösterebilmektedir (Atar vd., 2020). Kuraklığın neden olduğu azot eksikliği, yaprak alanının, klorofil pigmentinin azalmasına yol açarak fotosentezi olumsuz etkilemektedir (Samborski vd., 2009; Fang ve Xiong 2014; Hikosaka 2004; Bojović ve Marković 2009). Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre kuraklık stresinin artması Deli Sarnıç hariç diğer popülasyonlarda klorofil miktarında azalmaya neden olmuştur. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak çeşitli çalışmalar, kuraklık süresinin artması ile klorofil miktarlarında düşüş meydana geldiğini bildirilmiştir (Da Silva-Pinheiro vd., 2016; Atar vd., 2020; Hosseini vd., 2020). Kuraklık stresi altında klorofil miktarının azalması, bitkilerin fotosentez yeteneğini sınırlar ve genel bitki sağlığını olumsuz etkiler. Kuraklığa duyarlı ve kuraklığa dayanıklı bitkiler su kütliğine yanıt olarak farklı stoma hareketleri sergiler (Pinheiro vd.,2011). Stoma iletkenliğinin, su kullanım etkinliği, net fotosentez, terleme gibi birçok fizyolojik parametre ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Ansari vd., 2019). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre kuraklık şiddetinin artması Deli Sarnıç ve Selge popülasyonlarının stoma iletkenliği ve terleme değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Net fotosentez değerlerinde ise kuraklık şiddetinin artması Selge popülasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmazken Deli Sarnıç popülasyonu kuraklığın 3.haftasında önemli ölçüde daha az net fotosentez değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Fotosentez ve diğer bazı ilgili fizyolojik özelliklerin kuraklığa toleranslı ve duyarlı genotipler arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Bazı popülasyonlar doğal olarak diğerlerine göre kuraklığa daha toleranslıdır ve kurak ortamlara daha uygun oldukları açıktır (Gomes-Laranjo vd., 2006). Bu bilgiler ışığında Akdeniz ekotipine ait bu iki popülasyonun kurak

koşullara doğal olarak adaptasyon sağlamış olabileceği söylenebilir. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, Eriksson vd. (2005), *C.sativa*'nın Akdeniz ekotiplerinin kuraklığa karşı daha toleranslı olabileceğini bildirmiştir. Diğer yandan kuraklık stresi, Düzce ve İbradı popülasyonlarında stoma iletkenliği, terleme, net fotosentez değerlerinde farklı değişikliklere sebep olmuştur. Elde edilen bu bulgular Düzce ve İbradı popülasyonlarının kuraklığa adaptasyon sağlayabilmek için stomalarını zaman zaman açıp kapatarak hayatta kalmaya çalıştığının göstergesi olabilir. Bunu kuraklığın 4.haftasında Düzce, İbradı ve Selge popülasyonlarına ait fidanların yapraklarında canlılığın daha fazla olması da desteklemiştir. Ayrıca, bizim çalışmamızla ortak popülasyonları içeren ve düzenli sulanarak yaprak gaz değişim parametrelerini ölçen bir çalışmadan elde edilen sonuçlarda da İbradı popülasyonunun değişen iklim koşullarına daha yüksek adaptasyon potansiyelinin olduğu belirtilmiştir (Cantürk vd., 2023). Literatürdeki bu çalışma, İbradı popülasyonunun kuraklığa adaptasyon potansiyelinin yüksek olması bakımından bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca Beyazyüz ve Kulaç (2023)'in 3+0 yaşındaki 6 *C.sativa* popülasyonuna kuraklık uygulayarak yaprak gaz değişim ve prolin parametrelerinin değerlendirildiği çalışmada İbradı popülasyonunun kuraklığa adaptasyon potansiyelinin daha yüksek olması bizim çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. Diğer yandan Bursa popülasyonunun kuraklık stresine karşı adaptasyon sağlamaya çalıştığı stoma iletkenliği, terleme, net fotosentez, su kullanım etkinliği parametrelerindeki dalgalanmalarla desteklenmiş olsa da bu popülasyona ait fidanlar çalışmanın 4.haftasında tamamen kurumuştur. Bu nedenle Bursa popülasyonunun kuraklığa duyarlı olduğu söylenebilir. Kuraklık stresi altında bitkilerin stoma iletkenliğinin düşük olduğunu bilinmektedir. Kuraklık stresine bağlı stoma kapanması fotosentez için bir kısıtlama olsa da, su kaybını önlemek için etkili bir mekanizma olarak kabul edilir (Ansari vd., 2019). Bitkiler stresle başa çıkmak için aminoasitler olmak üzere çeşitli metabolitler biriktirir (Liang vd., 2012; Torun, 2019). Prolin, bitkilerin osmotik dengeyi korumasına, hücresel yapıları stabil tutmasına ve oksidatif stresle savaşmasına yardımcı olan aminoasittir ve strese maruz kalan bitkilerde birikim gösterir (Ghosh vd., 2022). Çalışmamızın prolin ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre, kuraklık şiddetinin artması her popülasyonda önemli ölçüde prolin birikimine neden olmuştur ($p<0,05$). Kuraklığın 1., 3. ve 4.haftasında Düzce popülasyonunun prolin birikiminin diğerlerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Birçok bitki türü stres altında prolin birikimi stres toleransı ile ilişkilendirilmiştir ve prolin konsantrasyonunun genellikle strese toleranslı bitkilerde

strese duyarlı bitkilerden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Anjum vd., 2011). Bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre Düzce popülasyonu diğer popülasyona göre kuraklığa adaptasyon geliştirdiği söylenebilir. Artan prolin seviyeleri bitkilerin düşük su potansiyellerini korumalarını kolaylaştırır. Uyumlu osmolitlerin birikimi, bir organizmanın iç ortamını sabit bir osmotik basınçta tutmak için su alımı, su kaybı, tuz alımı ve tuz kaybını düzenlemesini içeren osmoregülasyonu sürdürmek için çevreden ek su alınmasına izin veren su potansiyelini azaltır, böylece organizma içindeki su açığının müdahale edici etkisine direnir. (Ansari vd., 2019). Bu bağlamda, Su ve Wu, (2004) transgenik pirinç bitkileri $\Delta 1$ -pirolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) cDNA'sının ekspresyonunun aşırı ifade eden transgenik *Oryza sativa*'da tuz ve su eksikliği toleransının arttığını, bunun da P5CS mRNA ve prolin birikimine yol açtığını bildirmiştir. Transgenik bitkilerde prolin biyosentezinde yer alan abiyotik stres tolerans genlerinin indüklenmiş ifadesi rapor edilmiştir. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde çeşitli bitkilerle yapılan çalışmalarda da kuraklık uygulanan bitkilerin prolin seviyelerinde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Shvaleva vd.,2005; Yang vd.,2009; Kulaç, 2010; Dien vd.,2019; Zhao vd.,2021; Yalçın vd.,2022).

Sonuç olarak fizyolojik ve biyokimyasal ölçümlerden elde edilen bulgular, güney popülasyonlarının (İbradı, Deli Sarnıç ve Selge) genel olarak kuraklığa toleranslı ve Bursa popülasyonunun ise kuraklığa duyarlı olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra Düzce popülasyonunun da kuraklığa tolerans geliştirdiği belirlenmiştir. Moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal verilerinden elde edilen bulgular ışığında, Düzce popülasyonunun kuraklığa tolerans seviyesinin yüksek olması daha yüksek genetik çeşitliliğe sahip olmasından kaynaklanmıştır. Bu bağlamda Düzce popülasyonunun kuraklığa adaptasyon geliştirdiği söylenebilir. Sonuç olarak yapılacak koruma genetiği ve ıslah çalışmalarında Düzce popülasyonu önerilebilir.

6. ÖNERİLER

Çalışma kapsamında kullanılan 180 *C.sativa* genotipinin genetik çeşitlilik değerlendirmesinde ISSR ve SCoT belirteçlerinin birbirleri ile uyumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra toplam lokus sayısı, polimorfik lokus sayısı, polimorfizm bilgi içeriği ve genetik çeşitlilik parametreleri sonuçları SCoT belirteçlerinin *C. sativa* popülasyonları arasındaki genetik ilişkileri belirlemede ISSR'a göre daha avantajlı olduğu söylenebilir. Bu bağlamda *C. sativa* için genetik çeşitlilik çalışmalarında SCoT belirteçlerinin kullanılması önerilebilir. Çalışma kapsamında kullanılan her iki belirteç sonuçlarında da Düzce popülasyonunun genetik çeşitliliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, küresel iklim değişikliği sürecinde olası tür ve popülasyon kayıplarının azaltılması için meydana gelecek iklimsel değişikliklere karşı türlerin vereceği tepkilerin önceden belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle orman, tarım ve peyzaj çalışmalarında kuraklığa dayanıklı orijinlerin belirlenmesi ve kullanılması küresel iklim değişikliğine uyum sağlamada büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda çalışma kapsamında kuraklığa maruz bırakılan Bursa, Düzce, Ovacık, İbradı bölgelerine ait kestane popülasyonlarının kuraklık stresine karşı farklı tolerans geliştirdiği söylenebilir. Aynı ekolojik koşullardaki altı kestane popülasyonunda görülen bu farklılıklar popülasyonların fotosentetik adaptasyonundaki genetik varyasyon düzeyi ile ilgili olabilir. Ayrıca, Deli Sarnıç ve Selge popülasyonlarının artan kuraklık koşullarında fizyolojik parametrelerinde önemli değişikliklerin meydana gelmemesi ve kuraklık uygulamalarının sonunda bu popülasyonların fidanlarının canlı yapraklara sahip olması Akdeniz ekotipindeki bu popülasyonların kuraklığa tolerans geliştirmiş olabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra elde edilen sonuçlara göre İbradı ve Düzce popülasyonlarının kuraklık uygulama zamanlarında fizyolojik olarak çeşitli değişiklikler yaptığı gözlenmiştir. Bu fizyolojik değişiklikler kurak şartlara tolerans geliştirmeye çalıştığından dolayı olabilir. Ayrıca Düzce ve İbradı popülasyonlarının kuraklık süresi sonunda hala canlı yapraklarının olması bu popülasyonların kuraklığa dayanabildiklerini desteklemiştir. Buna ek olarak genetik çeşitlilik seviyesinin de Düzce popülasyonunda daha yüksek olması ve kuraklık uygulamasının sonunda bu popülasyona ait fidanların hala canlı yapraklara sahip olması bu popülasyonun kuraklığa adaptasyon geliştirmiş olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan kuraklık uygulaması sonunda Bursa popülasyonu tamamen kurumuşken diğer popülasyonların farklı olmakla birlikte

canlılığını devam ettirdiği gözlenmiştir. Bu da Bursa popülasyonunun kuraklığa dayanamadığını göstermektedir.

Bu bağlamda, Düzce popülasyonu genetik faktörlerden kaynaklanan yok olma riskini en aza indirmeyi amaçlayan koruma genetiği çalışmaları ve ıslah çalışmaları için önerilebilir. Ayrıca, kurak koşullara daha dayanıklı kestane genotipi elde etmek için çeşitlilik seviyesi ve adaptasyon potansiyeli yüksek olan Düzce popülasyonu ile on adaptasyon potansiyeli yüksek olan İbradı popülasyonlarının hibritlenmesi önerilebilir. Kuraklık stresine karşı fizyolojik değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar yalnızca fidanlar üzerinden yapılmıştır. Çevresel strese tolerans ağaçların ömrü boyunca değişebileceğinden kuraklık stresine alışma çeşitliliği de ağaçların ve ormanların yaşına bağlı olarak değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmanın daha fazla kestane popülasyon ve daha çok belirteç kullanılarak yapılması önerilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Abdelhamid, S., Lê, C. L., Conedera, M., ve Kuepfer, P. (2014). The assessment of genetic diversity of *Castanea* species by RAPD, AFLP, ISSR, and SSR markers. *Turkish Journal of Botany*, 38(5), 835-850.
- Aksoy, H., Serdar, Ü., & Soylu, A. (2005). Kestane Fidanlarında Kansere (*Cryphonectria Parasitica* (Murrill) Barr) Karşı Yapılan Uygulamalar. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1), 24-29.
- Al-Hadeithi, Z. S., ve Jasim, S. A. (2021). Study of plant genetic variation through molecular markers: An overview. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(45B), 464-473.
- Alcaide, F., Solla, A., Cuenca, B., and Martín, M. Á (2022). Molecular evidence of introgression of Asian germplasm into a natural *Castanea sativa* forest in Spain. *Forestry* 95, 95–104. doi: 10.1093/forestry/cpab030
- Alessandri, S., Cabrer, A. M. R., Martín, M. A., Mattioni, C., Pereira-Lorenzo, S., ve Dondini, L. (2022). Genetic characterization of Italian and Spanish wild and domesticated chestnut trees. *Scientia Horticulturae*, 295, 110882.
- Alessandri, S., Krzmar, M., Ajolfi, D., Cabrer, A. M. R., Pereira-Lorenzo, S., and Dondini, L. (2020). Genetic Diversity of *Castanea sativa* Mill. Accessions from the Tuscan-Emilian Apennines and Emilia Romagna Region (Italy). *Agronomy* 10:1319.
- Alikhani, L., Rahmani, M. S., Shabanian, N., Badakhshan, H., ve Khadivi-Khub, A. (2014). Genetic variability and structure of *Quercus brantii* assessed by ISSR, IRAP and SCoT markers. *Gene*, 552(1), 176-183.
- Alzahrani, O. R., Alshehri, M. A., Alasmari, A., Ibrahim, S. D., Oyouni, A. A., ve Siddiqui, Z. H. (2023). Evaluation of genetic diversity among Saudi Arabian and Egyptian cultivars of alfalfa (*Medicago sativa* L.) using ISSR and SCoT markers. *Journal of Taibah University for Science*, 17(1), 2194187.
- Anderson, J. T., Willis, J. H., ve Mitchell-Olds, T. (2011). Evolutionary genetics of plant adaptation. *Trends Genetics*. 27, 258–266. doi: 10.1016/j.tig.2011.04.001
- Anić, M. (1942). O rasprostranjenosti evropskog pitomog kestena s osobitim obzirom na nezavisnu državu Hrvatsku i susjedne zemlje, Tiskara C. Albrecht (*P. Acinger*).
- Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal Of Agricultural Research*. 6(9):2026–2032.
- Anonim, (2013). Kestane Eylem Planı (2013-2017). Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara.

- Ansari, W. A., Atri, N., Pandey, M., Singh, A. K., Singh, B., & Pandey, S. (2019). Influence of drought stress on morphological, physiological and biochemical attributes of plants: A review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 16(4), 697-709.
- Anyia, A. O., & Herzog, H. (2004). Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*, 20(4), 327-339.
- Atar, F., Güney, D., Bayraktar, A., Yıldırım, N., & Turna İ. (2020). Seasonal change of chlorophyll content (spad value) in some tree and shrub species, *Turkish Journal of Forest Science*, 4(2), 245- 256.
- Atasoy, E. & Altıngöz, Y. (2011). Dünya ve Türkiye'de Kestanenin Önemi ve Üretimi. *Coğrafya Dergisi*, 1(22), 1-13.
- Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*. Springer Science & Business Media.
- Avtzis, D. N., G. Melika, D. Matošević & D. R. Coyle, 2019. The Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*: A global invader and a successful case of classical biological control. *Journal of Pest Science*, 92 (1): 107-115.
- Bahadur, A., Chatterjee, A., Kumar, R., Singh, M., Naik, P.S. (2011). Physiological and biochemical basis of drought tolerance in vegetables. *Vegetable Science* 38(1) : 1-16.
- Balok, C. A., & Hilaire, R. S. (2002). Drought responses among seven southwestern landscape tree taxa. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(2), 211-218.
- Baptista, P., Martins, A., Tavares, R. M., & Lino-Neto, T. (2010). Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region (Northeast Portugal). *Fungal Ecology*, 3(1), 9-19.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., ve Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Bellat, J.-L.; Dasue, J.; Guérin, B.; Gomes-Laranjo, J.; Fernandez, J.; Castelloti, T.; Beccaro, G.; Forget, L. European Chestnut White Paper. (2019). Available online: <http://www.eurocastanea.org/> (E.T. 22 Mart 2021).
- Bhattacharyya P, Kumaria S, Kumar S, Tandon P (2013). Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobiumnobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. *Gene* 529(1):21–26.
- Bian, S. C., Lu, Y. N., Xu, W. J., Chen, B. Q., Wang, G. L., & Xiong, A. S. (2021). Garlic circadian clock genes *AsRVE1* and *AsRVE2* and their expression analysis under osmotic stress. *Acta Horti Sin*, 48, 1706-1716.
- Bitá ,C., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front Plant Sci* 4:273

- Bojović, B., & Marković, A. (2009). Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Kragujevac Journal of Science*, 31(5827), 69–74.
- Bornet B, Branchard M.(2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Report*.19(3):209–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772892>.
- Bostein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Bouffartigue, C., Debille, S., Fabreguette, O., Cabrer, A. R., Pereira-Lorenzo, S., Flutre, T., vd. (2020). High admixture between forest and cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in France.
- Bowditch, E., Santopuoli, G., Neroj, B., Svetlik, J., Tomlinson, M., Pohl, V., ... & Azevedo, J. C. (2022). Application of climate-smart forestry—Forest manager response to the relevance of European definition and indicators. *Trees, Forests and People*, 9, 100313.
- Camisón, Á, Ángela Martín, M., Dorado, F. J., Moreno, G., & Solla, A. (2020). Changes in carbohydrates induced by drought and waterlogging in *Castanea sativa*. *Trees Struct. Funct.* 34, 579–591. doi: 10.1007/S00468-019-01939- X/FIGURES/6
- Casasoli, M., Mattioni, C., Cherubini, M., ve Villani, F. (2001). A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and applied genetics*, 102, 1190-1199.
- Chang, S. X., & Robison, D. J. (2003). Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *Forest Ecology and Management*, 181(3), 331-338.
- Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant Cell Reports*, 41(1), 1-31.
- Chaves, M.M.; Maroco, J.P. & Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 239-264. ISSN: 1445-4408.
- Chen, Z., Cuin, T. A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B. P., & Shabala, S. (2007). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), 4245-4255.
- Chhajer, S., Jukanti, A.K., & Kalia, R.K. (2017). Start codon targeted (SCoT) polymorphism-based genetic relationships and diversity among populations of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem—an endangered timber tree of hot arid regions. *Tree Genet Genomes* 13:84.
- Choudhury, A., Deb, S., Kharbyngar, B., Rajpal, V. R., & Rao, S. R. (2022). Dissecting the plant genome: through new generation molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(8), 2661-2698.
- Chung, M. Y., Merilä, J., Li, J., Mao, K., López-Pujol, J., Tsumura, Y., ve Chung, M. G. (2023). Neutral and adaptive genetic diversity in plants: An overview. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1116814.

- Ciordia, M., Feito, I., Pereira-Lorenzo, S., Fernández, A., ve Majada, J. (2012). Adaptive diversity in *Castanea sativa* Mill. half-sib progenies in response to drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 56-63.
- Ciucure, C.T.; Geana, E.I.; Sandru, C.; Tita, O.; Botu, M.(2022). Phytochemical ve Nutritional Profile Composition in Fruits of Different Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars Grown in Romania. *Separations*. 9, 66.
- Cobanoglu, H., Canturk, U., Koç, İ., Kulaç, Ş., & Sevik, H. (2023). Climate change effect on potential distribution of anatolian chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in the upcoming century in Türkiye. *Forestist*, 73(3), 247-256.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant molecular biology reporter*, 27, 86-93.
- Conedera, M., Krebs, P., Tinner, W., Pradella, M., & Torriani, D. (2004). The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation history and archaeobotany*, 13, 161-179.
- Cuestas, M. I., Mattioni, C., Martín, L. M., Vargas-Osuna, E., Cherubini, M., and Martín, M. A. (2017). Short communication: Functional genetic diversity of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations from southern Spain. *Forest Syst.* 26:eSC06. doi: 10.5424/FS/2017263-11547
- Da Silva-Pinheiro, J., Lins, L., Souza, F. C., da Silva, C. E. M., Moura, F. D. B. P., Endres, L., & Justino, G. C. (2016). Drought-stress tolerance in three semi-arid species used to recover logged areas. *Brazilian Journal of Botany*, 39, 1031-1038.
- Davis, P. H. (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3.*
- Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4(2), 215-223.
- Demesure, B., Le Guerroué, B., Lucchi, G., Prat, D., & Petit, R. J. (2000). Genetic variability of a scattered temperate forest tree: *Sorbus torminalis* L.(Crantz). *Annals of Forest science*, 57(1), 63-71.
- Ding, Y., Nie, Y., Chen, H., Wang, K., & Querejeta, J. I. (2021). Water uptake depth is coordinated with leaf water potential, water-use efficiency and drought vulnerability in karst vegetation. *New Phytologist*, 229(3), 1339-1353.
- Dinis, L.T.; Peixoto, F.; Pinto, T.; Costa, R.; Bennett, R.N., & Gomes-Laranjo, J.(2011). Study of morphological and phenological diversity in chestnut trees (“Judia” variety) as a function of temperature sum. *Environ. Exp. Bot.* 70, 110–120.
- Doyle, J., & Doyle, J. L. (1991). CTAB total DNA isolation. *Molecular techniques in taxonomy*, 283-293.
- ecology* (pp. 187-263). Springer, Cham.

- El Chami, M. A., Tourvas, N., Kazakis, G., Kalaitzis, P., Aravanopoulos, F. A. (2021). Genetic characterisation of chestnut cultivars in crete. *Forests*, 12(12), 1659.
- El-Beltagi H.S., Mohamed H.I., Sofy M.R. (2020). Role of ascorbic acid, glutathione and proline applied as singly or in sequence combination in improving chickpea plant through physiological change and antioxidant defense under different levels of irrigation intervals. *Molecules*, 25, 1702.
- Erdem, R. (1951). Türkiye'de Kestane Ölümünün Sebepleri ve Savaş İmkanları.
- Eriksson, G., Namkoong G, Roberds JH. (1993). Dynamic gene conservation for uncertain futures. *For Ecol Manage.* 62: 15–37.
- Ertan, E.; Erdal, E.; Alkan, G.; Algül, B.E. (2015). Effects of different postharvest storage methods on the quality parameters of chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *HortScience* . 50, 577–581.
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(4), 673–689.
- Fernandez-Lopez, J., & R. Alia. (2003). Technical Guidelines for genetic conservation and use of chestnut (*Castanea sativa*). *IPGRI*, Rome, Italy.
- Filiz, E. ve Koç, İ. (2011). Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 2011(2).
- Fišer, Ž., Aronne, G., Aavik, T., Akin, M., Alizoti, P., Aravanopoulos, F., ... & Zippel, E. (2021). ConservePlants: An integrated approach to conservation of threatened plants for the 21st Century. *Research Ideas and Outcomes*, 7, 1-29.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Diaz-Espejo, A., Galmes, J., Medrano, H. (2008). Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ.* 31: 602-612.
- Frankham, R., Ballou, S. E. J. D., Briscoe, D. A., ve Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Freitas, T. R., Santos, J. A., Silva, A. P., ve Fraga, H. (2021). Influence of climate change on chestnut trees: A review. *Plants*, 10(7), 1463.
- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., Cao, X., & Khan, M. A. R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*, 24(2), 227-239.
- Ghounim, I. E. S., Mustafa, M. R., & Hmam, I. (2022). Molecular evaluation of selected mango genotypes grown in Egypt using SCoT and ISSR markers. *Horticultural Science*.

- Gogoi, B., Wann, S. B., ve Saikia, S. P. (2020). Comparative assessment of ISSR, RAPD, and SCoT markers for genetic diversity in Clerodendrum species of North East India. *Molecular Biology Reports*, 47, 7365-7377.
- Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F., Sang, H. W.W.F., & Torres-Pereira, J. (2006). Study of the temperature effect in three chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars' behaviour. *Journal of Plant Physiology*, 163(9), 945-955.
- Gonçalves, B., Borges, O., Rosa, E., Coutinho, J., ve Silva, A. P. (2012). Effect of cooking on free amino acid and mineral profiles of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Fruits*, 67(3), 201– 214. <https://doi.org/10.1051/fruits/2012013>
- GonzálezA, CoulsonM, Brettel IR.(2002). Development of DNA markers (ISSRs) in mango.*Acta Horticulturae*. 575:139-143.
- Grover A, Sharma C (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Crit Rev Biotechnol* 36(2):290–302.
- Grover, A. (2004). “Genetic improvement for abiotic stress responses.” Plant Breeding. *Springer Netherlands*. 167-193.
- Henriques, C. & Borges, A.O. (2017). *Castanheiro:Estado da Produção*; Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos: Bragança, Portugal.
- Hikosaka, K. (2004). Interspecific difference in the photosynthesis–nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of Plant Research*, 117(6), 481 494.
- Hoffmann, A. A., Weeks, A. R.,ve Sgrò, C. M. (2021). Opportunities and challenges in assessing climate change vulnerability through genomics. *Cells* 184, 1420–1425. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.006
- Hossain, M. A., Hoque, M. A., Burritt, D. J., & Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In *Oxidative damage to plants* (pp. 477-522). Academic press.
- Hosseini, M.S., Samsampour, D., Ebrahimi, M. et al. Evaluation of glycyrrhizin contents in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under drought and soil salinity conditions using nutrient concentrations and biochemical traits as biomarkers. *Acta Physiol Plant* 42, 103 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03090-4>.
- Huang H, Dane F, Norton JD (1994). Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes. *J Amer Soc Hort Sci* 19: 840–849.
- Huang, H., Carey, A.W., Dane, F., Norton, J.D. (1996). Evaluation of Chinese chestnut cultivars for resistance to *Cryphonectria parasitica*, *Plant Dis*. 80: 45-47.
- Huang, H., Dane, F., Kubisiak, T.L. (1998). Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity ve geographic variation in wild populations of the American chestnut (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 85(7): 1013-1071.
- Huang, K., Wang, T., Dunn, D. W., Zhang, P., Sun, H., & Li, B. (2021). A generalized framework for AMOVA with multiple hierarchies and ploidies. *Integrative Zoology*, 16(1), 33-52.

- Hussain M, Malik MA, Farooq M, Ashraf MY, Cheema MA (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *J. Agron. Crop Sci.*, 194: 193-199.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., & Panneerselvam, R. (2008). Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies*, 331(4), 272-277.
- Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K., & Brar, D.S. (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1311-1320.
- Kaçar, B., Katkat, A.V. ve Öztürk, Ş., 2009. Bitki Fizyolojisi. 3. Baskı Nobel yayınları Ankara.
- Kaplan, C., Turanlı, T., & Çeliker, N. M. (2017). Pest species in chestnut growing areas of Izmir and Manisa provinces and their economic importance. In *Proceedings VIII International Scientific Agriculture Symposium (Jahorina)* (pp. 756-762).
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, S., & Kaya, H. K. (2009). Laboratory evaluation of Turkish entomopathogenic nematodes for suppression of the chestnut pests, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) and *Cydia splendana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Biocontrol Science and Technology*, 19(7), 755-768.
- Kayacık, H. (1981). Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematığı, Cilt II, 4. Baskı, İÜ Orman Fakültesi Yayın, (2766).
- Kim, W., Iizumi, T., & Nishimori, M. (2019). Global patterns of crop production losses associated with droughts from 1983 to 2009. *J Appl Meteorol Climatol* 58:1233–1244
- Kirkham, M. B. (2014). *Principles of soil and plant water relations*. Academic Press.
- Koç İ (2022a). Comparison of the gas exchange parameters of two maple species (*Acer negundo* and *Acer pseudoplatanus*) seedlings under drought stress. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 24(1), 65-76.
- Koç İ, Nzokou P. (2022b). Gas exchange parameters of 8-year-old *Abies fraseri* (Pursh) Poir. seedlings under different irrigation regimes. *Turkish JAF Sci Tech*, 10(12), 2421-2429.
- Koç İ, Nzokou P. (2023). Combined effects of water stress and fertilization on the morphology and gas exchange parameters of 3-year-old *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Acta Physiologiae Plantarum*, 45(3), 49
- Koç, İ. (2021a). Examining seed germination rate and seedlings gas exchange performances of some Turkish red pine provenances under water stress. *Düzce University Journal of Science and Technology*, 9(3), 48-60.
- Koç, İ. (2021b). Examination of gas exchange parameters of *Abies balsamea* (L) Mill. and *Abies concolor* saplings, grown under various water regime, exposed to extreme drought stress at the end of the growing season. *Turkish Journal of Forest Science*, 5(2), 592-605.

- Koç, İ., Nzokou, P. (2022a). Do various conifers respond differently to water stress? A comparative study of white pine, concolor and balsam fir. *Kastamonu University Journal of Forest Faculty*, 22(1), 1-16.
- Kooyers, N.J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Sci* 234:155–162
- Korel, F., & Balaban, M. Ö. (2009). Chemical composition and health aspects of chestnuts (*Castanea* spp.). In C. Alaşalvar & F. Shahidi (Eds.), *Tree nuts: Compositional characteristics, phytochemicals and health effects* (pp. 171– 184).
- Kramer, P. J. (1969). Plant and soil water relationships: A modern synthesis. *Plant and soil water relationships: a modern synthesis*.
- Ku, C. S., Loy, E. Y., Salim, A., Pawitan, Y., & Chia, K. S. (2010). The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. *Journal of human genetics*, 55(7), 403-415
- Kulaç, Ş., Özbayram, A. K., Değermenci, Z., Küçük, A. D., & Karadağ, A. (2015). Anadolu kestanesinde (*Castanea sativa* L.) tohum büyüklüğünün çimlenme yüzdesi ve fidan morfolojisine etkisi. *Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Ormancılık Dergisi*, 10(2), 36-42.
- Kulaç, Ş., ve Özkuru, Y. (2021). Reproduction of Some Newly Identified Chestnut Genotypes by Different Grafting Methods From West Anatolia. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 21(3), 218-228.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141-162.
- Lambers, H., & Oliveira, R. S. (2019). Plant water relations. In *Plant physiological*
- Larue, C.; Barreneche, T.; Petit, J.(2021). Scientia Horticulturae Efficient monitoring of phenology in chestnuts. *Sci. Hortic.* 281, 109958.
- Lauteri, M., Monteverdi, M. C., & Scarascia-Mugnozza, G. (2009, October). Preservation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) genetic resources and Adaptive potential in relation to environmental changes. In *I European Congress on Chestnut-Castanea 2009* 866 (pp. 677-682).
- Lauteri, M., Pliura, A., Monteverdi, M.C., Brugnoli, E., Villani, F. (2004). Genetic variation in carbon isotope discrimination in six European populations of *Castanea sativa* Mill. originating from contrasting localities. *J. Evol. Biol.* 17, 1286–1296.
- Lawlor ,D.W., & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.*25(2):275–94. 10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9), 998-1011.

- Liu, J., & Wang, Y. S. (2020). Proline metabolism and molecular cloning of Amp5CS in the mangrove *Avicennia marina* under heat stress. *Ecotoxicology*, 29, 698-706.
- Manetti, M. C., Amorini, E., Becagli, C., Conedera, M., & Giudici, F. (2001). Productive potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stands in Europe. *For. Snow Landsc. Res*, 76(3), 471-476.
- Markovski, A., Petkovski, D., & Velkoska, M. L. (2013). Grafting of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) on various oak species (*Quercus* sp.) as a rootstocks. *Zemljište i biljka*, 62(3), 157-170.
- Martín MA, Moral A, Martín LM, Alvarez JB (2007). The genetic resources of European sweet chestnut (*Castanea sativa* Miller) in Andalusia, Spain. *Genet Res Crop Evol* 54: 379–387.
- Martínez-Sancho, E., Vásconez Navas, L. K., Seidel, H., Dorado-Liñán, I., & Menzel, A. (2017). Responses of contrasting tree functional types to air warming and drought. *Forests*, 8(11), 450.
- Mattioni, C., Martin, M. A., Pollegioni, P., Cherubini, M., & Villani, F. (2013). Microsatellite markers reveal a strong geographical structure in European populations of *Castanea sativa* (Fagaceae): evidence for multiple glacial refugia. *American Journal of Botany*, 100(5), 951-961.
- McDonald, S.E., 1984. Irrigation in Forest-Tree Nurseries: Monitoring and Effects on Seedling Growth. in: Duryea M.L. and Landis T.D. (eds), *Forest Nursery Manual*, Martinus Nijhoff/DrW. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands, 107-121.
- Medak, J. (2009). *Šumske zajednice i staništa pitomog kestena (Castanea sativa Mill.) u Hrvatskoj* (Doctoral dissertation, Faculty of Forestry and Wood Technology, University of Zagreb).
- Menconi, M., Sgherri, C.L.M., Pinzino, C., & Navari-Izzo, F. (1995). Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *J. Exp. Bot.*, 46:1123-1130.
- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., & Vilgalys, R. (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9), 2274-2280.
- Míguez-Soto, B., Fernández-Cruz, J., & Fernández-López, J. (2019). Mediterranean and Northern Iberian gene pools of wild *Castanea sativa* Mill. are two differentiated ecotypes originated under natural divergent selection. *PLoS One*, 14(2), e0211315.
- Mishra, V. ve Cherkauer, K.A. (2010). Retrospective droughts in the crop growing season: implications to corn and soybean yield in the Midwestern United States. *Agricultural For Meteorology* 150(7–8):1030–1045 .
- Mohammadkhani N., Heidari R. (2008). Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3, 448–453 .

- Mondini, L., Noorani, A., ve Pagnotta, M. A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19-35.
- Motahari, B., Shabanian, N., Rahmani, M. S., & Mohammad-Hasani, F. (2021). Genetic diversity and genetic structure of *Acer monspessulanum* L. across Zagros forests of Iran using molecular markers. *Gene*, 769, 145245.
- Müller, M., ve Gailing, O. (2019). Abiotic genetic adaptation in the Fagaceae. *Plant Biol.* 21, 783–795. doi: 10.1111/PLB.13008
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Oduncuoğlu, M. (2016). *Kestane Kanseri Hastalığına Karşı Kestane Çeşitlerinin Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Üzerine Bir Çalışma* (Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey)).
- Oufir M., Schulz N., Sha Vallikhan P.S., Wilhelm E., Burg K., Hausman J.F., Hoffmann L., Guignard C. (2009). Simultaneous measurement of proline and related compounds in oak leaves by high-performance ligand-exchange chromatography and electrospray ionization mass spectrometry for environmental stress studies. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1094–1099.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyaroğlu, M. (2014). Temperate zone fruits: Nuts. Vol.: 3, Ege University, Agricultural Faculty, Pub. Nr. 556, pp.262 (In Turkish)
- Pachauri, R.K., Allen, M.R., Barros, V.R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., Van Ypserle, J.P., vd. (2014). *Climate change synthesis report*. Contribution of Working Groups I, II And III To The Fifth Assessment Report of The Intergovernmental Panel on Climate Change, p. 151.
- Payam, M. (2011). Effect of water deficit stress on some physiological traits of wheat (*Triticum aestivum*). *Agricultural Science Research J.*, 1(1) : 64-68.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pereira-lorenzo, S., Costa, R., Ramos-Cabrer, A. M., Ribeiro, C., Silva, M., Manzano, G., et al. (2010). Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genet. Genomes* 6, 701–715. doi: 10.1007/s11295-010-0285-y.
- Pigliucci, M., Villani, F., & Benedettelli, S., (1990). Geographic and climatic factors associated with the spatial structure of gene frequencies in *Castanea sativa* Mill. *from Turkey*. *J. Genet.* 69 (3), 141–149.
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of experimental botany*, 62(3), 869-882.
- Pinto, D., Rodrigues, F., Braga, N., Santos, J., Pimentel, F. B., Palmeira-De-Oliveira, A., ve Oliveira, M. B. P. P. (2017). The *Castanea sativa* bur as a new potential ingredient for

- nutraceutical and cosmetic outcomes: Preliminary studies. *Food and Function*, **8**(1), 201–208. <https://doi.org/10.1039/c6fo01469k>
- Poljak, I., Idžojtić, M., Šatović, Z., Ježić, M., Čurković-Perica, M., Simovski, B., vd. (2017). Genetic diversity of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Central Europe and the western part of the Balkan Peninsula and evidence of marron genotype introgression into wild populations. *Tree Genet. Genomes* **13**:18.
- Poljak, I., Vahčić, N., Liber, Z., Šatović, Z., & Idžojtić, M. (2022). Morphological and chemical variation of wild sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Forests*, **13**(1), 55.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, Á., & Lareu, M. V. (2013). An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in genetics*, **4**, 98.
- Prgomet, Z., Mujić, I., Beccaro, G. L., Bounous, G., Prgomet, I., Torello Marinoni, D., ve Donno, D. (2013, October). Genetic diversity of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Istria and primorsko-goranska county (Croatia). *In II European Congress on Chestnut 1043* (pp. 87-90).
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**(2), 945-959..
- Rahmani, M. S., Alikhani, L., Shabanian, N., & Khadivi-Khub, A. (2015). Genetic differentiation in *Quercus infectoria* from northwest of Iran revealed by different nuclear markers. *Tree Genetics ve Genomes*, **11**, 1-9.
- Rai, M. K. (2023). Start codon targeted (SCoT) polymorphism marker in plant genome analysis: current status and prospects. *Planta*, **257**(2), 34.
- Rai, N., Rai, K.K., Tiwari, G., & Singh, P.K.(2015). Changes in free radical generation, metabolites and antioxidant defense machinery in hyacinth bean (*Lablab purpureus*. L) in response to high temperature stress. *Acta Physiol Plant*. **37**: 37-46.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *euphytica*, **128**(1), 9-17.
- Rutter, P. A., Miller, G., & Payne, J. A. (1990). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *Acta Horticulturae*, (290), 761-788.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Vikman, P., Fortelius, W., & Hanski, I. (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly meta-population. *Nature*. **392**, 491–494. doi: 10.1038/33136
- Samborski, S. M., Tremblay, N., & Fallon, E. (2009). Strategies to make use of plant sensors - based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agronomy journal*, **101**(4), 800816.
- Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.M., Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J.J., Rosales, M.A., Romero, L., Ruiz, J.M.(2010). Genotypic differences in some physiological

- parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Sci.* **178**: 30-40.
- Sanchez, B., Fernandez, J., Morales, T.A., Morte, A., Alarcon, J.J.(2006). Variation in water stress, gas exchange, and growth in *Rasmanrins officinalis* plants infected with *Glamus deserticola* under drought conditions. *J. Plant Physiol.* **161** : 675-682.
- Santos, M. J., Pinto, T., & Vilela, A. (2022). Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Nutritional and Phenolic Composition Interactions with Chestnut Flavor Physiology. *Foods*, *11*(24), 4052.
- Sargıncı, M., Dönmez, A. H., & Yıldız, O. (2022). Biyosferde Su Döngüsü ve Bitkiler Tarafından Suyun Alınma Mekanizmaları. *Düzce Üniversitesi Süs ve Tıbbi Bitkiler Botanik Bahçesi Dergisi*, *1*(1), 8-20.
- Sargıncı, M., ve Beyazyüz, F. İklim değişikliğinin ormanlar üzerindeki etkisi: İklim akılcı ormancılık bakış açısı. *Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi*, *8*(2), 142-149.
- Sawano, M., T. Ichii, T. Nakanish, and Z. Kotera. (1984). Study on identification of chestnut species and varieties by isozyme analysis. *Sci. Rpt. Fac. Agr. Kobe Univ.* *16*:67–71.
- Scholander, P. F., Bradstreet, E. D., Hemmingsen, E. A., & Hammel, H. T. (1965). Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*, *148*(3668), 339-346.
- Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, *53*(372), 1351-1365.
- Serdar, Ü., Mercan, L., Okumus, A., & Soylu, A. (2014). Morphological and molecular comparison of selected chestnut (*Castanea sativa* Mill.) genotypes from Black Sea Region of Turkey. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, *29*(1), 54-62.
- Shimazaki, K. I., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *58*, 219-247.
- Silva, A.P.; Oliveira, I.; Silva, M.E.; Guedes, C.M.; Borges, O.; Magalhães, B. & Gonçalves, B.(2016).Starch characterization in seven raw, boiled and roasted chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *J. Food Sci. Technol.* *53*, 348–358.
- Soylu, A. (1984). *Kestane yetiştiriciliği ve özellikleri*. Atatürk Bahçe Kùltürleri Araş. Ens. Yayın No.59 Yalova.
- Soylu, A. (2004). *Chestnut growing and specialities*, Hasad Publication. İstanbul, Turkey (book in Turkish).
- Suna, S.; Avşar, B.; Koçer, S.; Çopur, Ö.U.(2021). Effects of different pretreatments on the physicochemical characteristics and quality criteria of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) pickle: A new value-added product. *J. Food Process. Preserv.* *45*, e15669.
- Şimşek, S.A., Katırcıoğlu, Y.Z., & Maden, S. (2018). Türkiye’de orman, park ve fidanlıklarda görùlen phytophthora kök çürüklüğü hastalıkları ve korunma önlemleri. *TURJAF.* *6*(6):770. [10.24925/turjaf.v6i6.770-782.1928](https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i6.770-782.1928).

- Tikendra, L., Potshangbam, A. M., Amom, T., Dey, A., & Nongdam, P. (2021). Understanding the genetic diversity and population structure of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.-An endangered medicinal orchid and implication for its conservation. *South African Journal of Botany*, 138, 364-376.
- Torun, H. (2019). Time-course analysis of salicylic acid effects on ROS regulation and antioxidant defense in roots of hulled and hulless barley under combined stress of drought, heat and salinity. *Physiologia plantarum*
- Turna, İ. (2013). Kestane Ormanlarının Silvikültürü. Giresun Orman Bölge Müdürlüğü, Silvikültür Eğitim Semineri Sunusu.
- Van Rossum F. & Raspé O. (2018) Contribution of genetics for implementing population translocation of the threatened *Arnica montana*. *Conservation Genetics* 19 (5): 1185-1198. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1087-2>.
- Van Rossum, F., Hardy, O., Le Pajolec, S., Raspé, O.(2020) Genetic monitoring of translocated plant populations in practice. *Molecular Ecology* 29 (21): 4040-4058. <https://doi.org/10.1111/mec.15550>.
- Vasconcelos, M.C.B.M.; Bennett, R.N.; Rosa, E.A.S.; Ferreira-Cardoso, J.V.(2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: Fresh and processed products. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1578–1589.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., ve Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113– 4117. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>.
- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J., & Vieira, L. G. E. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of plant physiology*, 164(10), 1367-1376.
- Villani, F., Pigliucci, M., Benedettelli, S., Cherubini, M. (1991). Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity*, 66: 131- 136.
- Villani, F., Pigliucci, M., Lauteri, M., Cherubini, M., Sun, O. (1992). Congruence between genetic, morphometric, and physiological data on differentiation of Turkish chestnut (*Castanea sativa*). *Genome*, 35: 251-256.
- Villani, Sansotta, Cherubini, Cesaroni, & Sbordoni. (1999). Genetic structure of natural populations of *Castanea sativa* in Turkey: evidence of a hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(2), 233-244.
- Wahab, A., Abdi, G., Saleem, M. H., Ali, B., Ullah, S., Shah, W., ... & Marc, R. A. (2022). Plants' physio-biochemical and phyto-hormonal responses to alleviate the adverse effects of drought stress: A comprehensive review. *Plants*, 11(13), 1620.
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., ... & Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*, 7(11), bio035279.
- Waring, R.H., & Running, S.W. (1998). Forest Ecosystems. Analysis At Multiple Scales. *Academic Press, USA*.
- Wu, M., Zhang, W. H., Ma, C., & Zhou, J. Y. (2013). Changes in morphological, physiological, and biochemical responses to different levels of drought stress in Chinese cork oak (*Quercus variabilis* Bl.) seedlings. *Russian journal of plant physiology*, 60, 681-692.

- Xiao, P., Liu, H., Wang, D., Tang, W., Yang, H., Wang, C., ... & Tian, Y. (2020). Assessment of genetic diversity in *Camellia oleifera* Abel. accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) and start codon targeted (SCoT) polymorphic markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67, 1115-1124.
- Yadav, C., & Malik, C. P. (2016). Molecular Characterization of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using Start Codon Targeted (SCoT) markers. *The Journal of Plant Science Research*, 32(1), 37.
- Yaltırık, F. (1993). Dendroloji Ders Kitabı I Gymnospermae (Açık Tohumlular). İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi Yayınları.
- Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Yoshida, Y. (2005). Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1975-1981.
- Yang JY, Cushman SA, Yang J, Yang MB, Bao TJ (2014). Effects of climatic gradients on genetic differentiation of *Caragana* on the Ordos Plateau, China. *Landscape Ecology* 28, 1729– 41.
- Yang, F., Liu, Q., Pan, S., Xu, C., ve Xiong, Y. L. (2015). Chemical composition and quality traits of Chinese chestnuts (*Castanea mollissima*) produced in different ecological regions. *Food Bioscience*, 11(1), 33– 42. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.04.004>
- Yang, F., Xu, X., Xiao, X., Li, C. (2009). Responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Biologia Plantarum*, 53, 3, 511-516.
- Yeh FC, Yang RC, & Boyle T (1999). POPGENE version 1.32: Microsoft Windows–based freeware for population genetic analysis, quick user guide. Center for International Forestry Research, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Yılmaz, A., ve Ciftci, V. (2021). Genetic relationships and diversity analysis in Turkish laurel (*Laurus nobilis* L.) germplasm using ISSR and SCoT markers. *Molecular Biology Reports*, 48, 4537-4547.
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38, 171-186.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E., & Erkoyuncu, M. T. (2015). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4 (2):1-12.
- Zhang, C.; Gomes-Laranjo, J.; Correia, C.M.; Moutinho-Pereira, J.M.; Carvalho Goncalves, B.M.; Bacelar, E.L.V.A.; Peixoto, F.P.; Galhano, V. (2011). Response, tolerance and adaptation to abiotic stress of olive, grapevine and chestnut in the Mediterranean Region: Role of abscisic acid, nitric oxide and microRNAs. In *Plants and Environment; Serie Abiotic Stress*; Lazinica., A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, pp. 179–206.
- Zhao, C,Y., Si, J.H., Feng, Q., Yu, T.F., Luo, H., Qin, J. (2021). Ecophysiological responses to drought stress in *Populus euphratica*. *Sci Cold and Arid Regions*, 13(4), 326-336.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fadime BEYAZYÜZ

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Orman Mühendisliği	Düzce Üniversitesi	2019
Y. Lisans	Biyoloji	Selçuk Üniversitesi	2015
Lisans	Genetik ve Biyomühendislik	Üniversitesi	2012

YAYINLAR

Beyazyüz, F., Mutlu, E.G., Alpa Ş., Erbayram, F. Z., Türkoğlu, F. N., & Kulaç, Ş. (2023). Determination of Antioxidant and Anticancer Activities of *C. Sativa* Leaf Extracts on MCF7 Human Breast Cancer Cell Line. *Medical Records*, 5(3), 472-7.

Beyazyüz F., Kulaç Ş. (2023). Effects of Drought Stress on Leaf Gas Exchange Parameters and Proline Accumulation in Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.) Saplings *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 11 (7), 1231-1237.

Beyazyüz F., Arslan E., Koygun G. (2023). Investigation of Cytotoxic, Antimetastatic and Apoptotic Activities of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Extracts: Comparison with MCF-7 and MCF-12A Cells, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*.

Sargıncı, M., & **Beyazyüz, F.** (2022). İklim değişikliğinin ormanlar üzerindeki etkisi: İklim akılcı ormancılık bakış açısı. *Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi*, 8(2), 142-149.

Uyanık, E. G., Kulaç, Ş., & **Beyazyüz, F.** (2022). Effect of grafting method and time on grafting success in Anatolian chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(10), 1972-1981.

Yılmaz, Ç., Kulaç, Ş., & **Beyazyüz, F.** (2022). Kuraklık Stresi Uygulanan Kayacık (*Ostrya Carpinifolia* Scop.) Fidanlarında Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin Araştırılması. *Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Ormancılık Dergisi*, 18(2), 169-190.

