



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**KAZDAĞLARI YERİNDE (*IN SITU*) MUHAFAZA
ALANLARINDAKİ KESTANE (*Castanea sativa* Mill.)
POPÜLASYONLARININ MİKROSATELİT (SSR)
MARKÖRLERİ İLE KARAKTERİZASYONU**

Erol KÜÇÜK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali TANRISEVER

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu: 501.01.01
Sunuş Tarihi: 30.04.2010**

Bornova-İZMİR

2010

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**KAZDAĞLARI YERİNDE (*IN SITU*) MUHAFAZA
ALANLARINDAKİ KESTANE (*Castanea sativa* Mill.)
POPÜLASYONLARININ MİKROSATELİT (SSR)
MARKÖRLERİ İLE KARAKTERİZASYONU**

Erol KÜÇÜK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali TANRISEVER

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.01.01

Sunuş Tarihi: 30.04.2010

**Bornova-İZMİR
2010**

Erol KÜÇÜK tarafından **doktora** tezi olarak sunulan “**Kazdağları Yerinde (*In Situ*) Muhafaza Alanlarındaki Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Popülasyonlarının Mikrosatelit (SSR) Markörleri İle Karakterizasyonu**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **30.04.2010** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ali TANRISEVER(Danışman)

Raportör Üye : Prof. Dr. Ali ÜNAL

Üye : Prof. Dr. Nafiz DELEN

Üye :Prof. Dr. Kubilay ÖNAL

Üye :Doç. Dr. Sami DOĞANLAR

ÖZET

KAZDAĞLARI YERİNDE (*IN SITU*) MUHAFAZA ALANLARINDAKİ KESTANE (*Castanea sativa* Mill.)POPÜLASYONLARININ MİKROSATELİT (SSR) MARKÖRLERİ İLE KARAKTERİZASYONU

KÜÇÜK, Erol

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ali TANRISEVER
Nisan, 2010, 93 sayfa

Bu çalışma Kazdağları kestane (*Castanea sativa* Mill.) gen koruma ve yönetim alanlarındaki (GEKYA) 5 kestane popülasyonunun (Mıhlidere, Sivrikatran, Sarıot, Ayıgediği and Gıcikdere) genetik çeşitliliğini tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. Bu 5 popülasyonun genetik çeşitliliği mikrosatelit (SSR) markörleri ile belirlenmiştir.

Çalışmada 81 kestane genotipi, 25 SSR primeri ile karakterize edilmiştir. Bu 25 SSR primeri toplam 102 allel ile yüksek oranda polimorfizm göstermiştir. Her lokus için ortalama allel sayısı 2 ile 6 arasında değişim göstermiştir (ortalama=4,1).

Analiz edilen genotipleri gruplandırmak için Dice benzerlik katsayısına göre kümeleme analizi ve genotipler arasındaki korelasyon katsayılarına göre de ana bileşen analizi yapılmıştır. Tüm verilerin analizi sonucunda genotipler arasında 0,55 ile 0,87 arasında benzerlik katsayısı tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Kazdağları'ndaki 5 kestane popülasyonunun genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Kestane, Kazdağları, *in situ*, SSR, karakterizasyon.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) POPULATIONS IN KAZDAĞLARI *IN SITU* CONSERVATION AREA BY MICROSATELLITE (SSR) MARKERS

KÜÇÜK, Erol

Phd in Horticulture dep.

Supervisor: Prof. Dr. Ali TANRISEVER

April 2010, 93 pages

This study was carried out to determine the genetic diversity of five chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations (Mıhlidere, Sivrikatran, Sario, Ayıgediği and Gicikdere) from Kazdağları chestnut gene management zones (GMZs). The genetic diversity of these 5 chestnut populations was determined by microsatellite (SSR) markers.

A total of 81 chestnut genotypes were characterized by 25 simple-sequence repeat (SSR) primers. These 25 primers showed high polymorphism with total of 102 alleles. The number of alleles per locus ranged from 2 to 6, with an average of 4,1.

Cluster analyses were performed using the Dice similarity coefficient and principle component analyses were performed with correlation coefficient to group the genotypes. As a result of statistical analyses, similarity of the genotypes ranged from 0,55 to 0,87. This result showed that, the genetic diversity of the five chestnut populations from Kazdağları is high.

Keywords: Chestnut , Kazdaglari, *in situ*, SSR, characterization.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının konusunun belirlenmesinden itibaren bütün katkı ve yönlendirmelerinden dolayı danışman hocam Prof. Dr. Ali Tarnrısever'e; laboratuvar çalışmaları aşamasındaki katkılarından, laboratuvarlarında çalışmama imkan veren İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sami Doğanlar'a, Prof. Dr. Anne Frary'e; çalıştığım kurum Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü yönetimine ve Meyvecilik şubesi çalışma arkadaşlarıma; çalışma süresince her türlü manevi destekleri için bütün aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	5
2.1 Kestenenin Bitki Sistematığındeki Yeri	5
2.2 Kestenenin Gen Merkezi ve Yayılışı	5
2.3 Dünya’da ve Türkiye’de Kestane Yetiştiriciliği ve Önemi	6
2.4 Kestane Genetik Kaynaklarının Muhafazası	11
2.4 <i>In situ</i> Muhafaza ve Türkiye’deki Uygulamaları.....	11
2.5 Genetik Kaynaklarda Çeşitliliğin Belirlenmesi ve Moleküler Yöntemler	14
2.6 Mikrosatelit (SSR)	19
2.7 Moleküler Markörlerin Kestanede Kullanılması	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1 Materyal	25
3.1 Yöntem.....	26
3.2.1 Materyal örnekleme	26
3.2.2 DNA izolasyonu	30
3.3.3 SSR tekniği	34
3.3.4 Verilerin değerlendirilmesi.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1 DNA İzolasyonu	39
4.2 Mikrosatelit (SSR) Analizleri	41
5. SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	79
EKLER	87
ÖZGEÇMİŞ.....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	SSR ürününün kapillar jel elektroforezi ile analiz edilmesi 19
Şekil 2.2	Kapillar jel elektroforezi ile SSR ürününün büyüklüğüne göre oluşan pikler 20
Şekil 2.3	Villani et al. (1999) tarafından Türkiye’de incelenen kestane popülasyonları 22
Şekil 3.1	Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanları ve örneklenen ağaçların konumları 25
Şekil 3.2	Sarıot kestane gen koruma ve yönetim alanı 26
Şekil 3.3	Gen koruma ve yönetim alanlarında işaretlenmiş kestane ağaçları 27
Şekil 3.4	Karadeniz Bölgesi’nden alınan örneklerin harita üzerindeki konumları 28
Şekil 3.5	DNA izolasyonu için alınmış bir yaşlı sürgünler 31
Şekil 4.1	DNA bantlarının agaroz jeldeki görüntüsü 39
Şekil 4.2	Ölçüt markörünün kapillar sistemde 100 bp-3 kb arasında oluşturduğu pikler 41
Şekil 4.3	EMCs17 primeri ile gerçekleştirilmiş PCR ürünlerinin bant büyüklükleri 42
Şekil 4.4	EMCS 17 primeri ile PCR sonucu C01(25)-C12(36) örneklerinde oluşan bantların görünümü 43
Şekil 4.5	EMCS 17 primeri ile PCR sonucu 25 (C-01) numaralı örnekte oluşan pikdeğerleri 43
Şekil 4.6	Moleküler analizi yapılan 81 kestane örneğinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogram 48
Şekil 4.7	81 örneğin kümeleme analizi sonucu oluşan ana gruplar 50
Şekil 4.8	81 örneğin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği 53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.9 Ana bileşen analizi sonucu 81 örneğin ilk üç bileşene göre iki boyutlu grafikleri	54
Şekil 4.10 Ana bileşen analizi sonucu 81 örneğin ilk üç bileşene göre üç boyutlu grafiği.....	55
Şekil 4.11 Sivrikatran bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramı	57
Şekil4.12 Sivrikatran bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği	58
Şekil 4.13 Ana bileşen analizi sonucu Sivrikatran bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri	59
Şekil 4.14 Ana bileşen analizi sonucu Sivrikatran bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.....	60
Şekil 4.15 Ayıgediği bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramı	61
Şekil4.16 Ayıgediği bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği	62
Şekil 4.17 Ana bileşen analizi sonucu Ayıgediği bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri	63
Şekil 4.18 Ana bileşen analizi sonucu Ayıgediği bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.....	64
Şekil 4.19 Mıhlıdere bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramı.	65
Şekil4.20 Mıhlıdere bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği	66
Şekil 4.21 Ana bileşen analizi sonucu Mıhlıdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri	67
Şekil 4.22 Ana bileşen analizi sonucu Mıhlıdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.23 Sarıot bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramı.	69
Şekil4.24 Sarıot bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği	70
Şekil 4.25 Ana bileşen analizi sonucu Sarıot bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri	71
Şekil 4.26 Ana bileşen analizi sonucu Sarıot bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.....	72
Şekil 4.27 Gıcikdere bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramı.	73
Şekil4.28 Gıcikdere bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği	74
Şekil 4.29 Ana bileşen analizi sonucu Gıcikdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri	75
Şekil 4.30 Ana bileşen analizi sonucu Gıcikdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1	Dünyada başlıca kestane üreticisi ülkelerin yıllara göre üretim miktarları..... 6
Çizelge 2.2	Türkiye’de kestane üretiminde öne çıkan illerin üretim miktarları ve toplam üretimdeki payı (2008)..... 7
Çizelge 2.3	Ülkelerin kestane genetik kaynakları muhafaza durumları 11
Çizelge 2.4	Moleküler markörlerinin sınıflandırılması..... 15
Çizelge 2.5	Bazı moleküler markörlerinin karşılaştırılması 17
Çizelge 2.6	RFLP, RAPD, AFLP ve SSR moleküler markörlerinin avantajlı ve dezavantajlı yönleri 17
Çizelge 3.1	Moleküler çalışmalarda kullanılan örnekler 28
Çizelge 3.2	CTAB çözeltilisinin bileşimi (1 litre) 31
Çizelge3.3	İzolasyon çözeltilisini bileşimi 32
Çizelge 3.4	Kullanılan SSR primerleri 34
Çizelge 3.5	SSR primerleri için PCR bileşenleri 36
Çizelge 3.6	SSR primerlerine uygulanan PCR koşulları 36
Çizelge 4.1	Örneklerden izole edilen DNA miktarları 40
Çizelge 4.2	Kullanılan SSR primerlerinin PCR sonucu oluşturdukları allel büyüklükleri ve sayıları 44
Çizelge 4.4	Sivrikatran popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları..... 60
Çizelge 4.5	Ayıgediği popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları..... 64
Çizelge 4.6	Mıhlidere popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları..... 68
Çizelge 4.7	Sarıot popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları 72

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

Çizelge 4.8	Gıcıkdere popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.....	76
-------------	---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
bp	Baz çifti
CTAB	Hekzadesil trimetil amonyum bromür
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetraasetikasit
HCl	Hidroklorik asit
M	Molar
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
Ng	Nanogram
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNase	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Kestaneler (*Castanea sp.*) *Fagales* takımı içerisinde meşe (*Quercus*) ve kayın (*Fagus*)'larla birlikte *Fagaceae* (Kayıngiller) familyasına girmektedir. Bilinen 13 türü içerisinde Avrupa kestanesi (*C. sativa* Mill.), Amerikan kestanesi (*C. dentata* Borkh.), Çin kestanesi (*C. mollissima* Bl.) ve Japon kestanesi (*C. crenata* Sieb. Zucc.) ekonomik değeri olan ve kültürü yapılan kestane türleridir (Soylu, 1984).

Kestane (*C. sativa* Mill.) genellikle Akdenizde yayılım gösteren bir türdür. Kestanenin anavatanı ile ilgili yapılan birçok yayında, bu türün orijin merkezinin Türkiye olduğu ve buradan kültüre alınmış tür olarak Avrupa'ya yayıldığı belirtilmektedir (Soylu, 1984). Avrupa kestanesi türü Akdeniz havzasında yetiştirilir. Bazı eski Yunan ve Roma'lı yazarlara göre bu türün Anadolu'dan Yunanistan'a, buradan İtalya ve İspanya'ya yayıldığı belirtilmektedir. Hatta bazı yazarlar, kestanenin gen merkezinin Anadolu'da Kastanis (Kastamonu) şehri olduğu ve adını buradan aldığı kanısındadırlar (Soylu, 1984).

Avrupa'da kestanenin biyoçeşitliliği ile ilgili yapılan çalışmalarda, Kuzeydoğu Anadolu'da yayılım gösteren kestane genotipleri arasındaki genetik çeşitliliğin, Batı Anadolu, İtalya ve Fransa'dakinden fazla olduğu belirtilmektedir (Villani et al, 1991). Bu veriler doğrultusunda bazı araştırmacılar, Batı Avrupa'daki kestane popülasyonlarının orijininin kesin olarak bilinmediği (Anadolu, Kafkasya ya da her ikisi) ve varlığının 2000 yıldan daha eskiye gitmediği (Fernandez-Lopez and Alia, 2003); kestanenin würm buzullaşması sürecinde Güney Avrupa'da yok olduğu, sadece Kuzeydoğu Anadolu ve Kafkaslar'da kaldığını ve bu iki alandan Romalılar tarafından kültüre alınmış tür olarak Avrupa'ya getirildiği kanısındadırlar (Zohary and Hopfh, 2000.; Fernandez-Lopez and Alia, 2003) .

Genetik çeşitliliğinde bu kadar önemli bir noktada olduğumuz kestane türünde, mevcut çeşitlilik zaman içerisinde tehlike altına girmiştir. Kestane kanseri başta olmak üzere, ormancılık uygulamaları, aşılama ve de son zamanlarda önemi daha da artan değişen çevre koşulları ve küresel ısınma en önemli tehdit unsurları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, kestanenin genetik çeşitliliğinin gerek yerinde (*in situ*), gerekse arazi gen bankalarında (*ex situ*) muhafazası ve değişimlerin incelenmesi gerekli olmuştur. Ülkemiz koşullarında özellikle kestane kanserinden dolayı Marmara Bölgesi başta olmak

üzere bazı alanlarda yetiştiricilik oldukça sınırlanmış, kestane alanları azalmış, verimlilik düşmüştür; halen de kestane kanseri hastalığının yayılması, yetiştiricilik alanlarını ve doğal popülasyonları tehdit etmektedir.

Orijin merkezi olduğumuz kestane türünün (*Castanea sativa* Mill.) genetik kaynaklarının korunması ve değerlendirilmesi yönünde gerçekleştirilen çalışmalar sınırlıdır. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalardan biri “Genetik Çeşitliliğin Yerinde (*in situ*) Korunması Projesi” kapsamında Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nce gerçekleştirilen “Kestane Genetik Kaynaklarının Kazdağları’nda Yerinde (*in situ*) Muhafazası” çalışmasıdır (Küçük ve ark., 1998). Bir diğeri de, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülmekte olan “Kestane Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası, Karakterizasyonu ve Değerlendirmesi” projesidir (Küçük vd.,2008 (yayınlanmamış)).

“Genetik Çeşitliliğin Yerinde (*in situ*) Korunması Projesi” 1993 yılında, Küresel Çevre Fonu (Global Environment Facility-GEF) tarafından hibe edilen kaynakla başlatılmıştır. Bu proje ile önemli orman ağacı türleri ve bunların yabani akrabaları ile gen kaynağı Anadolu olan bazı otsu bitkilerin gen kaynaklarının yerinde korunması hedeflenmiştir. Bu amaçla seçilen pilot bölgelerden biri de Kazdağları’dır (Küçük ve ark., 1998; Tan, 1998; Kaya, 1998).

Meyve türlerinde de genetik kaynaklarının muhafazası ve ıslah programları için geniş bir germplasm koleksiyonunun oluşturulması gereklidir. Meyve genetik kaynakları arazi gen bankası oluşturmak için gerçekleştirilecek çalışmalarda, uygun survey ve örnekleme teknikleri ile bu amaca azami ölçüde ulaşmaya çalışılmaktadır (Ulubelde, 1983).

Morfolojik veya agromorfolojik özelliklerine göre meyve genetik kaynaklarının örneklenmesinin yanı sıra, moleküler teknikler kullanılarak da bitki türlerindeki genetik çeşitlilik belirlenebilmektedir. Bu amaçla biyokimyasal (izoenzimler) ve DNA esaslı (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR, SNP v.b.) markör sistemleri kullanılmaktadır. SSR markör sistemi, biyoçeşitlilik çalışmalarında; polimorfizm oranının yüksek oluşu, tekrarlanabilirliği ve kodominant karakterli olması nedeni ile en yaygın olarak kullanılan PCR temelli DNA markörlerindedir (Budak et al., 2004; Kumar et.al.,2009; Neale, 1998).

Bu tez çalışmasında, “Kestane Genetik Kaynaklarının Kazdağları’nda Yerinde (*in situ*) Muhafazası” çalışması (Küçük et al., 1998) kapsamında

belirlenen “Kestane Gen Koruma Ve Yönetim Alanlarındaki (GEKYA; GMZs: Gene Management Zones)” kestane popülasyonlarının mikrosatelit (SSR) markörleri kullanılarak moleküler düzeyde karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada, Kazdağları’ndaki 5 GEKYA’dan toplam 66, Ege Bölgesi’nde yapılan seleksiyon çalışmalarında belirlenen 17 örnek ve Doğu Karadeniz’de yapılan örnekleme çalışmalarında belirlenen 2 örnek olmak üzere toplam 81 genotip kullanılmıştır.

Çalışmada orijin merkezi olduğumuz bu türün, gerek genetik kaynak olarak muhafazası, gerekse ileriki ıslah çalışmalarında esas olacak şekilde moleküler düzeyde karakterizasyonu gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Kestanenin Bitki Sistematiğindeki Yeri

Kestaneler (*Castanea sp.*) bitkiler aleminde *Fagales* takımına, *Fagaceae* (Kayıngiller) familyasına ve *Castanea* cinsine girmektedir. Meyve türlerinden fındık (*Corylus*) ile aynı takımda, orman ağaçlarından meşe (*Quercus*) ve kayın (*Fagus*) ile aynı familyada yer alır. Bilinen 13 türü içerisinde Avrupa kestanesi (*C. sativa* Mill.), Amerikan kestanesi (*C. dentata* Borkh.), Çin kestanesi (*C. mollissima* Bl.) ve Japon kestanesi (*C. crenata* Sieb. Zucc.) ekonomik değeri olan ve kültürü yapılan kestane türleridir (Soylu, 1984; Rutter et al., 1990).

2.2 Kestanenin Gen Merkezi ve Yayılışı

Avrupa kestanesi (*C. sativa* Mill.) türü Akdeniz havzasında yetiştirilir. Bazı eski Yunan ve Roma'lı yazarlara göre bu türün Anadolu'dan Yunanistan'a, buradan İtalya ve İspanya'ya yayıldığı belirtilmektedir. Hatta bazı yazarlar kestanenin gen merkezinin Anadolu'da Kastanis (Kastamonu) şehri olduğu ve adını buradan aldığı kanısındadırlar (Soylu, 1984).

Avrupa'da kestanenin anavatanı ile ilgili birçok yayın yapılmıştır. Bazı araştırmacılar kestanenin, würm buzullaşması sürecinde Güney Avrupa'da yok olduğunu, sadece Kuzeydoğu Anadolu ve Kafkaslarda kaldığını ve bu iki alandan Romalılar tarafından kültüre alınmış tür olarak Avrupa'ya getirildiğini öne sürmektedir. Bu teoriye göre; Batı Avrupa'daki kestane popülasyonları sınırlı, orijini kesin olarak bilinmemekte (Anadolu, Kafkasya ya da her ikisi) ve varlığı 2000 yıldan daha eskiye gitmemektedir (Zohary and Hopfh, 2000.; Fernandez-Lopez and Alia, 2003).

Avrupa kestanesinin günümüzdeki temel genetik kaynaklarının Kafkaslarda olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, kompleks biyocoğrafik yapısı ve *C. sativa* türünün gen merkezi olduğunun düşünülmesinden dolayı Türkiye özel bir önem arz etmektedir (Zohary and Hopf, 2000).

Kestane, Türkiye'de Doğu Karadeniz kıyılarından Akdeniz kıyılarına kadar belirli bir rakım kuşağında yayılış göstermektedir. Bu iki temel bölge arasındaki iklimsel değişiklikler, özellikle yağış seviyeleri, farklı iki fitocoğrafik alan oluşturmaktadır: (i) Kuzey Doğu Anadolu'da "Avrupa- Sibiryası", (ii) Anadolu'nun

batısında ise “Akdeniz” fitocoğrafik alanı. Bu iki alan arasında geçişlerin ve vejetasyon benzerliklerinin olduğu temel alan olarak da Orta ve Batı Karadeniz (Bitinya ve Paplagonya) bölgesi gözlenmiştir (Davis, 1965).

Kestane (*C. sativa* Mill.) bir Akdeniz türüdür. Hazar Denizi’nden Atlantik Okyanusu’na kadar; Madaira, Azores ve Canary adalarını içerecek şekilde, 37° (Tunus-Tlecem Dağı) ve 51° enlemleri (Güneybatı Almanya ve Güney İngiltere) arasında yayılış göstermektedir. Genelde kuzey yöneylerinde, yıllık yağışın 600 mm ve üzerinde olduğu nemli alanlarda, orta derecede asit karakterli (pH 4,5-6,5) ve hafif bünyeli topraklarda yetişmektedir (Fernandez-Lopez and Alia, 2003).

2.3 Dünya’da ve Türkiye’de Kestane Yetiştiriciliği ve Önemi

Dünyada başlıca kestane üreticisi ülkeler Çin, Güney Kore, İtalya, Türkiye, Japonya, Bolivya, İspanya, Portekiz, Rusya ve Yunanistan’dır. Amerika 20. yüzyılın başlarına kadar, önemli bir üretim alanına sahip iken, kestane kanserinin büyük çaplı zararları sonrasında üretim miktarı çok azalmıştır. Dünya ve Türkiye kestane üretiminin son 30 yıllık değişimi de Çizelge 2.1’de verilmiştir. Dünya üretimi belirtilen yıllar arasında dalgalanmalar göstermiştir. Üretimin yıllara göre gösterdiği dalgalanmalar kestane kanserinin (*Cryphonectria parasitica*) ve mürekkep hastalığının (*Phytophthora spp.*) yaptığı zararlarla ilgili görülmektedir. Türkiye üretimi ise 1961 Yılı’nda 38.400 ton iken; bu değer 1992’ye kadar artış göstermiş ve 85.000 tona ulaşmıştır. Ancak bu yıldan sonra azalma göstermiş ve bugün 48.000 tona kadar gerilemiştir (Anonymus, 2010).

Çizelge 2.1 Dünyada başlıca kestane üreticisi ülkelerin yıllara göre üretim miktarları.

Ülkeler	Üretim (ton)				
	1980	1990	2000	2005	2008
Çin	115.000	115.191	598.185	1.031.857	925.000
G. Kore	84.470	85.043	92.844	76.447	80.000
Türkiye	58.500	80.000	50.000	50.000	55.395
İtalya	63.384	49.559	50.000	52.000	55.000
Dünya Üretimi	472.013	484.276	941.255	1.366.778	1.260.306

Türkiye’de 2008 yılı verilerine göre 530.000 adedi meyve vermeyen yaşta; toplam 2.478.000 adet kestane ağacı ve 53.395 ton üretim bulunmaktadır. Üretimde ağırlıklı iller; Aydın, İzmir, Sinop, Kastamonu, Bartın, Kütahya,

Manisa, Denizli, Balıkesir, Zonguldak ve Bursa ilidir (Çizelge 2.2) (Anonim, 2008).

Çizelge 2.2 Türkiye’de kestane üretiminde öne çıkan illerin üretim miktarları ve toplam üretimdeki payı (2008).

İller	Üretim (Ton)	Toplam Üretimdeki Payı (%)
Aydın	17.331	31,29
İzmir	8.691	15,69
Sinop	5.301	9,57
Kastamonu	4.589	8,28
Bartın	2.750	4,96
Kütahya	2.608	4,71
Manisa	2.176	3,93
Denizli	1.589	2,87
Balıkesir	1.435	2,59
Zonguldak	1.372	2,48
Bursa	1.238	2,23
Diğer İller	6.315	11,40
Toplam	55.395	100,00

Kestanenin Anadolu’da yayılış alanları Doğu Karadeniz’den başlayarak Karadeniz ve Ege kıyıları boyunca Antalya’ya kadar ulaşmaktadır. Bu yayılış alanları içerisinde 1200 m yüksekliğe kadar, gürgen, kızıl ağaç veya kayınlarla birlikte karışık halde ya da saf kestanelikler halinde görülmektedir. Batı Anadolu’da güneye doğru inildikçe yayılış gösterdiği alanların rakım alt sınırı yükselmektedir (Soylu, 1984).

Kestane çok eski zamanlardan beri protein ve karbonhidrat kaynağı olarak insan beslenmesinde önemli olmuştur. Sert kabuklu meyvelerde genelde yağ oranı yüksek olduğu halde kestanede karbonhidratlar daha fazladır. Bu özellik kestanenin çok daha geniş tüketim şekline uygun olmasını sağlamaktadır. İç kestanede %45 su, % 42,1 karbonhidrat, % 6,2 protein, % 5,4 yağ ve % 1,3 kül bulunmaktadır. Kestanedeki karbonhidratların büyük bir bölümü nişasta, bir bölümü de şeker formlarındadır. Kestane mineral ve vitaminlerce de zengin bir meyvedir. 100 g meyvede 50 mg C vitamini içermekte; ayrıca A vitamini de bulunmaktadır. 100 g kestane 200 kalori vermektedir (Soylu, 1984). Ülkemizde kestane daha çok taze tüketim ve şekerleme sanayinde kullanılmaktadır. Avrupa ülkelerinde bunlara ek olarak kestane hamuru olarak da gıda sanayinin çok çeşitli dallarında değerlendirilmektedir (Soylu vd., 1994).

Kestane ağacının çeşitli kısımlarından dericilikte önemli olan tanen elde edilir. Odun ve kabuğunda % 6-12 oranında tanen bulunur. Dayanıklı olan odunu çeşitli amaçlarla kullanılır. Ayrıca çiçekleri arıcılık açısından önem arz etmektedir (Özçağırın vd., 2007).

Yukarıda belirtilen tarımsal özelliklerinden dolayı kestane Türkiye’de çok eski zamanlardan beri tüketimi yapılan bir türdür. Bu tür üzerinde gerek yerel ve gerekse geniş kapsamlı çeşit geliştirme çalışmaları ve agronomi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunlardan bazıları aşağıda sıralanmıştır.

Marmara Bölgesi’nde 120 tip üzerinden gerçekleştirilen seleksiyon çalışmalarında; verimlilik, erkencilik ve kalite özellikleri dikkate alınarak 24 tip seçilmiş (Ayfer vd., 1977) ve adaptasyon denemesine tabii tutulmuştur. Sonuçta 13 tip tavsiye edilmiştir (Ayfer vd., 1986, Soylu vd., 1994).

Ege Bölgesi Kestane Çeşit Araştırma Projesi çerçevesinde yürütülen çalışmada, bölgede 109 tip üzerinde çalışma yapılmış aralarından 23 tip adaptasyon çalışmasına alınmak üzere seçilmiştir (Özkarakaş vd., 1995).

Artvin İli Borçka İlçesi Camili Yöresi’nde yapılan seleksiyon çalışmalarında 1999-2001 yılları arasında 11 tip incelenmiş, genel kalite ve kestane hamuru için 08-Camili-13 ve 08-Camili-8 numaralı tipler selekte edilmiştir (Serdar, 2002).

1996-1997 yıllarında Samsun’da gerçekleştirilen seleksiyon çalışmasında 49 tip incelenmiş; meyve iriliği bakımından 554-2 (15,1g), 556-7 (14,6g), 554-14 (12,2g), 556-8 (11,7 g); erkencilik bakımından 552-8 ve 552-10 (Hasat tarihi: Eylül ayının 2. haftası); kestane hamuruna uygunluk bakımından 552-14 ve 552-10; genel kalite bakımından 552-10 ve 552-14 numaralı tipler seçilmiştir (Serdar ve Soylu, 1999).

1993-1996 yıllarında Sinop’ta 78 tip üzerinden yapılan seleksiyon çalışmasında meyve iriliği, erkencilik, kestane hamuruna uygunluk ve genel kalite bakımından seçim yapılmış; SA 5-1, SE 18-2, SE 21-9, SE 3-12 tipleri öne çıkmıştır (Serdar, 1999).

Bazı önemli kestane çeşitleri arasındaki melezlemelerden elde edilen çöğürlerin gelişme karakterleri incelendiğinde; gelişme gücünü melez

kombinasyonların yanı sıra tohum irilikleri de etkilemiş, tohum iriliğinin etkisi ikinci yılda boy ve çapta, beşinci yılda ise sadece boyda önemli çıkmıştır. Gelişme kuvveti, yeknesaklık, birinci yılın sonunda aşya gelme, düzgün gövdelilik, kök ve kök boğazı sürgünü verme bakımından değerlendirmede; 51101 x 62304, 52112 x 51109, 52214 x 51109, 52112 x 51111 melez kombinasyonlarından elde edilen çöğürler öne çıkmışlardır (Soylu, 1986).

Kestane en uygun göz aşısı yöntemi ve zamanının belirlenmesi için yapılan çalışmada; en yüksek aşı tutma oranı (% 97,50) eylül ayının ilk yarısında yapılan yama göz aşısından elde edilmiştir (Özkarakaş ve Önal, 1997).

Marmara Bölgesi'nde yetiştirilmekte olan bazı kestane çeşitlerinin çiçek yapıları ve meyve tutumları üzerine yapılan çalışmada;

- İncelenen tipler arasında erkek çiçek püskülleri üzerindeki çiçek kümeleri, kümelerdeki çiçek sayıları, stamenlerin pozisyonu dikkate alınarak; 51111, 51109, 62304 ve 62309 numaralı tipler iyi tozlayıcılar olarak seçilmişlerdir.

- Çeşitlerin çoğunda erkek çiçeklerin önce olgunlaştığı (protoandri), normal yapıdaki dişi çiçeklerin çoğunun aynı zamanda reseptif hale geldiği,

- Embriyo keselerinin çoğunluğun kabul edicilik döneminin son 5-6 günü içerisinde olgunluğa ulaştığı,

- 5 tipteki kromozom sayımlarında kromozom sayısının $2n: 24$ olduğu; mayoz sırasında bir tipte univalent kromozomların olduğu,

- Kendilemelerde % 0,5-12,9, melezlemelerde ise % 28,2-86,1 arasında meyve tutma oranı olduğu; tozlanmayan çiçeklerin bir bölümünde de (% 1,6-14,8) muhtemelen apomiktik yolla tohum oluştuğu saptanmıştır (Soylu ve Ayfer, 1981).

Dünya kestane üretim rakamlarındaki seyir üzerinde etkili olan kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica*) ile ilgili Türkiye'de de çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Marmara Bölgesi'nde kestane kanserinin (*Cryphonectria parasitica*) yayılışı ve biyolojisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada hastalık etmeni ile bulaşık ağaç oranının % 32,3 olduğu saptanmıştır (Delen, 1979). Hastalık artık Ege Bölgesindeki bir çok kestane yetiştirilen yerde, Aydın, Manisa, Çanakkale, İzmir ve Kütahya illerinde de görülmekte ve kurumaya neden olmaktadır (Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker ve Onoğur, 2004).

Kestane kanseri etmeninin (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) Türkiye izolatlarında hipovirulensin varlığını araştırmak amacıyla 1994-1998 yılları arasında Ege ve Marmara bölgelerindeki kestaneliklerde yapılan çalışmalarda, elde edilen izolatlar fenotiplerine ve hipovirulense dönüştürme yeteneğine göre gruplandırılmış ve 7 tanesi hipovirulent olarak nitelendirilmiştir (Çeliker ve Onoğur, 1998).

Türkiye’de kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) hastalığına karşı biyolojik mücadele olanaklarını araştırmak amacıyla yapılan çalışmada; kestane fidanları virulent ve 7 hipovirulent ırk ile ayrı ayrı ya da virulent ırk bir hipovirulent ırk birlikte inokule edilmiştir. Çalışma inokulasyondan 5 ay sonra son olarak değerlendirildiğinde; sadece hipovirulent ırkla inokule edilen fidanlarda belirgin kallus dokusu oluşumu nedeniyle lezyonların küçüldüğü, kanserlerin iyileşmeye başladığı saptanmıştır. Sadece virulent ırk ile inokule edilen fidanlar kurumuş, hipovirulent ve virulent izolatlarla birlikte inokule edilen fidanlarda ise önce kanser gelişimi durmuş, daha sonra kallus dokusu oluşumu nedeniyle lezyonlar küçülmüş, kanserler iyileşmeye başlamıştır. Bu sonuçlar Türkiye’de önemli bir sorun olan kestane kanserinin hipovirulent ırklarla kontrol edilebileceğini ortaya koymuştur (Çeliker ve Onoğur, 2001). Deneme 29 ay boyunca değerlendirilmiş ve hipovirulent ve virulent izolatlarla birlikte inokule edilen fidanların yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürdüğü saptanmıştır (Çeliker ve Onoğur, 2002).

Ege ve Marmara bölgelerinde kestane kanseri etmeni (*Cryphonectria parasitica* Murr.Barr)’nın yeni vejetatif uyum gruplarının oluşma şansı ve bunun biyolojik mücadele başarisına etkisini arştıran çalışmada; Ege ve Marmara Bölgelerinden toplanan 375 *C. parasitica* izolatının uyum grupları ve bu izolatlar arasından tesadüfen seçilen 68 izolatın eşleşme tipleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirerek her iki bölgede yeni uyum gruplarının meydana gelme olasılığı irdelenmiştir.Örneklerin toplandığı kestaneliklerde, % 95 oranında EU-1 ve % 5 oranında EU-12 olmak üzere 2 vejetatif uyum grubu belirlenmiştir. EU-1 uyum grubu her iki bölgede, EU-12 uyum grubu sadece Ege Bölgesinde bulunmuştur. Eşleşme tipi testlerinde, Ege ve Marmara Bölgelerinde %85 oranında Mat-1 ve %15 oranında Mat-2 saptanmıştır. Eşeyli üreme Mat-1 ve Mat-2 tipleri arasında gerçekte ve yeni v-c gruplarının oluşmasına neden olmaktadır. Vejetatif uyum ve eşleşme tipi test sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; Ege Bölgesinde, Balıkesir-İvrindi ve İzmir-Beydağ’da eşeyli üreme riskinin çok yüksek olduğu, ancak EU-1 ve EU-12 uyum grupları arasında

şimdiye kadar eşeyli üremenin meydana gelmediği kanısına varılmıştır. Marmara Bölgesinde ise Mat-1 ve Mat-2 eşleşme tiplerinin bulunmasına karşın sadece EU-1 v-c tipinin olması bu bölgede de eşeysiz üremenin henüz olmadığına işaret etmiştir (Çeliker ve Onoğur, 2004).

2.4 Kestane Genetik Kaynaklarının Muhafazası

Kestane genetik kaynaklarının Türkiye'nin de aralarında bulunduğu 10 ülkede *in situ* ve *ex situ* muhafazası yapılmaktadır (Çizelge 2.3) (Anonymous, 2004).

Çizelge 2.3 Ülkelerin kestane genetik kaynakları muhafaza durumları.

Ülkeler	<i>Ex situ</i> muhafaza			<i>In situ</i> muhafaza			
	Tohum bahçesi ya da klon koleksiyonu			Tohum muhafazası (kg)	Alan sayısı (Adet)	Alan büyüklüğü (ha)	Tek ağaç
	Adet	Alan (ha)	Klon ya da fert sayısı				
Belçika					2	1,1	
Bulgaristan				423			
İsviçre					5	12,2	
İspanya	1		37				
İngiltere			84				
Macaristan	1	0,5	20				
Romanya	1	2,2			9	106	
Rusya							47
Türkiye					5	970,1	
Yugoslavya					1	0,38	4

2.4 *In situ* Muhafaza ve Türkiye'deki Uygulamaları

In situ muhafaza, popülasyonların doğal ekosistemlerinde devamlılığını esas alan bir yöntemdir. Kültür bitkilerinde germplasm oluşturulması için, *in situ* muhafaza yöntemi çoğunlukla yabani türleri de kapsamaktadır. Ancak bu yöntem, türlerin yabani akrabalarının bulunduğu popülasyonları içeren korunaklı alanların basit anlamda belirlenmesinden daha fazlasını içermektedir. Etkili ve sürdürülebilir bir *in situ* çalışmasının bir dizi unsuru içermesi gerekmektedir;

1. Ön survey çalışması
 - a. Taksonomik sınıflandırmanın netleştirilmesi,
 - b. Türün yayılımının belirlenmesi,
 - c. Ekolojik ve coğrafik faktörlerle etkileşiminin belirlenmesi,
 - d. Genotipik varyasyonun belirlenmesi,
2. Muhafaza hedeflerinin formülasyonu,
3. Hedef türün muhafazası için asgari ölçütlerin belirlenmesi,
 - a. Popülasyon sayısı,
 - b. Popülasyon büyüklüğü,
 - c. Ekolojik ve çevre koşulları,
 - d. Habitat ünitelerinin büyüklüğü,
4. Muhafaza için gereksinim duyulan minimum ölçütlere göre alanların belirlenmesi,
5. Alanların yönetimi,
6. İzlenmesi,
7. Germplazma erişim (IBPGR, 1985).

In situ muhafazanın en önemli unsurlarından birisi, uzun süreli muhafaza için; ulaşılabilir ve sürdürülebilir gen koruma ve yönetim alanlarının (GEKYA; GMZ: Gene management zone) belirlenmesidir. GEKYA'lar, tehdit altında ya da tehdiye açık bitki türlerinin popülasyon içi ve popülasyonlar arası evrim sürecini devam ettirdikleri, doğal habitatlarında yüksek genetik çeşitlilik barındıran alanlardır. GEKYA'lar belirli prensipler çerçevesinde belirlenir. Bir alanda öncelikle hedef türlerin yayılımı ve çeşitliliği tespit edilir (Tan and Ulubelde, 1998).

Türkiye'de "Genetik Çeşitliliğin Yerinde (*in situ*) Korunması Projesi" 1993-1998 yılları arasında yürütülmüştür. Projenin mali desteği Küresel Çevre Fonu (Global Environment Facility-GEF) tarafından sağlanmıştır. Bu proje ile önemli orman ağacı türleri ve bunların yabancı akrabaları ile gen kaynağı Anadolu olan bazı otsu bitkilerin gen kaynaklarının yerinde korunması hedeflenmiştir. Bu

amaçla seçilen pilot bölgelerden biri de Kazdağları'dır (Tan, 1998; Küçük vd., 1998; Kaya, 1998).

Kazdağları'nda gerçekleştirilen kestane genetik kaynakları *in situ* muhafaza çalışmalarında, ön surveylerden sonra 5 bölge *in situ* muhafaza için gen koruma ve yönetim alanı olarak (GEKYA) seçilmiştir. Bu alanların belirlenmesinde aşağıda sıralanan kriterler dikkate alınmıştır;

- Hedef türün alanlardaki toplam miktarı,
- Her alanda örnekleme için en az 100 m uzaklıkta en az 40 ağacın bulunması,
- Ağaçların yaşlarının birbirine yakın olması,
- Ağaçların meyve veriyor olması,
- Yöney,
- Rakım,
- Eğim,
- Toprak ve ana kaya yapısı,
- Çalışma kolaylığı,
- Muhafaza edilebilme kolaylığı,
- Yangın, kesim ve otlatma gibi risklerin olmayışı,
- Diğer türlerin zenginliği (Küçük vd., 1998).

Yukarıdaki kriterlere göre Kazdağları'nda Gıcikdere, Ayıgediği, Sivrikatran, Sarıot ve Mıhlidere bölgeleri kestane (*Castanea sativa* Mill.) için gen koruma ve yönetim alanları (GEKYA) olarak belirlenmiştir. Bu alanlarda kestanenin mevcut odunsu bitkiler içerisinde payı;

- Gıcikdere'de % 58
- Ayıgediği'nde % 65
- Sarıot'da % 51
- Sivrikatran'da % 56
- Mıhlidere'de % 49 olduğu tespit edilmiştir (Küçük vd., 1998).

Belirlenen bu alanlarda örneklenen ağaçlardan pomolojik analizler ve mevcut biyoçeşitliliği biyoteknolojik yöntemlerden izoenzim yöntemi kullanılarak belirlenmesi için meyve örnekleri alınmıştır (Küçük vd., 1998). Ancak izoenzim çalışmaları gerçekleştirilememiştir.

Belirlenen gen koruma ve yönetim alanlarındaki kestane popülasyonlarının pomolojik özellikleri incelenmiş, alanlar arasında ve alan içerisindeki pomolojik veriler arasında varyasyon tespit edilmiştir. Pomolojik analizlerden ortalama meyve ağırlığı,

- Mıhlıdere bölgesinde 2 g -10,7 g
- Ayıgediği bölgesinde 0,8g -7,7 g
- Gıcıkdere bölgesinde 4,2g-11g
- Sarıot bölgesinde 2g -10,4g
- Sivrikatran bölgesinde 1g -8,7g arasında değişim göstermiştir (Önal et al., 1998)

Kazdağları'nda, "Genetik Çeşitliliğin Yerinde (*in situ*) Korunması Projesi" kapsamında gerçekleştirilen bir diğer çalışma da karaçam (*Pinus nigra* subspecies *pallasiana* Lamb.) genetik kaynaklarının *in situ* muhafazası çalışmasıdır. Bu kapsamda belirlenen yedi karaçam popülasyonunun (Eybekli, Asar, Katrandağ, Kalkım, Gürgendağ, Kapıdağ, Mıhlıdere) genetik yapısı izoenzim markörleri kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan 16 enzim sisteminde 29 lokus gözlenmiş; bunların 17'si polimorfik olarak tespit edilmiştir. Çalışmada, popülasyon içeri genetik çeşitliliğin yüksek olduğu belirlenmiştir. Genetik çeşitlilik değerlerine bakılarak, Asar, Mıhlıdere ve Günerdağ alanları gen koruma ve yönetim alanı olarak önerilmiştir (Velioğlu vd., 1998).

2.5 Genetik Kaynaklarda Çeşitliliğin Belirlenmesi ve Moleküler Yöntemler

Meyve türlerinde de genetik kaynaklarının muhafazası ve ıslah programları için geniş bir germplasm kaynağının oluşturulması gereklidir. Meyve genetik kaynakları arazi gen bankası oluşturmak için gerçekleştirilecek çalışmalarda, uygun survey ve örnekleme teknikleri ile bu amaca azami ölçüde ulaşmaya çalışılmaktadır (Ulubelde, 1983).

Bitkilerdeki genetik çeşitlilik, fenotip özelliklerin yanı sıra, moleküler teknikler kullanılarak da belirlenebilmektedir. Bu amaçla biyokimyasal (izoenzimler) ve DNA esaslı (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR, SNP v.b.) markör sistemleri kullanılmaktadır.

Spooner et al. (2005) ve Kumar et al. (2009) moleküler markörleri Çizelge 2.4'de belirtildiği şekilde gruplara ayırmış ve yaygın olarak kullanılan RFLP, RAPD, AFLP, SSR ve SNP moleküler markörlerini bazı özellikler açısından aşağıdaki şekilde karşılaştırmıştır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.4 Moleküler markörlerinin sınıflandırılması.

Sıra No	Yöntem Temeli	Yöntem ismi
A.	Biyokimyasal markörler	İzoenzimler (Allozymes)
B.	Moleküler markörler	
	i) PCR gerektirmeyen markörler	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms; Kesilmiş Parça Uzunluğu Farklılığı)
		VNTR (Variable Number of Tandem Repeats; Değişken Ardışık Tekrar Dizini; Minisatellit)
	ii) PCR temelli markörler	
	DNA sekanslaması	ITS (Multi-copy DNA, Internal Transcribed Spacer regions of nuclear ribosomal genes; DNA Çoklu kopyası, Nüklear Ribozomal Genlerin Ara Bölgelerinin Kopyası)
		Single-copy DNA, including both introns and exons; DNA'nın İntron ve Eksonları İçeren Tekli Kopyası
	STS (Sequence-Tagged Sites; Dizisi Etiketlenmiş Alanlar)	Mikrosatellitler; Microsatellites, SSR (Simple Sequence Repeat; Basit Dizi Tekrarı), STR (Short Tandem Repeat; Kısa Ardışık Tekrar), STMS (Sequence Tagged Microsatellite; Dizisi Etiketlenmiş Mikrosatelit) SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism; Basit Dizi Uzunluğu Farklılığı)
		ASLP (Amplified Sequence Length Polymorphism; Çoğaltılmış Dizi Uzunluğu Farklılığı)
		SCAR (Sequence Characterized Amplified Region; Diziye Özel Çoğaltılmış Bölge)
		CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik DNA Dizisi)

Çizelge 2.4 (Devam)

SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism; Tek Sarmal Konformasyon Farklılığı)
MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling; Tesadüfi Çoklu Çoğaltım Profili)
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)
DAF (DNA Amplification Fingerprinting; Çoğaltılan DNA Parmakizi)
AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction; Primere Tabi Polimeraz Zincir Reaksiyonu Farklılığı)
ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat; Basit Sekans Tekrarları Arası Farklılığı)
SPAR (Single Primer Amplification Reaction; Tek Primer Çoğaltma Reaksiyonu)
DAMD (Directed Amplification of Minisatellites DNA; Doğrudan Çoğaltılan Minisatelit DNA)
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı)
SAMPL (Selectively Amplified Microsatellite Polymorphic Loci; Seçici Çoğaltılmış Mikrosatelit Polimorfik Lokusu)

Kaynak: Spooner et al., 2005;Kumar et al., 2009.

Çizelge 2.5 Bazı moleküler markörlerinin karşılaştırılması.

Özellik	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
DNA gereksinimi (µg)	10	0,02	0,5-2	0,05	0,05
DNA kalitesi	Yüksek	Yüksek	Orta	Orta	Yüksek
PCR gereksinimi	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
Polimorfik lokus sayısı	1-3	1.5-50	20-100	1-3	1
Kullanım kolaylığı	Zor	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay
Otomasyona uygunluğu	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Tekrarlanabilirliği	Yüksek	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Geliştirilme maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek
Analiz maliyeti	Yüksek	Düşük	Orta	Düşük	Düşük

Kaynak: Kumar et al. 2009.

Moleküler markörlerin kullanılması, bitki ıslahı çalışmalarında hızlı sonuç vermeleri, çevre şartlarından etkilenmemeleri, ve seleksiyon aşamasındaki doğrulukları, agronomik açıdan önemli karakterlerin seçiminde, markörler yardımıyla seleksiyonu en güvenilir uygulama haline getirmiştir. RFLP, RAPD, AFLP ve SSR moleküler markörlerinin avantajlı ve dezavantajlı yönleri Çizelge 2.6'da sıralanmıştır (Budak et al. 2004).

Çizelge 2.6 RFLP, RAPD, AFLP ve SSR moleküler markörlerinin avantajlı ve dezavantajlı yönleri.

Markör Tipi	Avantajlı yönleri	Dezavantajlı yönleri
RFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Genomik zenginliği yüksektir - Eş baskın karakterdedir - Tekrarlanabilirliği yüksektir - Uzun süre kullanılabilir - Genomu kapsamlı tanımlar - Bitkilerde güvenilir olarak kullanılabilir - Sekans bilgisine gerek yoktur 	<ul style="list-style-type: none"> - Çok miktarda kaliteli DNA gereklidir - Uygulanması zordur (RAPD'e göre) - Otomasyonu zordur - Radyoaktif işaretleme gereklidir - Prob klonlanması ve karakterizasyonu gereklidir
RAPD	<ul style="list-style-type: none"> - Genomik zenginliği yüksektir - Sekans bilgisine gereksinim yoktur - Otomasyonu kolaydır - DNA gereksinimi azdır - Radyoaktif işaretleme gerekli değildir. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dominant karakterlidir - Tekrarlanabilirliği düşüktür - Güvenilirliği düşüktür
SSR	<ul style="list-style-type: none"> - Genomik zenginliği yüksektir - Tekrarlanabilirliği yüksektir - Genomu yeteri kadar kapsamlı tanımlar - Polimorfizm oranı yüksektir - Radyoaktif işaretleme gerekli değildir - Otomasyonu kolaydır 	<ul style="list-style-type: none"> - Genellikle türe özgüdür - DNA dizilim bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır
AFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Genomik zenginliği yüksektir - Polimorfizm oranı yüksektir - DNA dizilim bilgisine gereksinim yoktur - Haritalama çalışmaları için uygundur 	<ul style="list-style-type: none"> - Dominant karakterlidir - Oluşturulan haritaların tekrarlanabilirliği düşüktür

Kaynak: Budak et al., 2004.

Bir moleküler markörde aranacak özellikler;

-Genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılması için yüksek polimorfizm göstermelidir.

-Homozigot ve heterozigot diploid organizmaları tanımlamak için kodominant karakter göstermelidir.

-Genomum bütününde yaygın olarak bulunmalıdır.

-Çevre şartlarından etkilenmemelidir.

-Kolay uygulanabilir, hızlı ve maliyeti düşük olmalıdır.

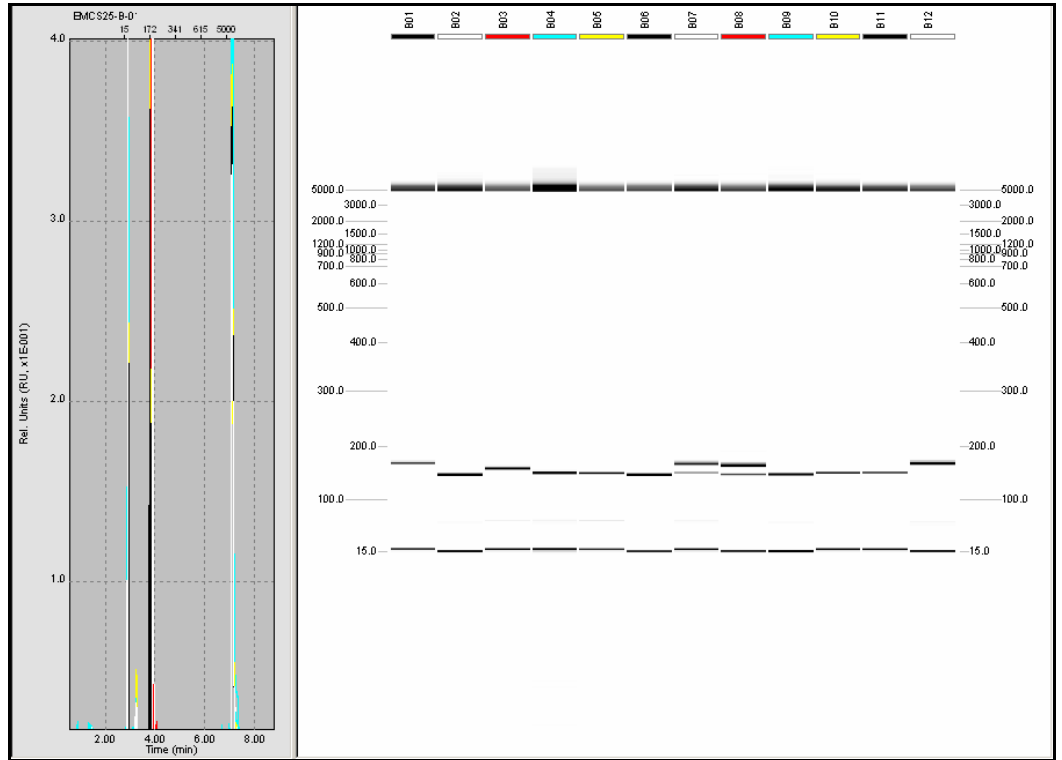
-Laboratuvarlar arasında veri değişimine olanak sağlayabilmelidir (Kumar et al. 2009)

2.6 Mikrosatelit (SSR)

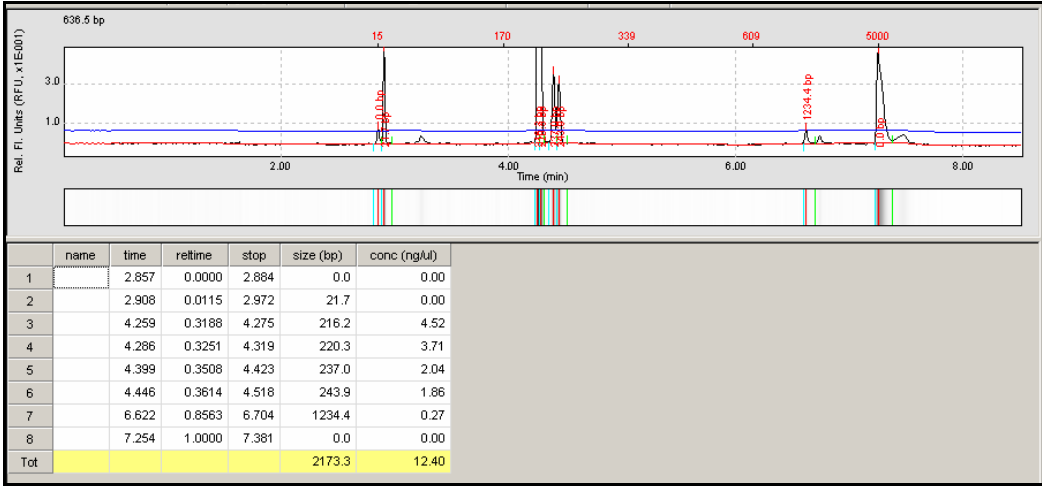
Mikrosatelit terimi Litt and Luty (1989) tarafından ortaya atılmıştır. Mikrosatelitler, “basit dizi tekrarı” (Simple sequence repeat, SSR) olarak da adlandırılan, eukaryot hücrelerinde birli, ikili, üçlü, dördü ya da beşli basit dizi tekrar motifleridir. 1-6 nükleotidden oluşan basit dizilerin sayısı 5-100 arasında değişim göstermektedir (Powel et al. 1996). Bu dizilerin tekrar sayılarındaki varyasyon polimorfizmi oluşturmaktadır.

Basit dizi tekrarları genom üzerinde geniş bir alanda, kodlama yapan ya da yapmayan bölgelerde bulunabilirler (Powel et al., 1996).

Mikrosatelitlerin yan bölgelerinde bulunan 20-25 bp büyüklüğündeki bölgeden elde edilen primerler aracılığı ile, basit dizi tekrarının olduğu bölge PCR ile çoğaltılır. PCR’de çoğaltılmış SSR ürünü agaroz jel , poliakrilamid jel ya da kapillar jel elektroforezinde (Şekil 2.1; 2.2) büyüklüklerine göre ayrılarak görüntülenir (Kumar et al. 2009).



Şekil 2.1 SSR ürününün kapillar jel elektroforezi ile analiz edilmesi.



Şekil 2.2 Kapillar jel elektroforezi ile SSR ürününün büyüklüğüne göre oluşan pikler.

Mikrosatelit markörleri DNA kütüphanelerinden sentezlenir. Sentezlendiği bölge, genomun transkripsiyon gerçekleştiren ya da gerçekleştirilmeyen bölgeleri olabilir. Nadiren de fonksiyonlarına ilişkin bilgiler verilebilir. Mikrosatelit dizileri, yüksek varyasyon göstermelerinden dolayı, genellikle, yakın akraba genotiplerin ayrılmasına uygun markörlerdir (Kumar et al., 2009) ve dolayısıyla, popülasyon çalışmalarında kullanılabilirler (Smith and Devey, 1994).

2.7 Moleküler Markörlerin Kestane Kestane Kestane Kullanılması

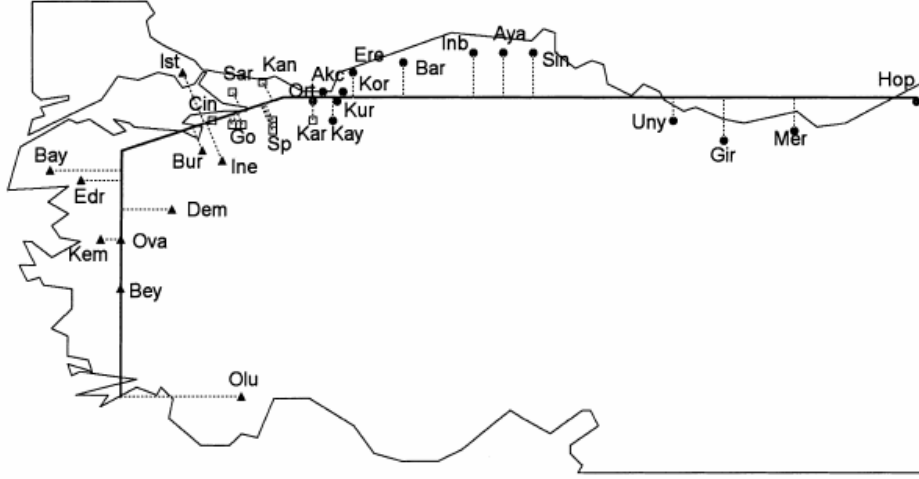
Buck et al. (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *C. sativa* türünden 13 polimorfik mikrosatelit lokusu izole edilmiştir. Bunlardan 6 adedi iki nükleotit tekrarı, beş adedi üç nükleotit tekrarı ve iki adedi de üç ve dört nükleotit tekrarlarının birleşiminden oluşmuştur. Belirlenen bu mikrosatelitler aynı çalışmada İngiltere'deki 3 kestane popülasyonu ve Türkiye orijinli genotipler kullanılarak oluşturulmuş haritalama popülasyonunda çeşitliliğin belirlenmesi için kullanılmış ve her lokusta 2 ile 14 arasında (ortalama=5,15) allel belirlenmiştir.

Marinoni et al. (2003), *C. sativa* türünde 33 SSR markörü izole etmiş ve bunların en yüksek derecede polimorfizm gösteren 14 adedini Kuzey İtalya'da yetiştirilen 20 çeşitte karakterizasyon amacıyla kullanmışlardır. Her lokus için belirlenen allel sayısı 4 ile 10 arasında (ortalama=6,4) değişim göstermiştir.

C. sativa türünde izoenzimler kullanılarak biyoçeşitliliğin belirlenmesine yönelik bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Villani et al. 1991; Machon et al. 1996; Pereira et al. 1999).

Avrupa ülkelerinde *C. sativa* türünün genetik çeşitliliğini belirlemek amacıyla yapılan izoenzim çalışmaları en yüksek genetik çeşitliliğin Türkiye’de olduğunu; Kuzeydoğu Anadolu’daki genetik çeşitliliğin (Avrupa-Sibirya); Batı Anadolu, İtalya ve Fransa’dakinden fazla olduğunu göstermiştir (Villani et al, 1991). Ayrıca, bir diğer çalışmada Sapanca ve Gölcük’ten örneklenen popülasyonların Türkiye’deki en yüksek genetik çeşitlilik seviyesini gösterdikleri, doğu ve batı popülasyonları arasında bir genetik yapıya sahip oldukları belirtilmektedir (Villani et al, 1991).

Yukarıda belirlenen iki çalışma sonucunda Villani ve ark. (1999), Türkiye’de kestane doğu popülasyonları (Avrupa- Sibirya) ve batı popülasyonları (Akdeniz) arasında özellikler gösteren ve en yüksek genetik çeşitliği içeren Orta Karadeniz (Bithynia) popülasyonlarının yapısı ile ilgili olarak şu iki hipotezleri ortaya atmışlardır: (1) Bu popülasyonlar integresyon alanı olarak ortaya çıkmıştır, (2) Orta Karadeniz bölgesi kültüre alınan kestaneler için temel oluşma alanı olarak belirlenmiştir. Bu hipotezlerin test edilmesi için 34 popülasyon belirlenmiş (Şekil 2.8) ve izoenzim yöntemi ile popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik varyasyon, gen akışı ve integresyon derecesi belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda Türkiye kestane popülasyonlarının genetik yapısı ile ilgili elde edilen veriler şu şekilde özetlenmiştir: (i) doğu ve batı kestane popülasyonları arasında yüksek bir genetik farklılık ortaya çıkarılmıştır ve en yüksek genetik çeşitlilik Bithynia popülasyonlarında saptanmıştır; (ii) Keskin geçişlerin açıkça tespit edildiği Bithynia popülasyonlarında doğuya yönelen ve batıya yönelen geniş alanlarda allel frekansları homozigot olarak tespit edilmiştir; (iii) bu alanda gözlenen allel frekanslarındaki değişim birçok mahalde fenotipik ve ekolojik değişimlerle uyumlu olarak sigmoid eğri göstermiştir; (iv) bu eğrinin eni 324 km olarak tahmin edilmiştir; (v) uyumlu bir varyasyona karşın, fenotip ve ekolojik değişimlere uyumlu varyasyon içeren mahaller fark edilir bir bağlantı dengesizliği göstermemiştir.



Şekil 2.3 Villani et al. (1999) tarafından Türkiye’de incelenen kestane popülasyonları.

Casasoli et al. (2001) *C.sativa* türü için 381 moleküler markör (311 RAPD, 65 ISSR, 5 İzoenzim) kullanarak bağlantı (linkage) haritası oluşturmuşlardır. Çalışmada haritalama popülasyonu geliştirilirken; kontrollü melezleme çalışması için anne ebeveyn olarak Bursa’dan alınan; baba ebeveyn olarak da Hopa’dan alınan örnek kullanılmıştır. Bu iki ebeveyn melezlenmesi ile oluşturulan 96 F₁ bitkisinden oluşan popülasyon haritalama çalışmasında kullanılmıştır. Anne ebeveynin genom uzunluğu ortalama 947 cM; baba ebeveynin genom uzunluğu ise 1054 cM olarak hesaplanmıştır. Haritalama için 12 bağlantı grubu oluşturulmuştur.

Sisco et al. (2005), Çin kestanesi (*C. mollissima*) ile Amerikan kestanesi (*C. dentata*) türleri arasında oluşturulan haritalama popülasyonunda geliştirilen genom haritasını, yeni moleküler analiz verileri ile geliştirmişlerdir. Daha önceki verilere 275 AFLP, 24 SSR primeri ile elde edilen veriler ilave edilerek harita yeniden oluşturulmuştur. Ayrıca bu iki tür ile gerçekleştirilen genom haritası ile Casasoli et al. (2001) tarafından Avrupa kestanesi (*C. sativa*) için oluşturulan genom haritası arasındaki bağlantıyı araştırmışlardır. *C.sativa* için oluşturulan genom haritalamasındaki 12 bağlantı grubunun 11’nde Çin ketanesi ve Amerikan kestanesi arasında oluşturulan genom haritası ile korelasyon tespit edilmiştir.

Botta et al. (2004) moleküler markörlerin kültür çeşitlerinin tanımlanmasında model bitki olarak kestaneyi (*C. sativa* Mill.) kullanmışlardır. Çalışmada beş kestane çeşidi (Garrone Rosso, Gentile, Gioviasca, Marrone Di Cuneo, Marrubia, Tempuriva) Marinoni et al. (2003) tarafından geliştirilen 3 SSR primeri (CsCAT 1, CsCAT 3, CsCAT 6) ile test edilmiştir. Çeşitler bazında allel

büyüklikleri CsCAT 1 primerinde 194 bp-223 bp arasında; CsCAT 3 primerinde 225 bp-251 bp arasında; CsCAT 6 primerinde 161 bp- 197 bp arasında tespit edilmiştir.

Gobbin et al. (2007) İsviçre’de yerinde (*in situ*) ve koleksiyonda muhafaza edilen 164 kestane genotipinin SSR primerleri kullanarak moleküler düzeyde karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 4 SSR primeri geliştirilmiş ve Marinoni et al. (2003) tarafından geliştirilen 3 primer (CsCAT 2, CsCAT 14, CsCAT 17) ve Buck et al. (2003) tarafından geliştirilen 1 primer (EMCS 22) ile birlikte toplam 8 primer kullanılmıştır. Çalışmada 4 sinonim, 12 homonim grup tespit edilmiştir. 17 marron grubu kestane de 2 farklı grupta toplanmıştır.

Ovesna et al. (2003) 12 AFLP primerlerini kullanarak 24 Çin kestanesi (*C. mollissima* Blume) genotipinde moleküler karakterizasyon gerçekleştirmiş ve modern çeşitlerin genetik tabanının çok geniş olmadığını tespit etmiştir.

Aravanpoulos et al. (2005) Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya’dan alınan 82 popülasyonda 73 ISSR ve 16 izoenzim markörü kullanılarak genetik çeşitliliği belirlemişlerdir.

Hozova et al. (2009) Çek Cumhuriyeti’nde 21 kestane genotipinde Buck et al. (2003) ve Marinoni et al. (2003) tarafından geliştirilen 7 SSR primeri kullanarak moleküler düzeyde karakterizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda genotiplerde 0,1-0,5 arasında genetik uzaklık belirlenmiştir.

Solar et al. (2005) Slovenya kestane (*C. sativa* Mill.) doğal popülasyonlarından belirlenen 244 örnekte pomolojik özelliklerine göre ve RAPD primerleri kullanarak çeşitliliği belirlemişlerdir. RAPD primerleri ile yapılan moleküler analizlerde maron kestaneleri arasında genetik olarak benzerliğin yüksek olduğu ve doğal popülasyonlarla birlikte ise Slovenya kestane genetik kaynaklarının zengin bir çeşitliliğe sahip olduğu belirtilmiştir.

Gollao et al. (2001) Portekiz’de yetiştiriciliği yapılan 6 kestane çeşidinin fenotipik karakterler ile birlikte RAPD ve ISSR primerlerini kullanarak karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İki moleküler markör sistemi ile elde edilen veriler arasında % 90,5 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Analiz edilen çeşitlerden “ Martainha” ve “Longal” çeşitlerinde homonim bir isimlendirme olduğu tespit edilmiştir.

Kestane çeşitlerinin DNA düzeyinde genetik olarak tanımlanması ve sertifikalandırılması için gerçekleştirilen çalışmada 6 SSR primeri (CsCAT 1, CsCAT 2, CsCAT 3, CsCAT 14, CsCAT 15, CsCAT 16) kullanılmıştır. Çalışmada DNA sekanslama ve floresan boyama yöntemi ile primerlerin etiketlenmesi yöntemi kullanılarak, birkaç lokusun aynı anda amplifikasyonu sağlanarak, çoklu SSR analizi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. 96 genotip için 5 SSR lokusu oluşturduğu allel sayısı ve büyüklükleri bakımından karakterize edilmiştir (Botta et al. 2001).

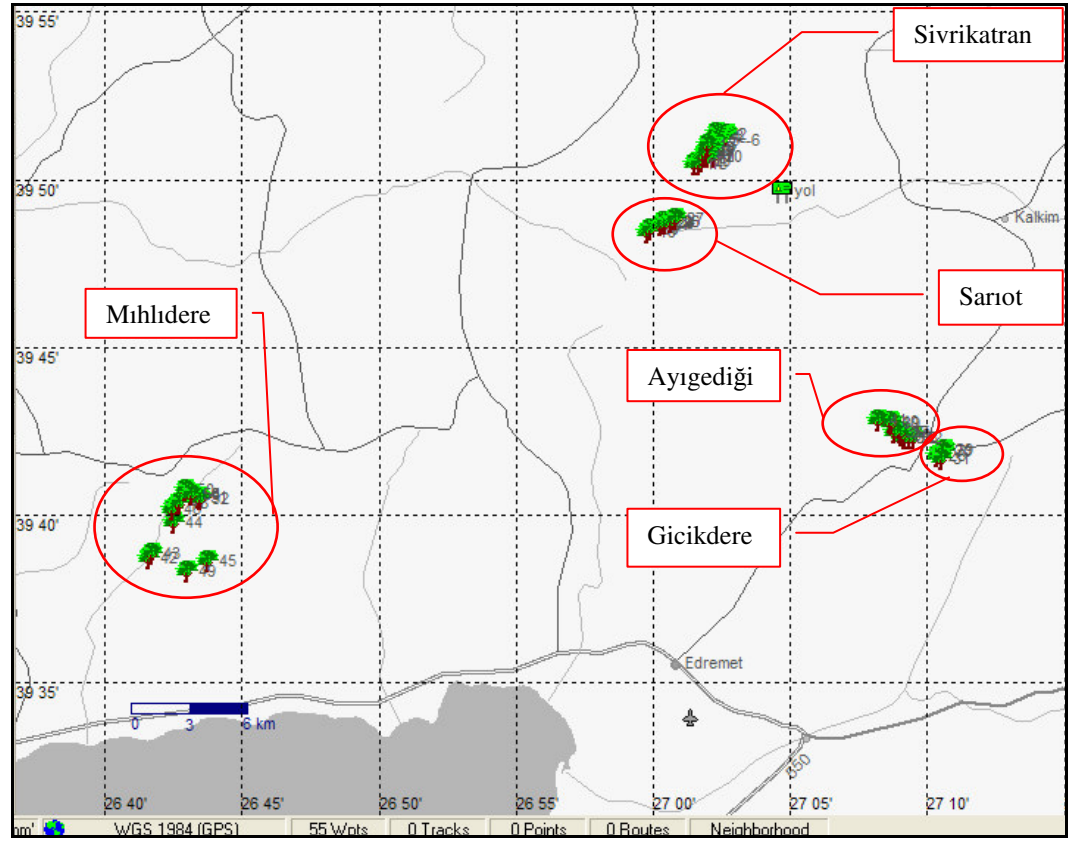
Carvalho et al. (2004), *C. sativa* ve *C. crenata* türlerinin melezlenmesi ile klonal anaç geliştirme çalışmasında, seçilen tek bir klondan *in vitro* yöntemi ile 4 yıldan uzun bir süre kullanılan kaynak ile seçilen klon arasında fark olup olmadığını araştırmışlardır. Bu amaçla moleküler markör sistemlerinden RAPD markör sistemini kullanmışlardır. Çalışmada *in vitro* kaynaktan üretilen klonlar ile donör kaynak arasında polimorfizm saptanmamış, *in vitro* kaynağın stabilitesini koruduğu saptanmıştır.

Yamamoto et al. (2003) Japon kestanesi (*C. crenata*) için SSR geliştirmek amacı ile genomik kütüphane kullanılarak (AG)/(TC) tekrarlı basit dizi tekrarlı 15 lokus belirlemişlerdir. Belirlenen SSR lokuslarından 14 adedi polimorfik bulunmuş ve her lokusta 1-16 allel oluşturmuşlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

“Türkiye’de Genetik Çeşitliliğin Yerinde (*in situ*) Korunması Projesi” (Tan, 1998; Küçük vd., 1998; Önal vd., 1998; Kaya, 1998) kapsamında Kazdağları’nda kestane gen koruma ve yönetim alanları (GEKYA) olarak belirlenen Gıcikdere, Ayıgediği, Sivrikatran, Sarıot ve Mıhlidere bölgelerindeki kestane popülasyonları (Şekil 2.9) (Küçük vd., 1998) bu tez çalışmasının asıl materyalini oluşturmuştur.



Şekil 3.1 Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanları ve örneklenen ağaçların konumları.

Bu bölgeden alınan örneklerin moleküler karakterizasyon verilerini karşılaştırmak için ise Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Ege Bölgesi’nde yapılan seleksiyon çalışmalarında belirlenen örnekler (Özkarakaş vd.,1995) ile bu çalışmanın bağlantılı olarak yürütüldüğü “Kestane Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası, Karakterizasyonu ve Değerlendirmesi” çerçeve projesi kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesi’nden, arazi gen bankasında muhafaza edilmek üzere belirlenen örnekler kullanılmıştır (Küçük v.d.,2008).



Şekil 3.2 Sarıot kestane gen koruma ve yönetim alanı.

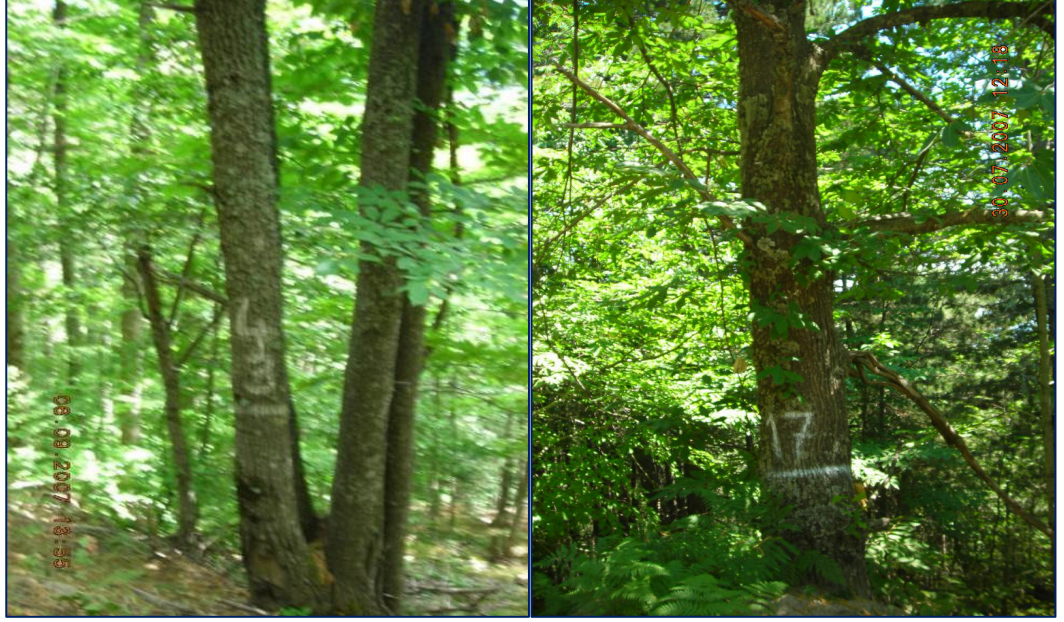
Kazdağları kestane gen koruma yönetim alanı olarak (GEKYA) önerilen 5 bölgedeki kestane popülasyonlarından aşağıda belirtilen yöntemlere göre moleküler karakterizasyon çalışmaları için örnekleme yapılmıştır.

3.1 Yöntem

3.2.1 Materyal örneklemesi

Yukarıda belirtilen Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanı olarak (GEKYA) önerilen Mıhlıdere, Sarıot, Sivrikatran, Ayıgediği ve Gicikdere mevkilerine surveyler düzenlenmiştir. Surveyler kapsamında önerilen bu GEKYA' larda yerinde muhafaza prensipleri çerçevesinde belirlenen ve koruma amaçlı işaretlenen ağaçlar bulunmaya çalışılmıştır (Şekil 2.11). Herhangi bir sebepten dolayı bulunamayan ağaçların olduğu alanlarda yine bu bölgedeki popülasyonu temsil edecek nitelikte yerinde muhafaza için gen yönetim alanları tespitine yönelik kriterler doğrultusunda ağaçlar belirlenmiştir (Tan and Ulubelde, 1998; Tan ve Tan, 2004).

Bu örneklere ilave olarak survey çalışmalarında; çerçeve proje kapsamında oluşturulacak arazi gen bankasında genetik varyasyonu zenginleştirmek amacıyla, düşük frekansta bulunan ender tiplerin seçimini içeren, tesadüfi olmayan örnekleme metodu ve kimi örneklerin belirlenmesinde de tesadüfi örnekleme metodu da kullanılmıştır (Ulubelde, 1983).



Şekil 3.3 Gen koruma ve yönetim alanlarında işaretlenmiş ketane ağaçları.

Çalışma kapsamında moleküler analizler için Kazdağları'nda 5 GEKYA'dan 66 örnek, Ege Bölgesi'nde yapılan seleksiyon çalışmalarında belirlenen kestane genotiplerinden (Özkarakaş vd.,1995) 13 örnek, “Kestane Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası, Karakterizasyonu ve Değerlendirmesi” çerçeve projesi kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesi'nden, arazi gen bankasında muhafaza edilmek üzere belirlenen genotiplerden (Küçük v.d.,2008) 2 örnek olmak üzere toplam 83 örnek moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. 1-66 arasında ardışık sayılar ile numaralandırılan örneklerden 62 ve 64 numaralı örnekler, kullanılan primerlerin çoğunda amplifikasyon gerçekleşmediği için değerlendirmeye dahil edilmemiştir ve istatistiksel analizler 81 örnek verileri ile gerçekleştirilmiştir. Örneklerin listesi koordinat bilgileri ile birlikte Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

“Kestane Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası, Karakterizasyonu ve Değerlendirmesi” projesi kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesi'nden arazi gen bankasında muhafaza edilmek üzere belirlenen genotiplerden 37 ve 71 numaralı örnekler (Küçük v.d.,2008) bu çalışmada sırasıyla 82 ve 83 numaralı örneklerdir. Bu iki örneğin alınmış olduğu alanların harita üzerindeki konumu Şekil 3.4'de görülmektedir.



Şekil 3.4 Karadeniz Bölgesi'nden alınan örneklerin harita üzerindeki konumları.

Çizelge 3.1 Moleküler çalışmalarda kullanılan örnekler.

No	Yöre	Mevkii	Enlem		Boylam		Rakım (m)
1	Kazdağları	Sarıot	K	39 48.374'	D	26 59.818'	939
2	Kazdağları	Sarıot	K	39.834.550	D	27.037.083	654
3	Kazdağları	Sarıot	K	39.833.967	D	27.035.000	710
4	Kazdağları	Sarıot	K	39.832.433	D	27.031.800	787
5	Kazdağları	Sarıot	K	39.829.700	D	27.029.817	802
6	Kazdağları	Sarıot	K	39.821.933	D	27.030.550	785
7	Kazdağları	Sarıot	K	39.820.600	D	27.024.733	878
8	Kazdağları	Sarıot	K	39.820.000	D	27.021.117	899
9	Kazdağları	Sarıot	K	39.816.317	D	27.018.517	934
10	Kazdağları	Sarıot	K	39.814.683	D	27.016.450	931
11	Kazdağları	Sarıot	K	39.812.967	D	27.012.900	963
12	Kazdağları	Sarıot	K	39.811.050	D	27.009.717	907
13	Kazdağları	Sarıot	K	39.810.850	D	27.007.350	921
14	Kazdağları	Sarıot	K	39.848.583	D	27.059.683	757
15	Kazdağları	Sivrikatran	K	39 40.558'	D	27 02.244'	773
16	Kazdağları	Sivrikatran	K	39 50.389'	D	27 01.712'	710
17	Kazdağları	Sivrikatran	K	39 50.760'	D	27 01.950'	688
18	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.848.917	D	27.054.767	755
19	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.855.000	D	27.045.167	762
20	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.851.667	D	27.040.233	803
21	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.851.800	D	27.040.133	797

Çizelge 3.1 (Devam)

22	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.845.817	D	27.035.150	771
23	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.842.567	D	27.030.650	765
24	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.840.717	D	27.028.833	754
25	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.844.750	D	27.031.817	695
26	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.845.983	D	27.032.583	660
27	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.847.300	D	27.031.283	626
28	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.844.600	D	27.028.533	618
29	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.849.567	D	27.034.583	652
30	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.825.883	D	27.147.633	253
31	Kazdağları	Sivrikatran	K	39.710.383	D	27.171.067	622
32	Kazdağları	Mıhlidere	K	39 38.794'	D	26 41.757'	651
33	Kazdağları	Mıhlidere	K	39 38.583'	D	26 43.766'	729
34	Kazdağları	Mıhlidere	K	39 40.096'	D	26 42.488'	729
35	Kazdağları	Mıhlidere	K	39 40.289'	D	26 42.778'	740
36	Kazdağları	Mıhlidere	K	39 40.558'	D	26 43.154'	770
37	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.647.200	D	26.696.400	638
38	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.671.250	D	26.713.533	718
39	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.673.967	D	26.721.167	734
40	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.676.533	D	26.721.083	776
41	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.681.967	D	26.726.050	833
42	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.686.733	D	26.729.033	861
43	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.700.067	D	26.743.467	930
44	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.700.500	D	26.752.683	1033
45	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.699.633	D	26.756.067	1061
46	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.696.200	D	26.754.783	1046
47	Kazdağları	Mıhlidere	K	39.693.800	D	26.751.867	1052
48	Kazdağları	Mıhlidere	K	38.357.050	D	28.087.200	1347
49	Kazdağları	Ayıgediği	K	39 42.217'	D	27 09.361'	754
50	Kazdağları	Ayıgediği	K	39 42.310'	D	27 09.057'	799
51	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.708.250	D	27.168.100	633
52	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.705.633	D	27.162.650	677
53	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.703.667	D	27.158.400	707
54	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.704.117	D	27.154.700	764
55	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.706.083	D	27.152.250	808
56	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.708.183	D	27.146.317	863
57	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.711.200	D	27.145.917	894
58	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.711.767	D	27.136.217	946
59	Kazdağları	Ayıgediği	K	39.697.200	D	27.176.633	691

Çizelge 3.1 (Devam)

60	Kazdağları	Gicikdere	K	39 41.826'	D	27 10.598'	738
61	Kazdağları	Gicikdere	K	39.694.483	D	27.179.800	722
63	Kazdağları	Gicikdere	K	39.691.850	D	27.180.067	733
65	Kazdağları	Gicikdere	K	39.694.067	D	27.180.467	743
66	Kazdağları	Gicikdere	K	39.646.000	D	26.696.417	636
67	Kazdağları	Gicikdere	K	39.697.200	D	27.176.633	691
68	Kazdağları	Gicikdere	K	39.41.718	D	27.12.407	685
69	Ege Bölgesi						
70	Ege Bölgesi						
71	Ege Bölgesi						
72	Ege Bölgesi						
73	Ege Bölgesi						
74	Ege Bölgesi						
75	Ege Bölgesi						
76	Ege Bölgesi						
77	Ege Bölgesi						
78	Ege Bölgesi						
79	Ege Bölgesi						
80	Ege Bölgesi						
81	Ege Bölgesi						
82	Karadeniz Bölgesi			40.829.800		38.943.283	460
83	Karadeniz Bölgesi			40.999.817		40.696.917	762

3.2.2 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, belirlenen kestane ağaçlarının kış mevsiminde, durgun dönemdeki odun tomurcuklarından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Kazdağları'nda belirlenen ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Bozdağ İstasyonu'nda arazide (*ex situ*) muhafazaya alınan örneklerden aralık-ocak aylarında bir yaşlı sürgünler toplanmıştır. Sürgünler laboratuvar ortamına getirilinceye kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Laboratuvarda bir yıllık sürgünlerden tomurcuklar koparılarak sıvı azot içerisinde havanda öğütülmüş ve 5 ml'lik crayo tüplerde -80°C'de muhafazaya alınmışlardır.



Şekil 3.5 DNA izolasyonu için alınmış bir yaşlı sürgünler.

Bu örneklerden DNA izolasyonu CTAB (cetyl-trimethylamonium-bromide) çözeltisi içeren Doyle and Doyle (1990)'un belirttiği yönteme göre bazı değişiklikler uygulanarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

▪ **Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları:**

• **CTAB Çözeltisi (1 litre için):**

Çizelge 3.2 CTAB çözeltisinin bileşimi (1 litre).

Kimyasal	Miktar	Derişim
dH ₂ O	600 ml	
CTAB	20 g	% 2
1 M Tris pH 8	200 ml	200 mM
0,25 M EDTA	200 ml	50 mM
NaCl	116,88 g	2 M
PVP 40	20 g	% 2

İlk olarak CTAB 400 ml ılık dH₂O'da çözülmüş; daha sonra diğer kimyasallar ilave edilmiştir.

• **İzolasyon çözeltisi ve hazırlanışı (yaklaşık 100-120 örnek için):**

Çizelge3.3 İzolasyon çözeltisinin bileşimi.

Çözelti-Kimyasal	Miktar
CTAB çözeltisi	100 ml
Sodium bisulfite	0,2 g
β-mercaptoethanol	7,5 ml

İlk olarak sodium bisülfite CTAB çözeltisi içerisinde eritilmiştir. β-mercaptoethanol çözelti kullanılacağı zaman ilave edilmiş ve 65°C'de bekletilmiştir.

▪ **İzolasyon aşamaları:**

- 1,5 ml'lik ependorf tüplere yaklaşık 150 mg liyofilize-öğütülmüş örnek alınmıştır,
- Sıcak su banyosunda 65°C' ye ısıtılmış izolasyon çözeltisinden tüplere 1 ml konulmuştur,
- Çözelti ile liyofilize dokunun karışması için tüpler 3-5 saniye çalkalanmıştır (vorteks),
- Tüpler 65°C' de 75 dakika inkube edilmiştir (bu sırada 10-15 dakika aralıklarla tüpler alt-üst edilmiştir),
- Sıcak su banyosundan tüpler oda sıcaklığında 5 dakika tutulduktan sonra 500 µl kloroform-izomil alkol (24:1) eklenmiş ve çalkalanarak karışması sağlanmıştır,
- Tüpler 10000 d/d (rpm) de 5 dakika santrifüj edilmiştir,
- Üstte kalan faz mikropipet ile alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 5 µl RNase (10mg/ml) ilave edilmiş, çalkalanarak 37°C' de 45 dakika inkubatörde bekletilmiştir,
- İnkubatörden alınan tüpler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve üzerine 750 µl -20°C isopropanol ilave edilmiştir. Tüpler yaklaşık 20 defa alt-üst edilerek karışması sağlanmıştır.

- -20°C’de 2 saat bekletilmiş, 10000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Tüplerdeki isopropanol boşaltılmıştır (dip kısmında oluşan peletin düşmemesine dikkat edilmiştir),
- Pellet 500 µl EtOH (%70) ile yıkanmıştır,
- Tüplere 350 µl TE çözeltilisi ilave edilmiş ve 65°C’de 30 dakika bekletilmiştir,
- 350 µl fenol:chloroform (1:1) ilave edilmiştir ve vorteks edilmiştir,
- 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek tüplerdeki üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır,
- 350 µl kloroform-izomil alkol (24:1) eklenmiş ve vorteks edilerek karışması sağlanmıştır,
- Tüpler 10000 d/d (rpm) de 5 dakika santrifüj edilmiştir,
- Üstte kalan faz mikropipet ile alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 350 µl -20°C isopropanol ilave edilmiştir. Tüpler yaklaşık 20 defa alt-üst edilerek karışması sağlanmıştır.
- -20°C’de 2 saat bekletilmiş, 10000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Tüplerdeki isopropanol boşaltılmıştır (dip kısmında oluşan pelletin düşmemesine dikkat edilmiştir),
- Pellet 500 µl EtOH (%70) ile yıkanmıştır,
- Tüpler oda sıcaklığında bekletilerek EtOH (%70)’nin tamamen uçması sağlanmıştır,
- Tüplere 100 µl TE çözeltilisi ilave edilmiş ve 65°C’de 30 dakika bekletilmiştir,
- Sıcak su banyosundan alınan tüpler 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir,
- Bu stok DNA’dan kalite ve miktar tayini için kullanıldıktan sonra PCR çalışmaları için gerekli seyreltmeler yapılmış ve stok -20°C’de saklanmıştır.
- **DNA miktar ve kalitesinin ölçülmesi:** Bu amaçla iki farklı yöntem kullanılmıştır.
- Stok DNA örneklerinden 10 µl alınarak 0,5 ml’lik tüplere aktarılmış ve üzerlerine 2 µl yükleme boyası (blue juice) ilave edilmiştir. Örnekler, 100, 250 ve 500 ng/µl λ DNA ile birlikte %1 lik agaroz jele yüklenmiş ve 100 mA’de 2 saat

süre ile yürütülmüştür. Jel resimleri UV görüntüleme sisteminde çekilmiş ve konsantrasyonlar tahmin edilmiştir.

- Stok DNA örneklerinden 1 µl örnek alınarak NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) ile ölçüm yapılmıştır. Örneklerin DNA miktarları ng/µl olarak kaydedilmiştir.

- **Stok DNA'nın seyreltilmesi:** Stok DNA örnekleri toplam 200 µl ve 20 ng/µl konsantrasyonu oranında sdH₂O ile seyreltilmiştir.

3.3.3 SSR tekniği

Çalışmada Buck et al. (2003) (EMCs) ve Marinoni et al. (2003) (CsCAT) tarafından geliştirilen 27 primer kullanılmıştır (Çizelge 7).

Çizelge 3.4 Kullanılan SSR primerleri

Sıra No	Lokus	Tekrar Motifi		Forward - reverse primer (5'-3')
1	EMCs2	[CGG] ₇	F	GCTGATATGGCAATGCTTTTCCTC
			R	GCCCTCCAGCCTCACCTTCATCAG
2	EMCs4	[GGC] ₇	F	CGCCGAACACCGACCTC
			R	GCCAAAACGACACCCAATCC
3	EMCs10	[CA] ₈	F	GTCTCCCCAATCATAAGTAGGTC
			R	TCAAGGGAACATTAGGTCATTTTT
4	EMCs11	[GGA] ₇ [GGC] ₆	F	ATCCACTCCACCAACAACAACC
			R	GGAGGGAGATGGGACGACG
5	EMCs13	[GCA] ₈	F	TAGTCGGAGTACGGGCACAG
			R	TGATATGAGCATTGACTTTGATT
6	EMCs14	[GAG] ₇	F	GTGCTTCAGGGACCTTTCTTCTC
			R	GCCGCCGCCTCCTGCTGCTC
7	EMCs15	[CAC] ₉	F	CTCTTAGACTCCTTCGCCAATC
			R	CAGAATCAAAGAAGAGAAAGGTC
8	EMCs17	[AGC] ₄ [CCAA] ₅	F	CGCCACGATTAGCTCATTTTCA
			R	GAGGTAGGGTCTTCTTCGGTCATC
9	EMCs22	[GA] ₁₉	F	GTGCCTCTGTATGCATGGTAAGC
			R	CCAGGTTTAAGAAAGCAAGCATAAC
10	EMCs25	[GA] ₁₂	F	ATGGGAAAATGGGTAAAGCAGTAA
			R	AACCGGAGATAGGATTGAACAGAA
11	EMCs32	[AG] ₁₈	F	TTCCACACTTATCTCTTAACCCAAAA
			R	CTCCGGTACGGTATTGACTTCCTT

Çizelge 3.4 (Devam)

12	EMCs38	[AG]31	F	TTTCCCTATTTCTAGTTTGTGATG
			R	ATGGCGCTTTGGATGAAC
13	EMCs42	[CA]11	F	GTTGGCTTCTTCAATGAACTCTC
			R	CCGGTATGAGGAAAGGAATGTTA
14	CsCAT 1	(TG)5TA(TG)24	F	GAGAATGCCCACTTTTGCA
			R	GCTCCCTTATGGTCTCG
15	CsCAT2	(AG)16	F	GTAACCTGAAGCAGTGTGAAC
			R	CGCATCATAGTGAGTGACAG
16	CsCAT3	(AG)20	F	CACTATTTTATCATGGACGG
			R	CGAATTGAGAGTTCATACTC
17	CsCAT4	(CA) ₂₃	F	CATAGGTTCAAACCATAACCCGTG
			R	CTCATCTTTGTAGGGTATAATACC
18	CsCAT5	(GA) ₂₀	F	CATTTTCTCATTGTGGCTGC
			R	CACTTGACATCCAATTAGG
19	CsCAT6	(AC) ₂₄ AT(AC) ₄	F	AGTGCTCGTGGTCAGTGAG
			R	CAACTCTGCATGATAAC
20	CsCAT7	(TG) ₈ CG(TG) ₄	F	GAACATGATGATTGGCCTC
			R	CCAAACATGACATATGTCCC
21	CsCAT8	(GT) ₇ (GA) ₂₀	F	CTGCAAGACAAGAATTACAC
			R	GAATAACCTGCAGAAGGC
22	CsCAT14	(CA) ₂₂	F	CGAGGTTGTTGTTTCATTAC
			R	GATCTCAAGTCAAAAGGTGTC
23	CsCAT15	(TC) ₁₂	F	TTCTGCGACCTCGAAACCGA
			R	GCTAGGGTTTTTCATTTCTAG
24	CsCAT16	(TC) ₂₀	F	CTCCTTGACTTTGAAGTTGC
			R	CTGATCGAGAGTAATAAAG
25	CsCAT17	(CA) ₁₉ A(CA) ₂ AA(CA) ₃	F	TTGGCTATACTTGTTCTGCAAG
			R	GCCCCATGTTTTCTTCCATGG
26	CsCAT34	(GT) ₂₃	F	TGAGCAAGGATGGATGATGAG
			R	GGTGGTCATCATGACTGCATC
27	CsCAT41	(AG) ₂₀	F	AAGTCAGCAACACCATATGC
			R	CCCCTGTTTCATGAGTTTCT

Çizelge 3.5 SSR primerleri için PCR bileşenleri.

Bileşen	Miktar
sdH ₂ O	15,25 µl
10 X PCR çözeltisi	2,5 µl
dNTP	0,75 µl
MgCl ₂	1,5 µl
F Primer	1 µl
R Primer	1 µl
Taq polimeraz	0,5U
Toplam	25 µl

Çizelge 3.6 SSR primerlerine uygulanan PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık °C	Süre (dk:sn)	Döngü sayısı
1.Ön denaturasyon	95	9:00	
2.Denaturasyon	94	1:00	} x 35
3.Primer bağlanma	50-65	1:00	
4.Yazılım	72	1:30	
5.Son yazılım	72	7:00	
5. Bekletme	4	∞	

3.3.4 Verilerin değerlendirilmesi

SSR verilerinin analizinde, bantların varlığı “1”; yokluğu “0” olarak kodlanmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde NTSYS-pc version 2.2j (Applied Biostatistics Inc, Setauket, New York, USA) istatistiksel analiz paket program kullanılmıştır.

Değerlendirme aşamasında,

-Dice (1945) benzerlik matrisi oluşturulmuştur,

- Benzerlik matrisinden SHAN modülü kullanılarak UPGMA modülüne göre kümeleme (cluster) analizi yapılmış ve dendogram oluşturulmuştur.

-Ana bileşen (PC, Principle component) analizi için genotipler arasında korelasyon matrisi oluşturulmuş ve bu matris verileri kullanılarak 3 ana bileşen verileri üzerinden iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler oluşturulmuştur.

-Ana bileşen analizinde ilk üç "eigen" değerinin genotipler arasındaki varyasyonu açıklama oranlarının kümülatif değerinin % 25 ve üzerinde olması hallerinde analiz verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

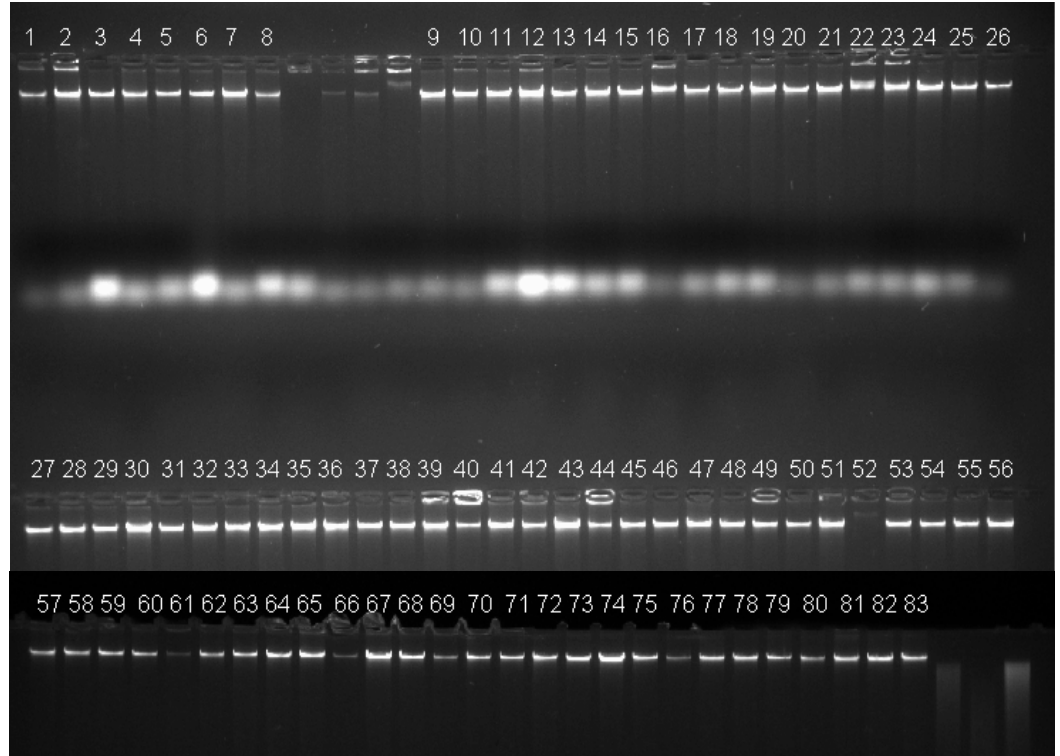
-Kümeleme analizi ile elde edilen dendogramın güvenilirliğini test etmek için, elde edilen matris verilerinden "coph" (cophenetic) matrisi oluşturulmuş ve bu matris ile ham verilerden elde edilen Dice modülüne göre hazırlanmış matris verileri Mantel (1967) testi ile karşılaştırılmıştır. Korelasyon katsayısının 0,5'ten büyük olduğu durumlarda ($r \geq 0,5$) dendogram $p=0,01$ önem seviyesine göre güvenilir olarak kabul edilmiştir (Manimekalai et al., 2007).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan 83 kestane genotipinden elde edilen DNA örneklerin stoklarından 10 µl alınarak 0,5 ml'lik tüplere aktarılmış ve üzerlerine 2 µl yükleme boyası ilave edilmiştir. Örnekler, 100, 250 ve 500 ng/µl λ DNA ile birlikte %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 100 mA'de 2 saat süre ile yürütülmüştür. Jel resmi UV görüntüleme sisteminde çekilmiştir (Çizelge 4.1). Bu resimden; 100, 250 ve 500 ng/µl λ DNA'lar ile örneklerin DNA miktarları kıyaslandığında, örneklerde 250-1000 ng/µl arasında DNA konsantrasyonu olduğu tahmin edilebilir. Resmin incelenmesinden çıkarılacak bir diğer sonuç da, kestane genotiplerinin DNA bantlarının çok net görüntülediği, SSR yöntemi ile gerçekleştirilecek PCR çalışmaları için yeterli saflıkta olduğunun görülmesidir.

Örneklerin DNA miktarlarını belirlemek için stok DNA örneklerinden 1 µl alınarak NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) ile ölçüm yapılmıştır. Örneklerin DNA miktarları ng/µl olarak Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.



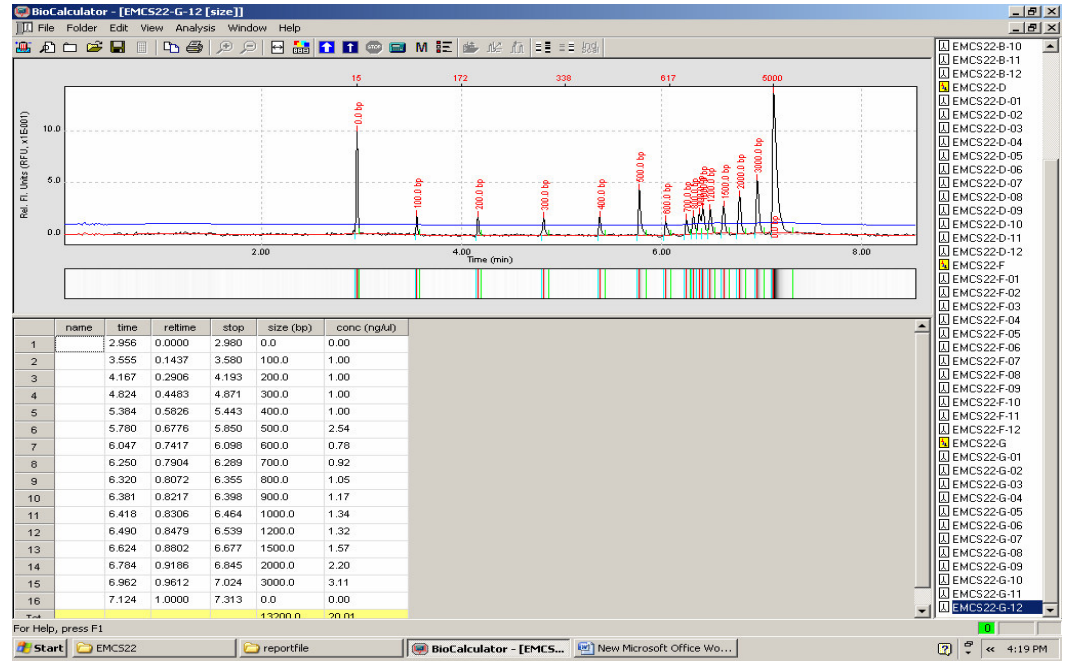
Şekil 4.1 DNA bantlarının agaroz jeldeki görüntüsü.

Çizelge 4.1 Örneklerden izole edilen DNA miktarları.

No	ng/ul	No	ng/ul
1	582	43	501
2	879	44	963
3	669	45	322
4	884	46	334
5	1001	47	305
6	678	48	262
7	828	49	734
8	1087	50	1070
9	771	51	1369
10	971	52	730
11	953	53	544
12	977	54	1212
13	924	55	1035
14	997	56	824
15	836	57	557
16	1350	58	761
17	876	59	515
18	879	60	687
19	585	61	849
20	1206	62	3276
21	910	63	1931
22	1403	64	2388
23	454	65	462
24	567	66	738
25	583	67	806
26	1210	68	275
27	791	69	1477
28	914	70	783
29	521	71	303
30	1264	72	874
31	538	73	546
32	441	74	421
33	384	75	437
34	570	76	498
35	551	77	357
36	582	78	333
37	403	79	473
38	436	80	414
39	817	81	534
40	441	82	557
41	309	83	105
42	418		

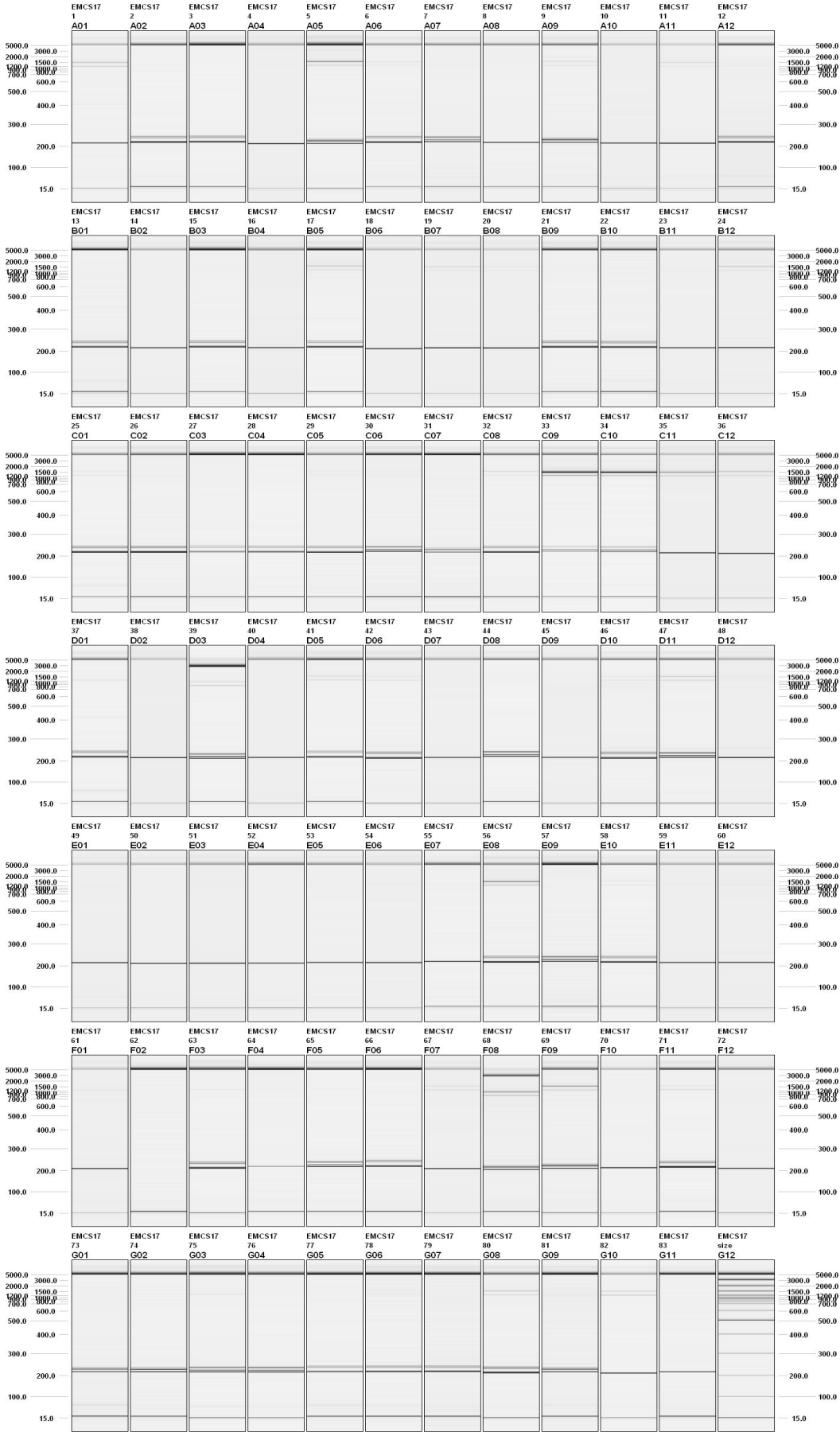
4.2 Mikrosatelit (SSR) Analizleri

Yöntem kısmında detaylı olarak belirtildiği gibi, DNA izolasyonundan sonra, DNA'nın seyreltilmesi ve PCR uygulaması gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri kapillar jel elektroforezinde (QIAGEN QIAxcel) yürütülmüş ve PCR ürünlerinin büyüklükleri kullanılan ölçüt markörüne (size marker) göre (Şekil 4.2) sistem dahilindeki yazılım programı (Bio Calculator) ile hesaplanmıştır. Şekil 4.2'de EMCs 22 primeri PCR ürünlerinin kıyaslandığı ölçüt markörün oluşturduğu pikler görülmektedir.

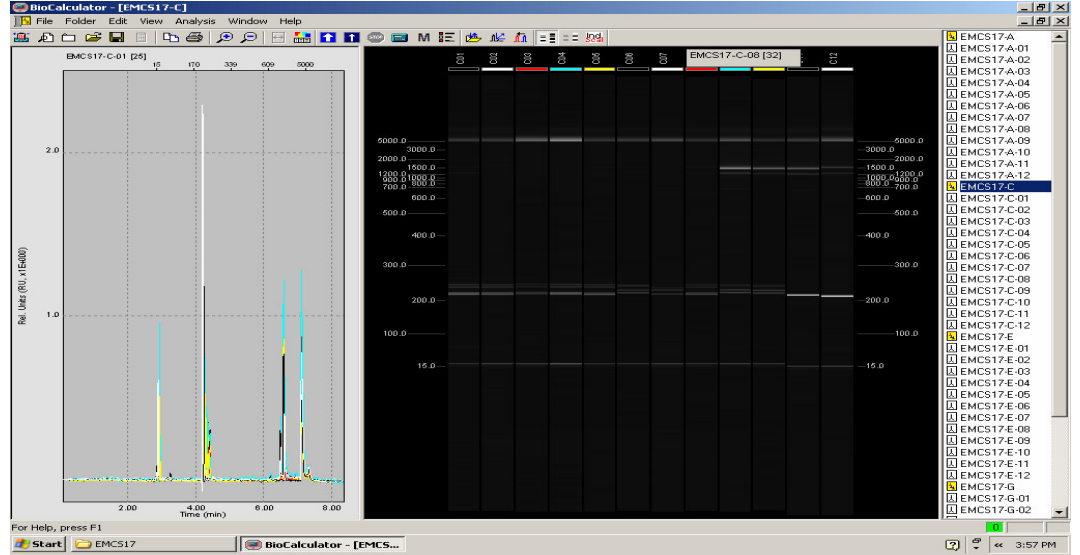


Şekil 4.2 Ölçüt markörünün kapillar sistemde 100 bp-3 kb arasında oluşturduğu pikler.

Kapillar jel elektroforezi sisteminin yazılım programı ile, kestane örneklerinin kullanılan primer ile oluşturulmuş PCR ürünlerinin büyüklükleri belirlendikten sonra jel görüntüsü şeklinde de çıktısı alınmıştır. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de EMCs 17 primeri ile gerçekleştirilen PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin resim halinde çıktısı görülmektedir. Şekil 4.3'de "G12" sütununda ölçüt markörün oluşturduğu bantlar görülmektedir.

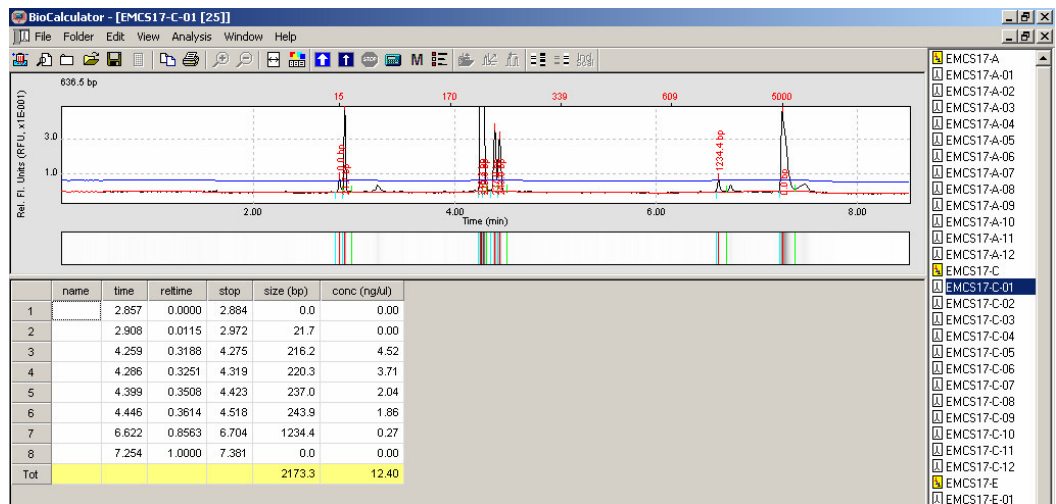


Şekil 4.3 EMCS17 primeri ile gerçekleştirilmiş PCR ürünlerinin bant büyüklükleri.



Şekil 4.4 EMCS 17 primeri ile PCR sonucu C01(25)-C12(36) örneklerinde oluşan bantların görünümü.

Kullanılan primere göre PCR uygulaması sonucu oluşan bantların büyüklükleri ve örnekler bazında skorlanması, her örnek için oluşan PCR ürünün oluşturduğu piklerin yazılım programı ile bant büyüklüğünün hesaplanması yolu ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.5’de EMCS 17 primerinin C-01 hücresindeki örnek için (25 numaralı örnek) PCR sonucunda oluşturduğu ürünlerin gerçekleştirdiği pikler görülmektedir. Piklerin ölçüt markör ile karşılaştırılması işlemi için, atanan bir eşik değeri (treshold) üstünde konsantrasyona sahip pik noktaları için bant büyüklüğü hesaplanmıştır. Şekil 4.5’de EMCS 17 primeri ile 25 numaralı örnekte 216 bp-243 bp arasında 4 bant oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.5 EMCS 17 primeri ile PCR sonucu 25 (C-01) numaralı örnekte oluşan pik değerleri.

EMCs38 ve CsCAT3 primerleri ile örneklerin çoğunda amplifikasyon gerçekleşmediği için değerlendirilmeye alınmamıştır. Toplam 25 primer için belirlenen allel büyüklükleri, yazılım programına tanımlanmış ve o alleli içeren ve içermeyen örnekler için skorlama yapılarak “binary” tablosu oluşturulmuştur. Her primer için PCR sonucu oluşan minimum ve maksimum allel büyüklükleri ve toplam allel sayıları Çizelge 4.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2 Kullanılan SSR primerlerinin PCR sonucu oluşturdukları allel büyüklükleri ve sayıları.

Sıra No	Lokus	Alel Büyüklüğü (bp)		Alel sayısı
		Min.	Maks.	
1	EMCs2	160	182	5
2	EMCs4	170	195	5
3	EMCs10	227	252	3
4	EMCs11	130	145	2
5	EMCs13	155	164	2
6	EMCs14	132	148	3
7	EMCs15	90	98	3
8	EMCs17	210	246	6
9	EMCs22	128	157	6
10	EMCs25	149	167	3
11	EMCs32	109	236	4
12	EMCs42	230	254	3
13	CsCAT 1	190	236	5
14	CsCAT2	200	245	6
15	CsCAT4	223	250	4
16	CsCAT5	220	280	6
17	CsCAT6	182	224	6
18	CsCAT7	192	225	4
19	CsCAT8	192	225	4
20	CsCAT14	145	195	5
21	CsCAT15	145	195	5
22	CsCAT16	148	148	2
23	CsCAT17	155	160	2
24	CsCAT34	174	190	4
25	CsCAT41	205	239	4

Değerlendirmeye alınan 25 primerde toplam 102 allel oluşmuştur ve tamamında polimorfizim gözlenmiştir. Allel sayıları her bir lokus için 1-6 arasında değişim göstermiştir; lokus başına ortalama allel sayısı 4,08 olarak hesaplanmıştır.

“CsCAT” olarak belirtilen SSR primerlerinin geliştirildiği çalışmada Marinoni et al. (2003), Kuzey İtalya’da yetiştirilen 20 çeşit üzerinde, her bir lokus için 4 ile 10 arasında (ortalama=6,4) allel belirlemiştir. Lokusların önemli bir kısmı için allel büyüklükleri bu çalışmada elde edilen aralıklara yakın bulunmuştur. Ancak farklı durum, CsCAT14 lokusu için dikkat çekmiştir. Marinoni et al. (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada CsCAT 14 lokusunda incelenen örnekler için sekanslama yöntemi kullanılarak 135 bp-163 bp arasında 3 allel tespit edilirken; bu çalışmada, 145 bp-195 bp arasında 5 allel tespit edilmiştir. Bu sonucun incelenen örnekler arasındaki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

“EMCs” olarak belirtilen SSR primerlerinin geliştirildiği çalışmada (Buck et al., 2003) belirlenen bu mikrosatelitler İngiltere’deki 3 kestane popülasyonu ve Türkiye orijinli genotipler kullanılarak oluşturulmuş haritalama popülasyonunda çeşitliliğin belirlenmesi için kullanılmış ve her lokusta 2 ile 14 arasında (ortalama=5,15) allel belirlenmiştir. Söz konusu sonuçlar çalışma verileri ile ilişkilendirildiği zaman, yukarıdaki çalışmadaki ile benzer bir durum EMCs2 lokusu için dikkati çekmektedir. Buck et al., (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bu lokus için, 172 bp-178 bp arasında 3 allel tespit edilirken; bu çalışmada 160 bp-182 bp arasında 6 allel tespit edilmiştir.

Hozova et al. (2009) Çek Cumhuriyeti’nde 21 kestane genotipinde Buck et al. (2003) ve Marinoni et al. (2003) tarafından geliştirilen 7 SSR primeri kullanarak moleküler düzeyde gerçekleştirdiği karakterizasyon çalışmasında; kullanılan SSR lokusları için oluşan allel büyüklüklerinin bu çalışmadakine benzer olduğu görülmektedir.

Botta et al. (2004), moleküler markörleri kullanarak kestane çeşitlerinin tanımlanması model çalışmasında beş kestane çeşidini (Garrone rosso, gentile, gioviasca, marrone di cuneo, marrubia, tempuriva) Marinoni et al. (2003) tarafından geliştirilen 3 SSR primeri (CsCAT 1, CsCAT 3, CsCAT 6) ile test edilmiştir. Çeşitler bazında allel büyüklükleri; CsCAT 1 primerinde 194 bp-223 bp arasında; CsCAT 3 primerinde 225 bp-251 bp arasında; CsCAT 6 primerinde

161 bp- 197 bp arasında tespit edilmiştir. CsCAT1 ve CsCAT6 lokusları için belirlenen değerler bu çalışmadakine yakın değerlerdir.

İsviçre’de yerinde (*in situ*) ve koleksiyonda muhafaza edilen 164 kestane genotipinin SSR primerleri kullanarak moleküler düzeyde karakterizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada (Gobbin et al.,2007), bu çalışmadaki ile ortak primerler de kullanılmıştır (CsCAT 2, CsCAT 14, CsCAT 17, EMCS 22). Bu primerlerden elde edilen allel büyüklükleri aralığı, diğer çalışmalardaki gibi yakın değerler vermiştir. Ancak, dikkat çekici bir husus, CsCAT2 primerinde gözlenmiştir. CsCAT2 primeri 187 bp-245 bp arasında 21 allel oluşturmuştur.

Kestane çeşitlerinin DNA düzeyinde genetik olarak tanımlanması ve sertifikalandırılması için gerçekleştirilen çalışmada 6 SSR primeri (CsCAT1, CsCAT2, CsCAT3, CsCAT14, CsCAT15, CsCAT16) kullanılmıştır. Çalışmada DNA sekanslama ve floresan boyama yöntemi ile primerlerin etiketlenmesi yöntemi kullanılarak, birkaç lokusun aynı anda amplifikasyonu sağlanarak, çoklu SSR analizi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. 96 genotip için 5 SSR lokusu oluşturduğu allel sayısı ve büyüklükleri bakımından karakterize edilmiştir (Botta et al., 2001). CsCAT1 primerinde 178 bp-225 bp arasında 12; CsCAT2 primerinde 197 bp-237 bp arasında 16 allel; CsCAT15 primerinde 125 bp-160 bp arasında 8 allel; CsCAT17 primerinde 134 bp-166 bp arasında 11 allel tespit edilmiştir. Sözkonusu değerler, bu tez çalışmasının verileri ile karşılaştırıldığında, allel büyüklüklerinin yakın aralıklarda olduğu; ancak allel sayılarının farklı olduğu görülmektedir.

Yukarıda belirtilen çalışmaların genelinde ortaya çıkan sonuç, analiz edilen her bir SSR lokusu için elde edilen allel büyüklüklerinin genellikle yakın aralıklarda olduğu; ancak, belirlenen allel sayısının özellikle sekanslama yöntemi ile yapılan çalışmalarda daha fazla olduğudur. Bu yöntemin kullanıldığı çalışmalarda allel büyüklükleri arasındaki bütün farklılıklar ayırd edilmiştir. Örneğin; Botta et al. (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada CsCAT17 lokusunda 134 bp-166 bp arasında 11 allel tespit edilmiştir; bu da alleller arasında yaklaşık 3 bp’lik bir farkın ayırd edilmesi anlamına gelmektedir.

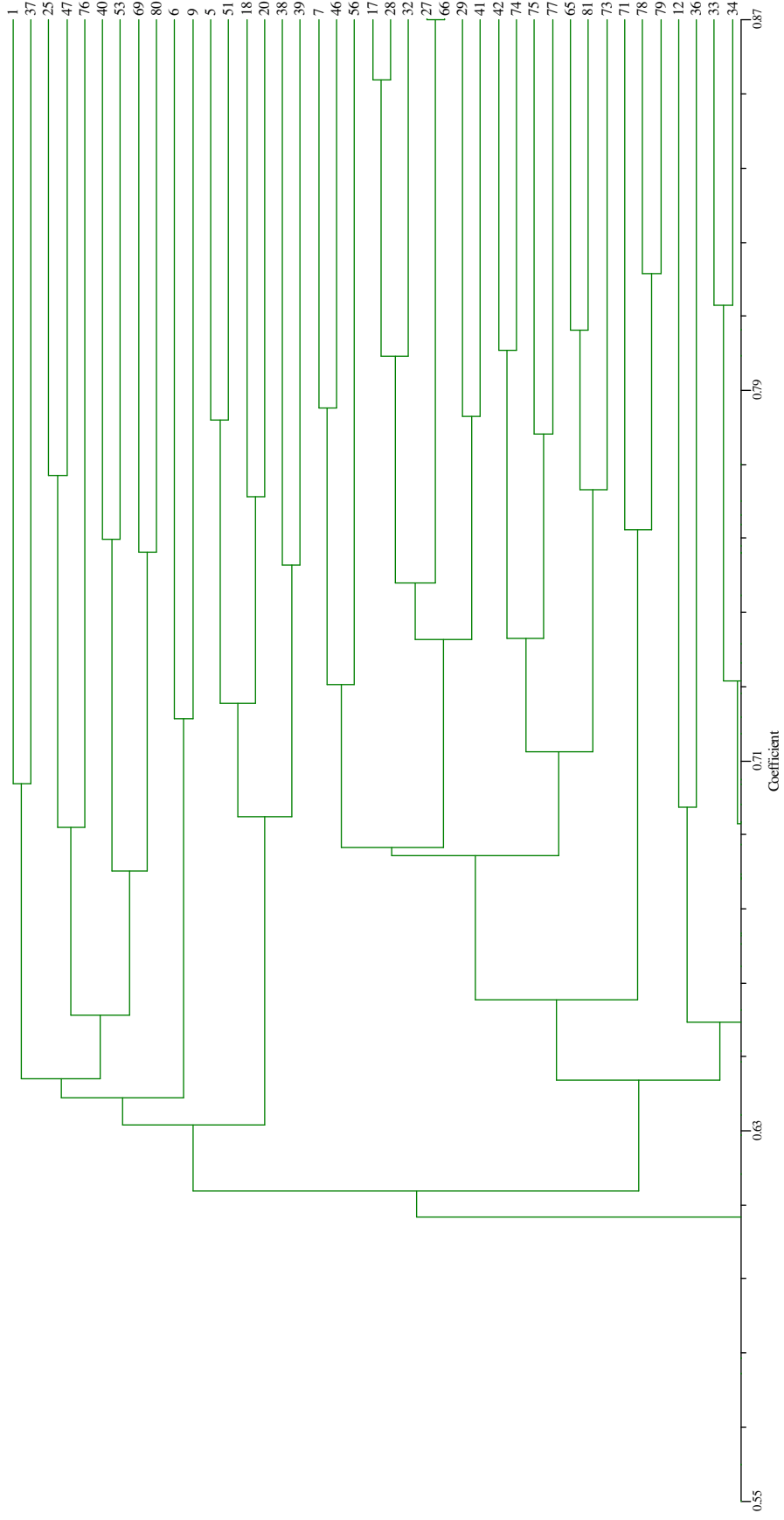
Bu çalışmada kullanılan kestane örneklerinin genetik çeşitliliğinin belirlemek için, elde edilen skorlama verileri ile, yöntem bölümünde detaylı olarak belirtildiği gibi;

- Kümeleme (Cluster) analizi yapılarak dendogram oluşturulmuştur,
- Kümeleme analizi verilerinin güvenilirliğinin testi için “coph” (cophenetic) matrisi ile Dice modülüne göre hazırlanmış matris verileri arasındaki korelasyon için Mantel (1967) testi yapılmıştır,
- Ana bileşen (PC, Principle component) analizi yapılmıştır,
- İlk 3 ana bileşen verileri üzerinden örneklerin iki boyutlu ve üç boyutlu dağılım grafikleri oluşturulmuştur,
- Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ve toplam varyasyonu açıklama oranı değerleri hesaplanmıştır.

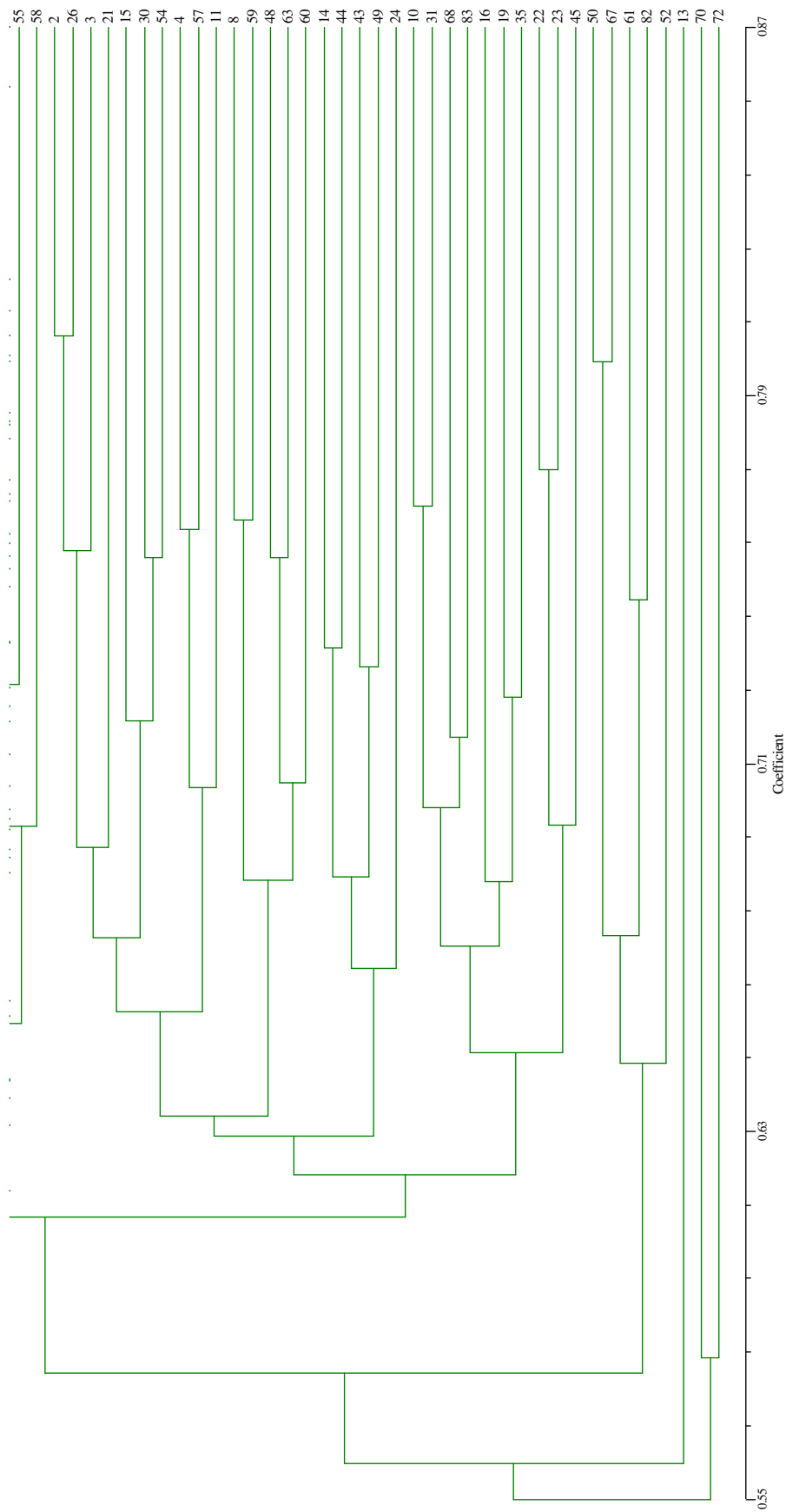
Belirtilen bu analizler öncelikle çalışmaya dahil edilen bütün örnekler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu veriler incelenerek Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanı olarak (GEKYA) önerilen (Küçük et al., 1998) Mıhlidere, Sarıot, Sivrikatran, Ayıgediği ve Gicikdere popülasyonlarındaki örneklerin kendi içindeki benzerlikleri ile Ege Bölgesi (Özkarakaş vd.,1995) ve Karadeniz Bölgesi (Küçük v.d.,2008) örnekleri arasındaki benzerlikler tartışılmıştır.

Belirtilen analizler daha sonra çalışmanın ana materyalini oluşturan Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanı olarak (GEKYA) önerilen (Küçük et al., 1998) Mıhlidere, Sarıot, Sivrikatran, Ayıgediği ve Gicikdere popülasyonları için ayrı ayrı yapılmıştır. Bu verileri ile de önerilen GEKYA’ların kendi içlerindeki çeşitliliği tartışılmış ve birbirleri ile mukayese edilmiştir.

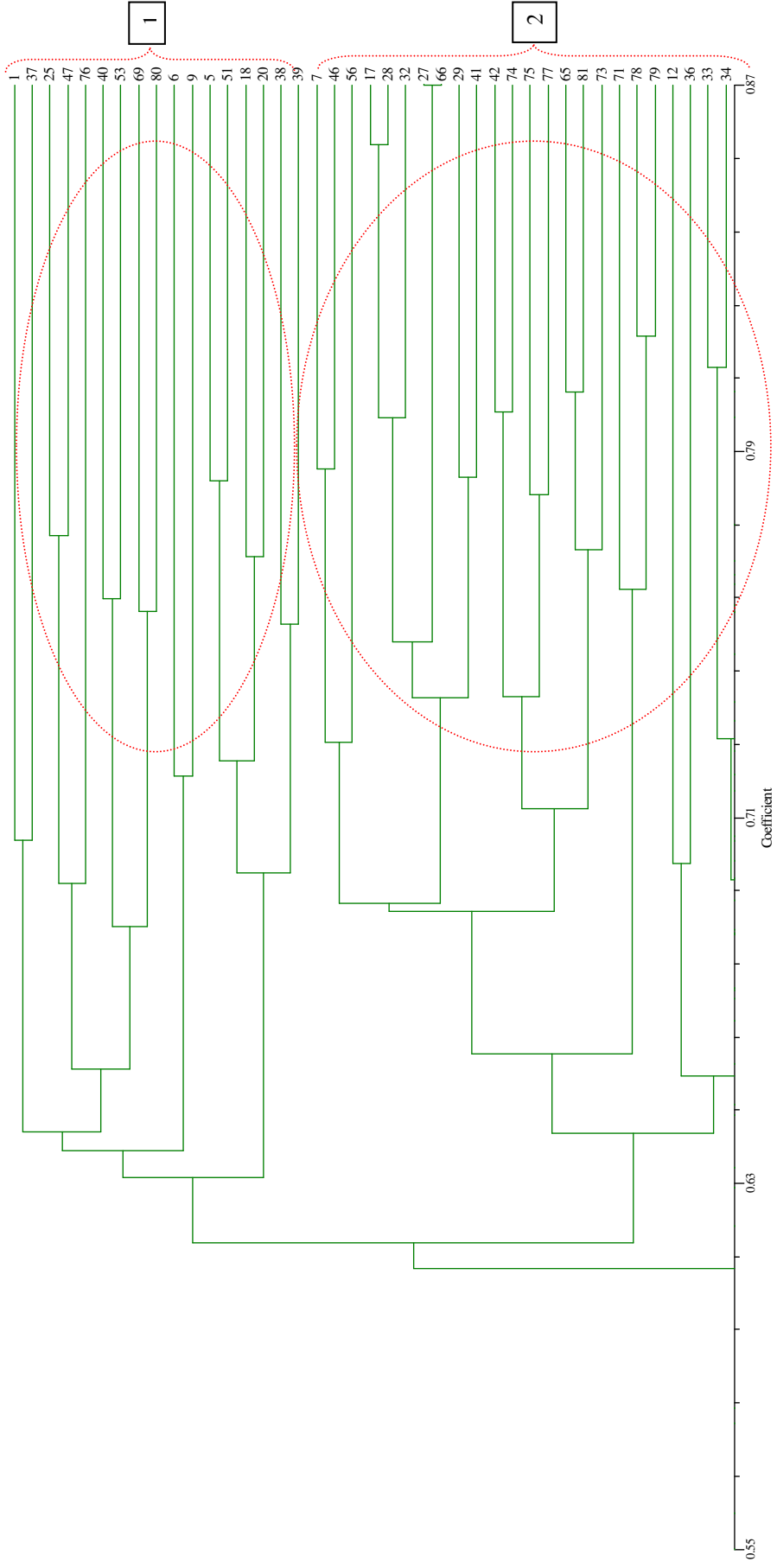
Çalışma kapsamında DNA izolasyonu yapılan 83 örnekten 62 ve 64 numaralı örnekler, primerlerin önemli bir kısmında PCR sonucu amplifikasyon gerçekleşmediği için analiz dışında bırakılmıştır. 81 örnek için Dice (1945) benzerlik matrisi oluşturularak (Ek Çizelge 1), “NTSYS-pc version 2.2” istatistiksel analiz paket programında SHAN modülü kullanılarak UPGMA kümeleme (cluster) analizi sonucu oluşturulan dendogram Şekil 4.6’da ve Şekil 4.7’de belirtilmiştir.



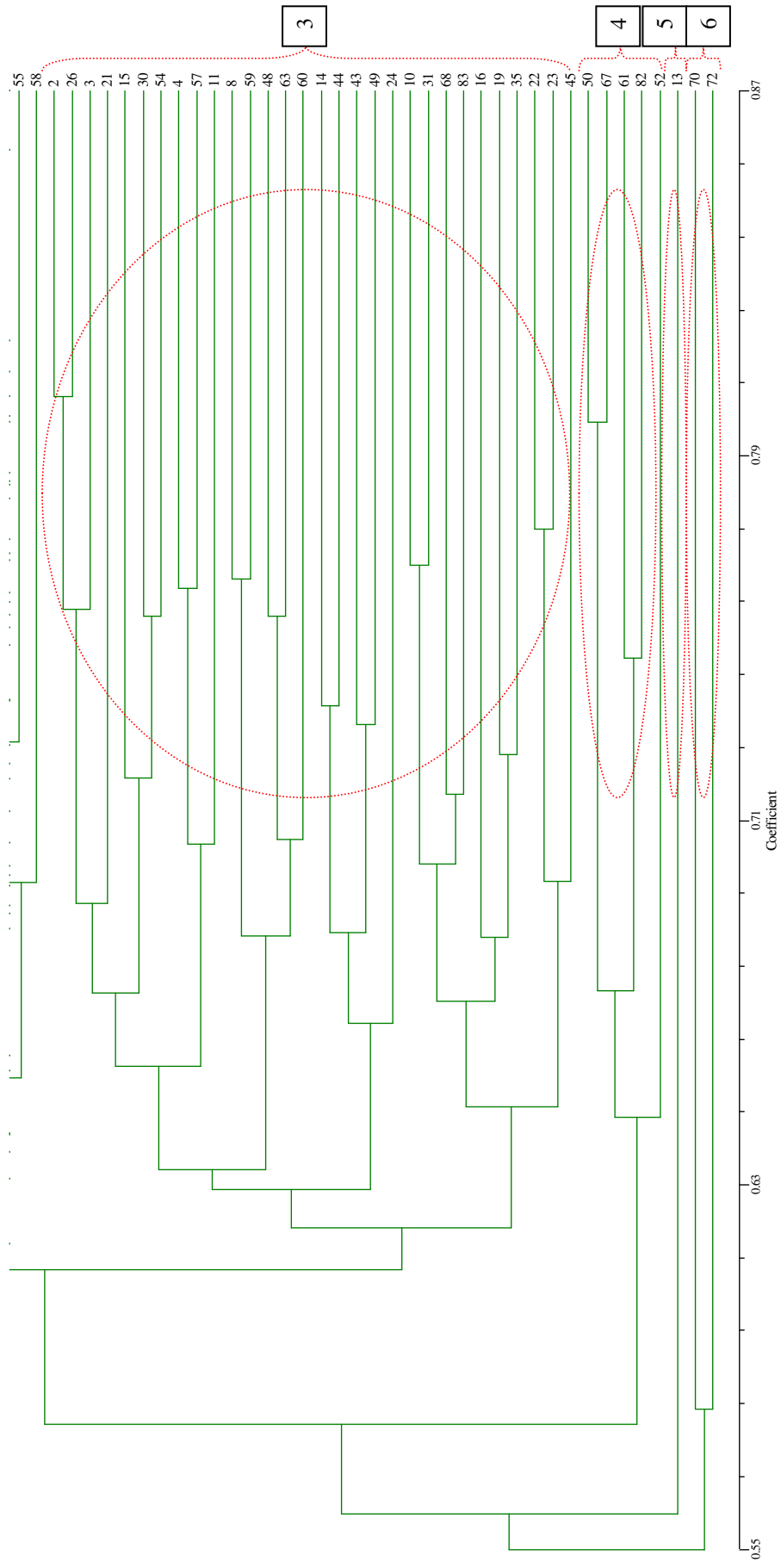
Şekil 4.6 Moleküler analiz yapılan 81 kestane örneğinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendrogram.



Şekil 4.6 (Devam)



Şekil 4.7 81 örneğin kümeleme analizi sonucu oluşan ana gruplar.



Şekil 4.7 (Devam)

Analiz edilen 81 örnek için oluşturulan Dice (1945) benzerlik matrisi (Ek Çizelge 1), ve UPGMA modülüne göre oluşturulan kümeleme (cluster) analizi dendogramı incelendiğinde (Şekil 4.6), genotipler arasında 0,55 ile 0,87 arasında benzerlik katsayılarının olduğu görülmektedir. Dendogram genelinde belirgin bir kümelenme oluşmamıştır. Benzer şekilde, Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanı olarak (GEKYA) önerilen (Küçük et al., 1998) Mıhlidere, Sarıot, Sivrikatran, Ayıgediği ve Gicikdere popülasyonlarındaki örneklerin kendi içindeki benzerlikleri ile Ege Bölgesi (Özkarakaş vd.,1995) ve Karadeniz Bölgesi (Küçük v.d.,2008) örnekleri arasında da belirgin bir kümelenme oluşmamıştır. Oluşan dendogram, yaklaşık 0,60 benzerlik katsayısı üzerinden gruplara ayrıldığı zaman, 6 ana grup oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.7). 5 numaralı grup sadece 13 numaralı örnekten oluşmakta ve 0,56 benzerlik katsayısı ile diğer gruplarla ilişkilendirilmektedir.

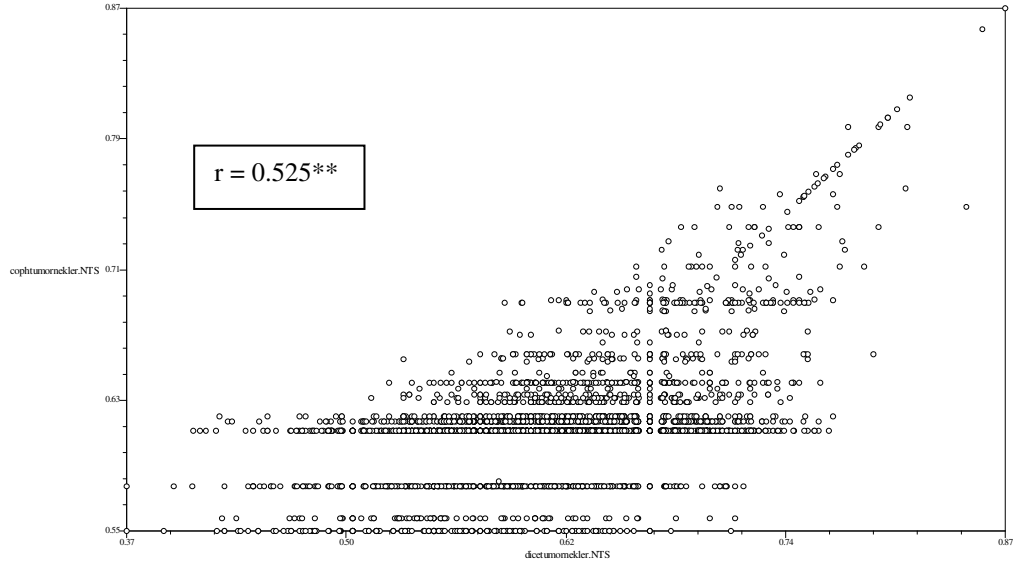
Bu çalışmada da kullanılan 7 SSR primeri kullanarak Çek Cumhuriyeti'nde 21 kestane genotipinin moleküler düzeyde karakterizasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada UPGMA yöntemine göre genetik uzaklık değerleri ile oluşturulan dendogramda, genotipler arasındaki genetik uzaklık değeri 0,1-0,5 arasında belirtilmiştir. Sözkonusu değer ile bu çalışmada elde edilen benzerlik katsayılarının birbirinin tersi olduğu düşünülürse, birbirine yakın olduğu söylenebilir.

Nei and Li (1979)'e göre UPGMA yöntemi ile kümeleme analizi yapılan çalışmada ISSR markör sistemine göre benzerlik katsayısı yaklaşık 0,80-0,98 arasında; RAPD markör sistemine göre ise yaklaşık 0,78- 0,97 arasında bulunmuştur (Goulao et al., 2001).

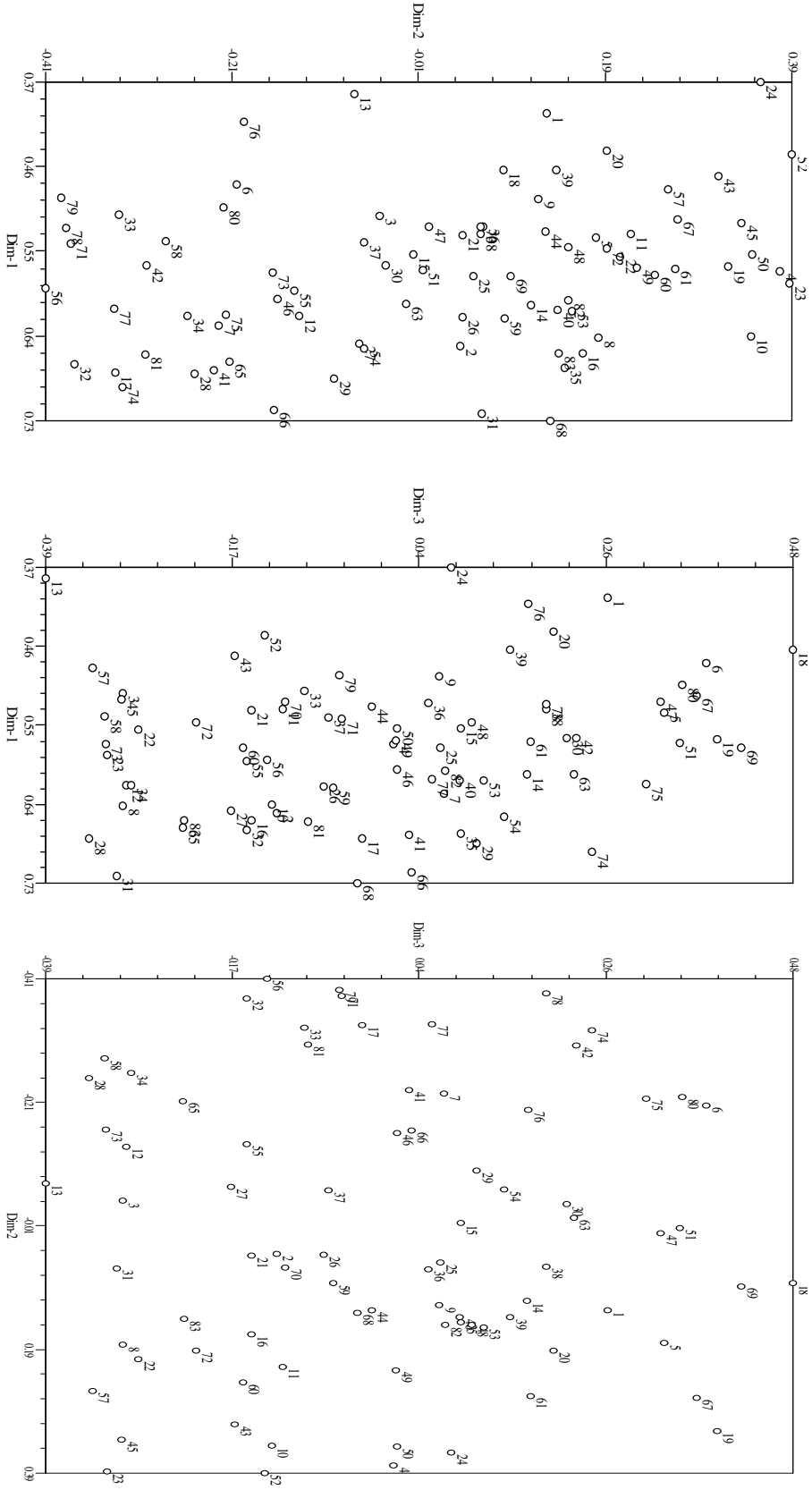
Gobbin et al. (2007) İsviçre'de yerinde (*in situ*) ve koleksiyonda muhafaza edilen 164 kestane genotipinin SSR primerleri kullanarak moleküler düzeyde karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Neighbour-joining yöntemi ile genetik uzaklık matrisi verilerinden dendogram oluşturulmuştur. Dendogramda genetik uzaklık değeri "0" dan başlamış ve çalışmada 4 sinonim örnek tespit edilmiştir.

Kümeleme analizi ile elde edilen dendogramın matris verilerinden oluşturulan "coph" (co-phenetic) matrisi ile Dice (1945) modülüne göre hazırlanmış benzerlik matrisi verileri arasında Mantel (1967) testi ile oluşturulan korelasyon grafiği Şekil 4.8'de belirtilmiştir. İki matris arasındaki korelasyon

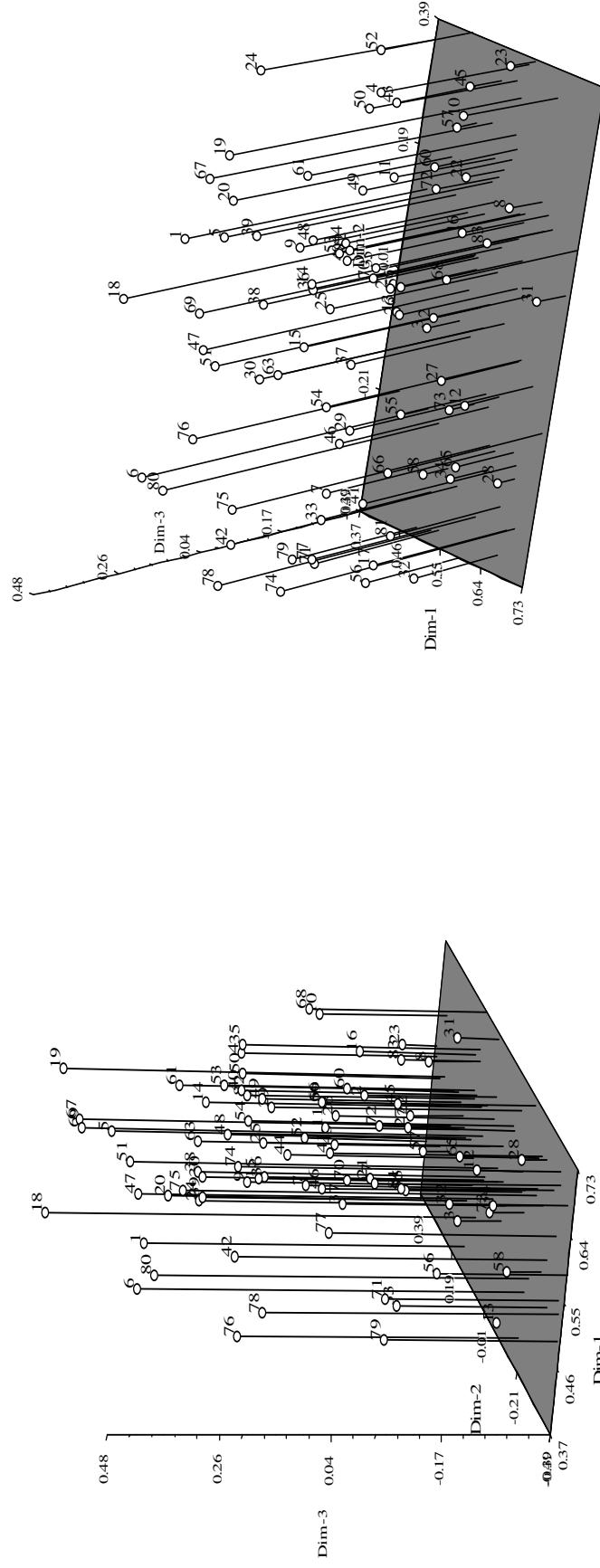
katsayısı; $r=0,525$ bulunmuştur. Bu değer $p=0,01$ önem seviyesine göre güvenilir olarak kabul edilmiştir (Manimekalai et al., 2007).



Şekil4.8 81 örneğin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği.



Şekil 4.9 Ana bileşen analizi sonucu 81 örneğin ilk üç bileşene göre iki boyutlu grafikleri.



Şekil 4.10 Ana bileşen analizi sonucu 81 örneğin ilk üç bileşene göre üç boyutlu grafiği.

Ana bileşen (PC, Principle component) analizi sonucu, 81 kestane genotipinin 3 ana bileşen etrafındaki dağılımını gösteren iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 da verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde, 81 kestane genotipinde kümeleme analizinde olduğu gibi belirgin bir gruplaşma oluşmadığı, genotipik çeşitliliğin yagın olduğu, benzerliğin düşük olduğu görülmektedir.

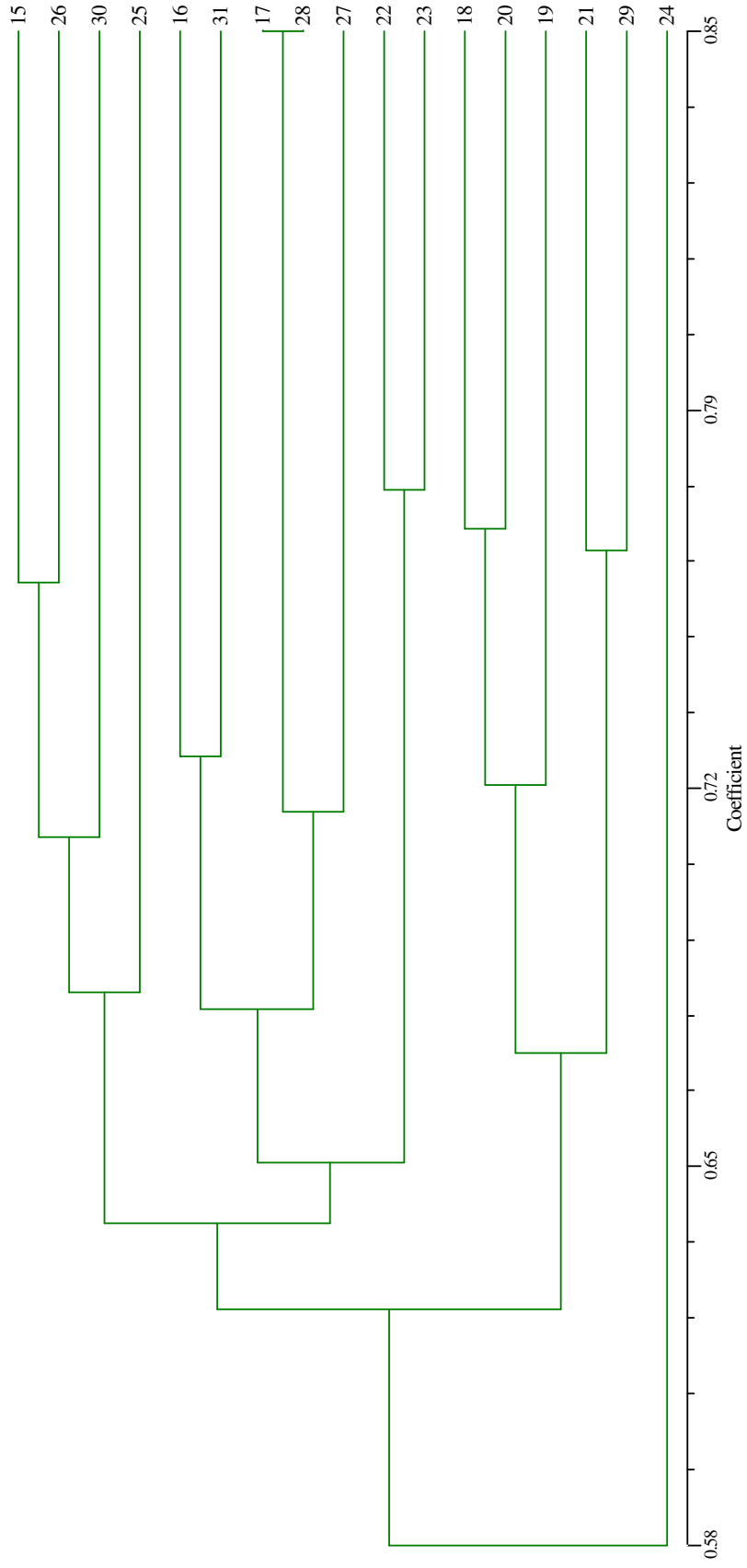
Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ile, bu ana bileşenlerle açıklanabilen toplam varyasyonu oranları Çizelge 4.3’de belirtilmiştir. İlk üç ana bileşen ile açıklanabilen toplam varyasyon oranı % 43,1 olarak bulunmuştur. Bu değer % 25 ve üzerinde olduğu için, ana bileşen analizi verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

Çizelge 4.3 Ana bileşen analizi sonucu ilk üç bileşenin “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.

Ana bileşen	“Eigen” değeri	Açıklanan varyasyon (%)	Kümülatif varyasyon (%)
1	27.20	33.5	33.5
2	4.01	4.9	38.5
3	3.69	4.5	43.1

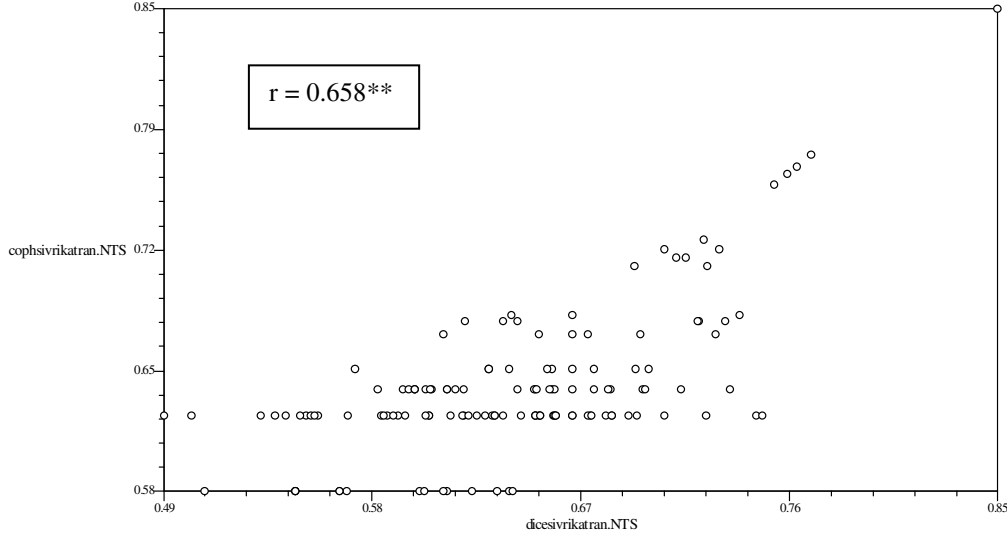
Çalışmada materyal olarak kullanılan örneklerin tamamı değerlendirilerek yapılan analizlerin yanı sıra çalışmanın ana materyalini oluşturan Kazdağları kestane gen koruma ve yönetim alanı olarak (GEKYA) önerilen (Küçük et al., 1998) Mıhlidere, Sarıot, Sivrikatran, Ayıgediği ve Gicikdere popülasyonlarına ait genotiplerin ayrı ayrı değerlendirildiği analizlere ilişkin sonuçlar aşağıda verilmektedir.

Sivrikatran kestane popülasyonlarından alına örneklerin Dice (1945) benzerlik matrisi ve UPGMA modülü kullanılarak oluşturulan kümeleme (cluster) analizi dendogramı Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Genotipler arasındaki benzerlik katsayısı 0,58 ile 0,85 arasında değişim göstermiştir. Genotipler belirgin bir kümelenme oluşturmamışlardır.



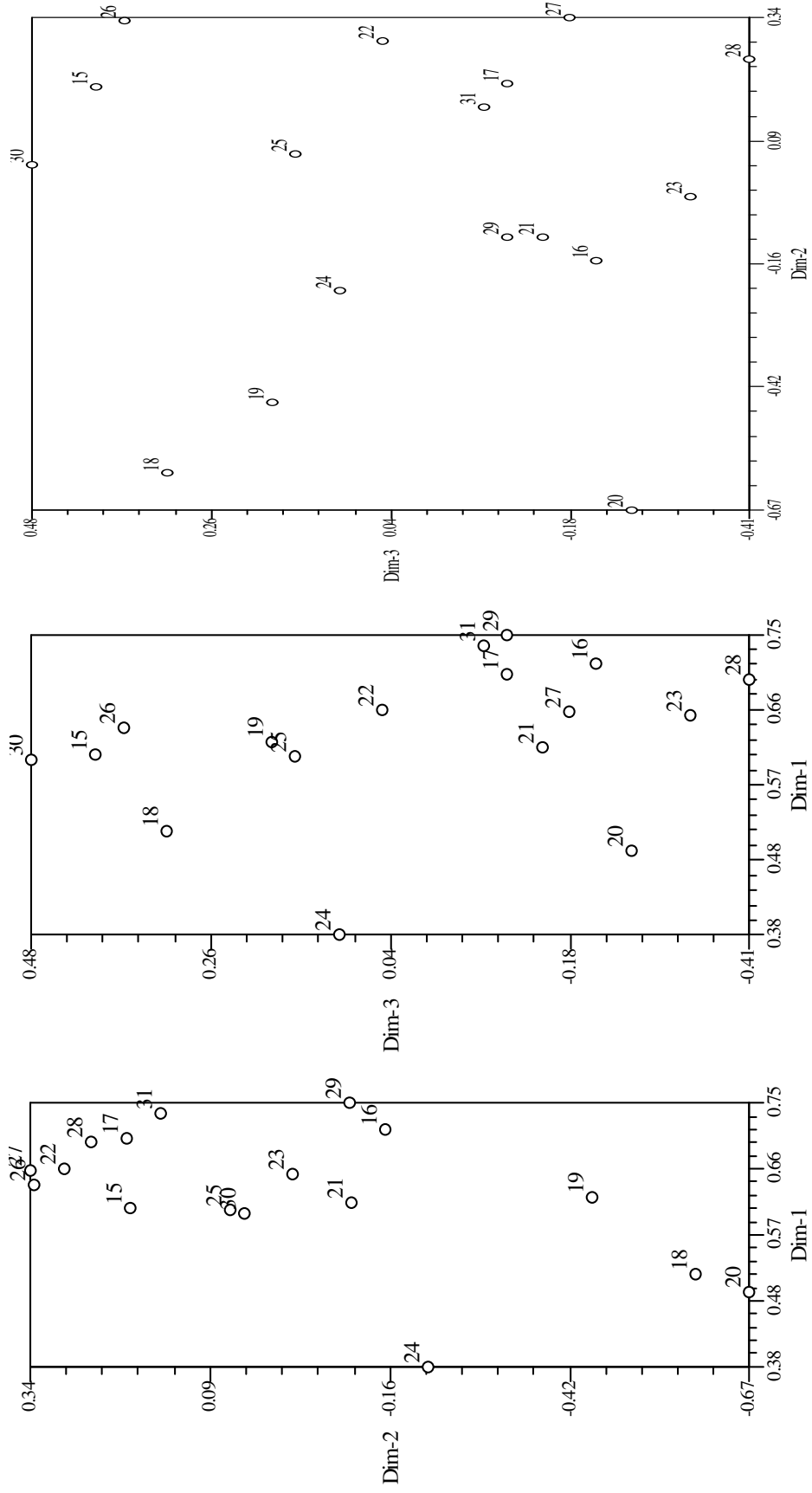
Şekil 4.11 Sivrikatran bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramı.

Mantel (1967) testi ile, kümeleme analizi ile elde edilen denogramın matris verilerinden oluşturulan “coph” (co-phenetic) matrisi ile Dice (1945) modülüne göre hazırlanmış benzerlik matrisi verileri arasındaki korelasyon katsayısı ; $r=0,658$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).

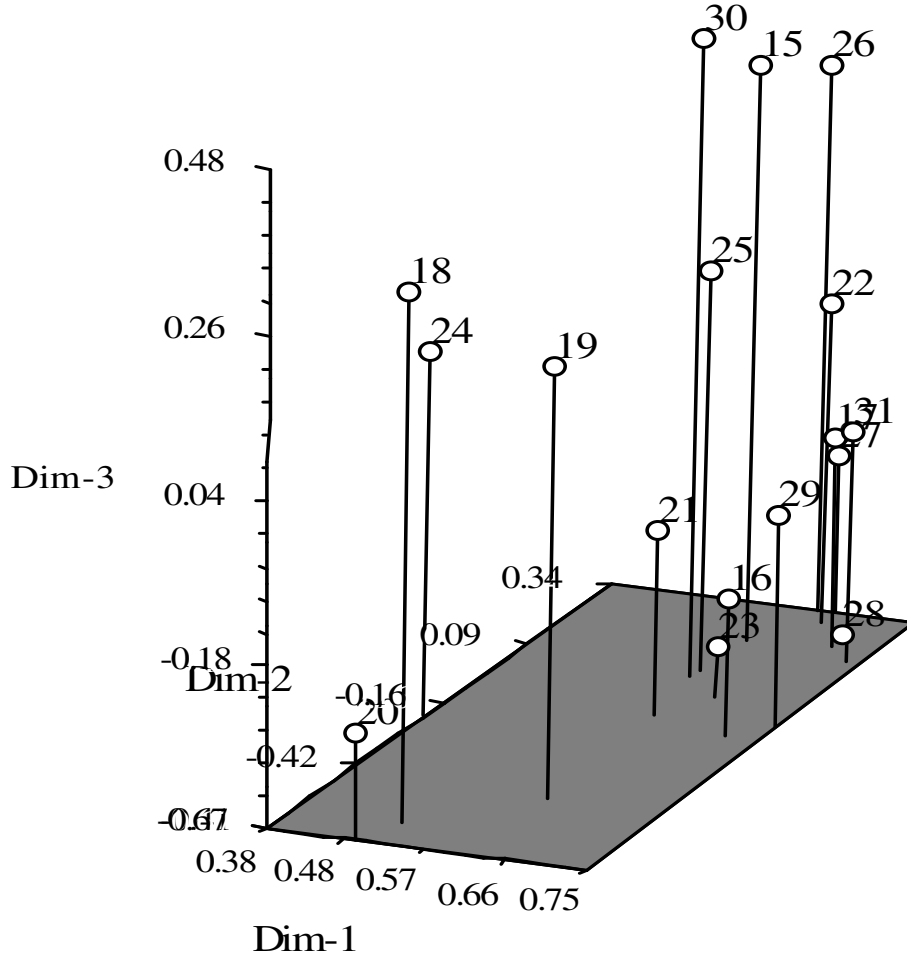


Şekil4.12 Sivrikatran bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği.

Sivrikatran popülasyonu örneklerinin ana bileşen (PC, Principle component) analizi sonucu 3 ana bileşen etrafındaki dağılımını gösteren iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir. Sivrikatran popülasyonu örneklerinde ana bileşen analizi sonucunda oluşturulan grafiklerde kümeleme analizinde olduğu gibi belirgin bir gruplaşma oluşmadığı, genotipik çeşitliliğin yagın olduğu, benzerliğin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13 Ana bileşen analizi sonucu Sivrikatran bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri.

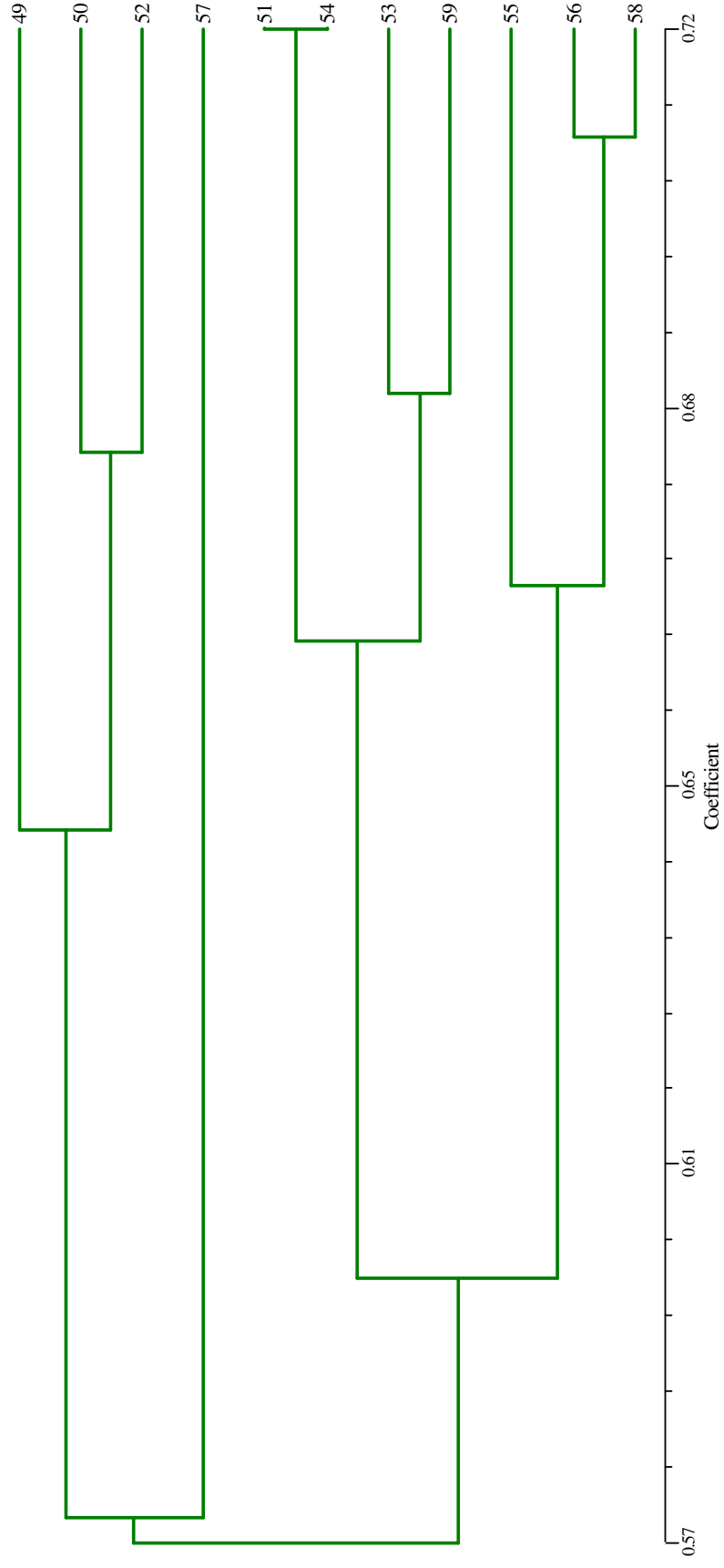


Şekil 4.14 Ana bileşen analizi sonucu Sivrikatran bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.

Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ile, bu ana bileşenlerle açıklanabilen toplam varyasyona oranları Çizelge 4.4’de belirtilmiştir. İlk üç ana bileşen ile açıklanabilen toplam varyasyon oranı % 56,4 olarak bulunmuştur. Bu değer % 25 ve üzerinde olduğu için, ana bileşen analizi verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

Çizelge 4.4 Sivrikatran popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.

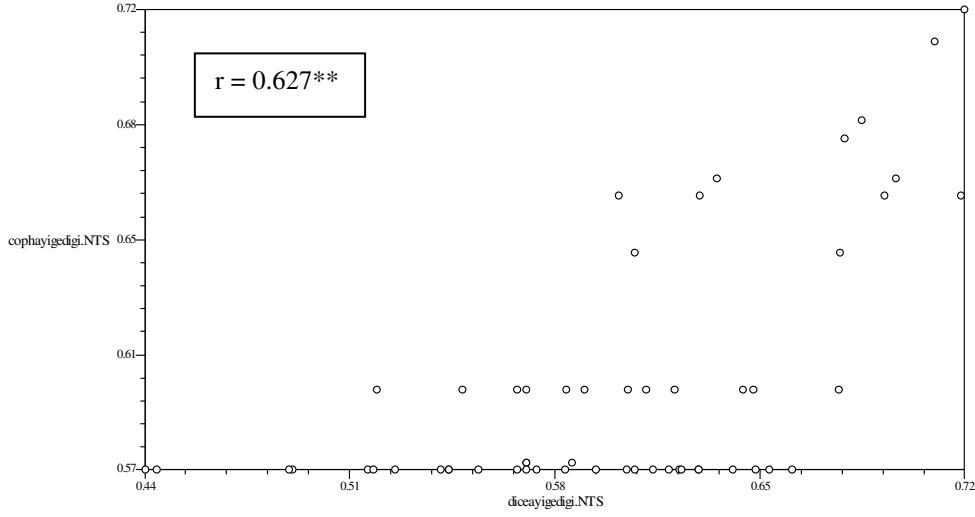
Ana bileşen	“Eigen” değeri	Açıklanan varyasyon (%)	Kümülatif varyasyon (%)
1	6.82	40.1	40.1
2	1.60	9.4	49.5
3	1.17	6.8	56.4



Şekil 4.15 Ayıgdediği bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendrogramı.

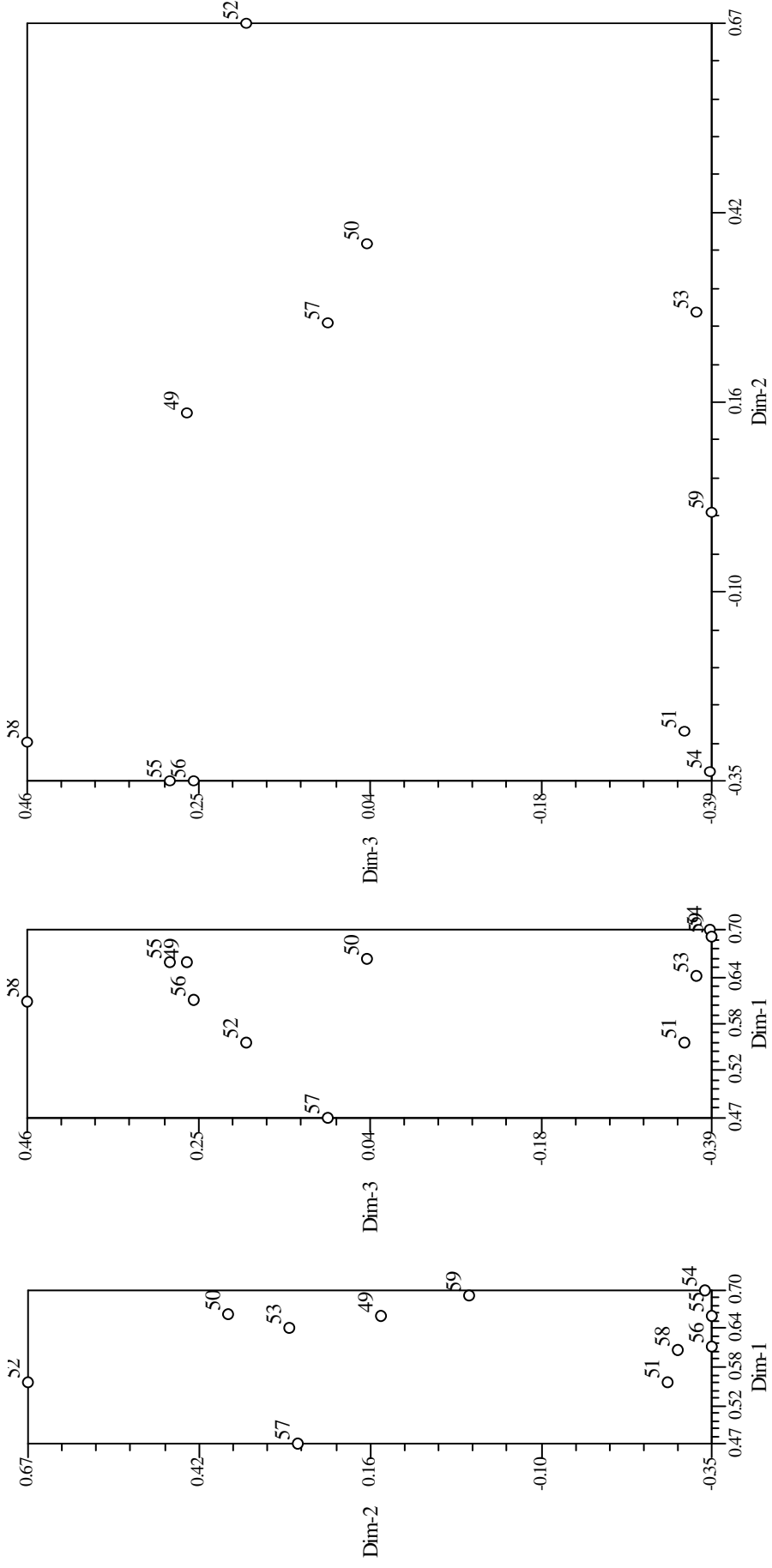
Ayıgediği kestane popülasyonlarından alınan örneklerin Dice (1945) benzerlik matrisi ve UPGMA modülü kullanılarak oluşturulan kümeleme (cluster) analizi dendogramı Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Genotipler arasındaki benzerlik katsayısı 0,57 ile 0,72 arasında değişim göstermiştir. Genotipler belirgin bir kümelenme oluşturmamışlardır.

Mantel (1967) testi ile, kümeleme analizi ile elde edilen dendogramın matris verilerinden oluşturulan “coph” (co-phenetic) matrisi ile Dice (1945) modülüne göre hazırlanmış benzerlik matrisi verileri arasındaki korelasyon katsayısı ; $r=0,627$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.16).

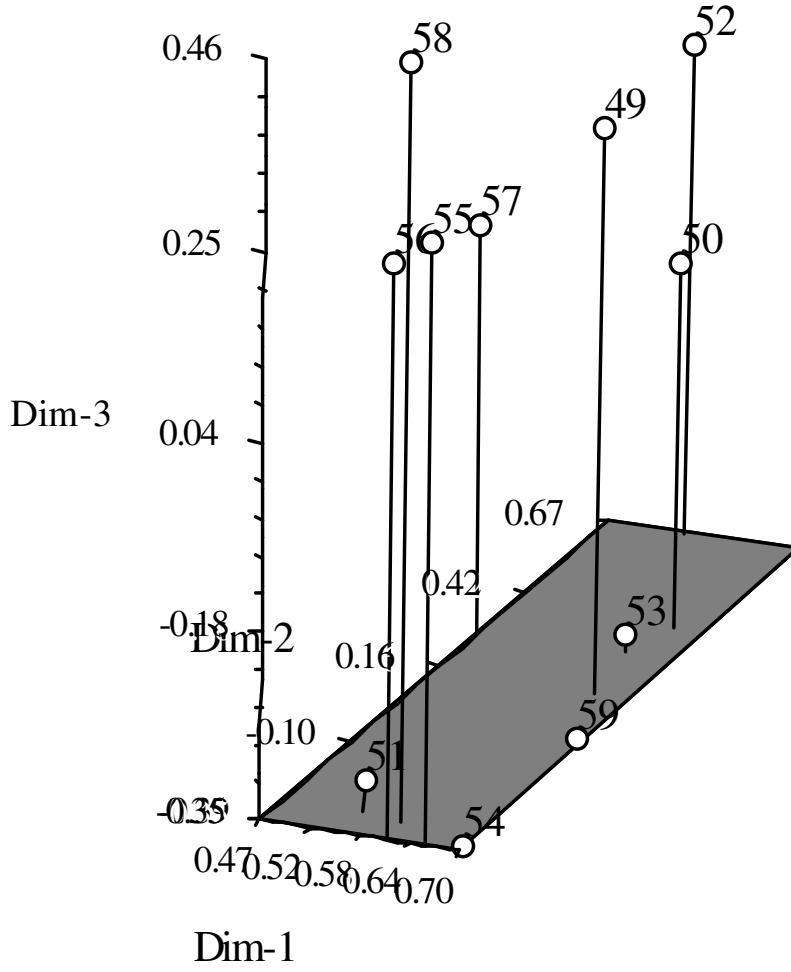


Şekil4.16 Ayıgediği bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği.

Ayıgediği popülasyonu örneklerinin ana bileşen (PC, Principle component) analizi sonucu 3 ana bileşen etrafındaki dağılımını gösteren iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Ayıgediği popülasyonu örneklerinde de ana bileşen analizi sonucunda oluşturulan grafiklerde kümeleme analizinde olduğu gibi belirgin bir gruplaşma oluşmadığı, genotipik çeşitliliğin yagın olduğu, benzerliğin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.17 Ana bileşen analizi sonucu Ayıdığı bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri.

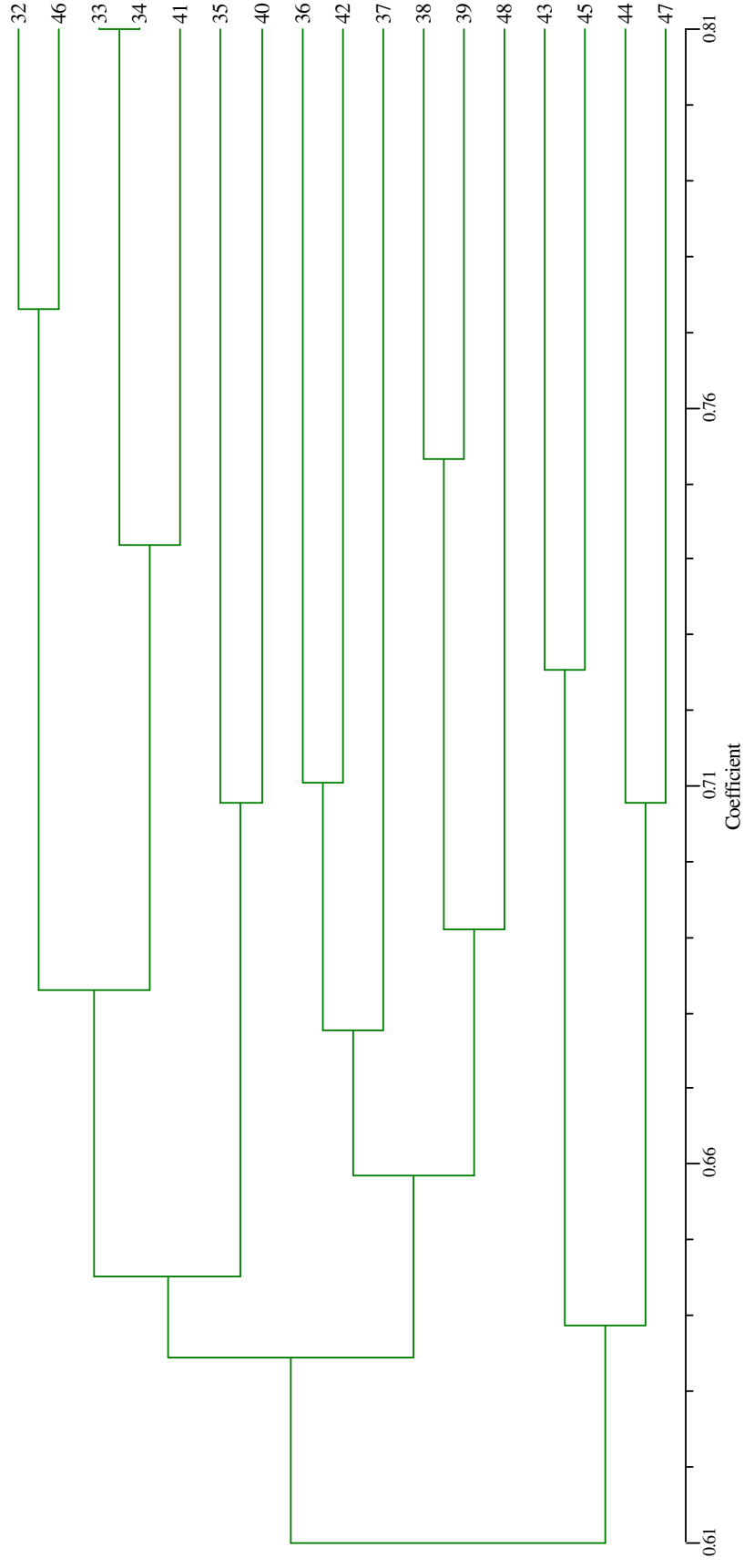


Şekil 4.18 Ana bileşen analizi sonucu Ayıgediği bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.

Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ile, bu ana bileşenlerle açıklanabilen toplam varyasyona oranları Çizelge 4.5’de belirtilmiştir. İlk üç ana bileşen ile açıklanabilen toplam varyasyon oranı % 59,8 olarak bulunmuştur. Bu değer % 25 ve üzerinde olduğu için, ana bileşen analizi verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

Çizelge 4.5 Ayıgediği popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.

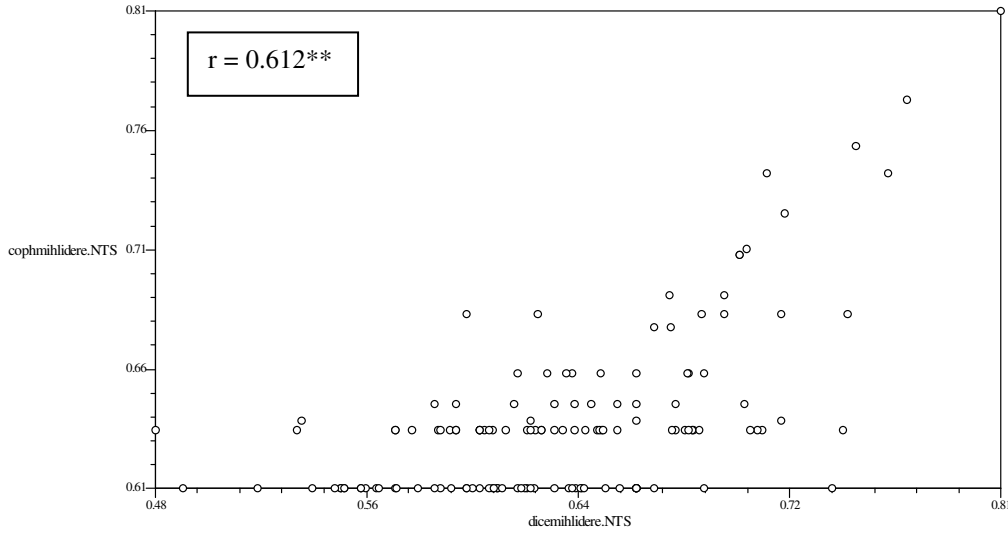
Ana bileşen	“Eigen” değeri	Açıklanan varyasyon (%)	Kümülatif varyasyon (%)
1	4.25	38.6	38.6
2	1.30	11.8	50.4
3	1.02	9.3	59.8



Şekil 4.19 Mıhlıdere bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendrogramı.

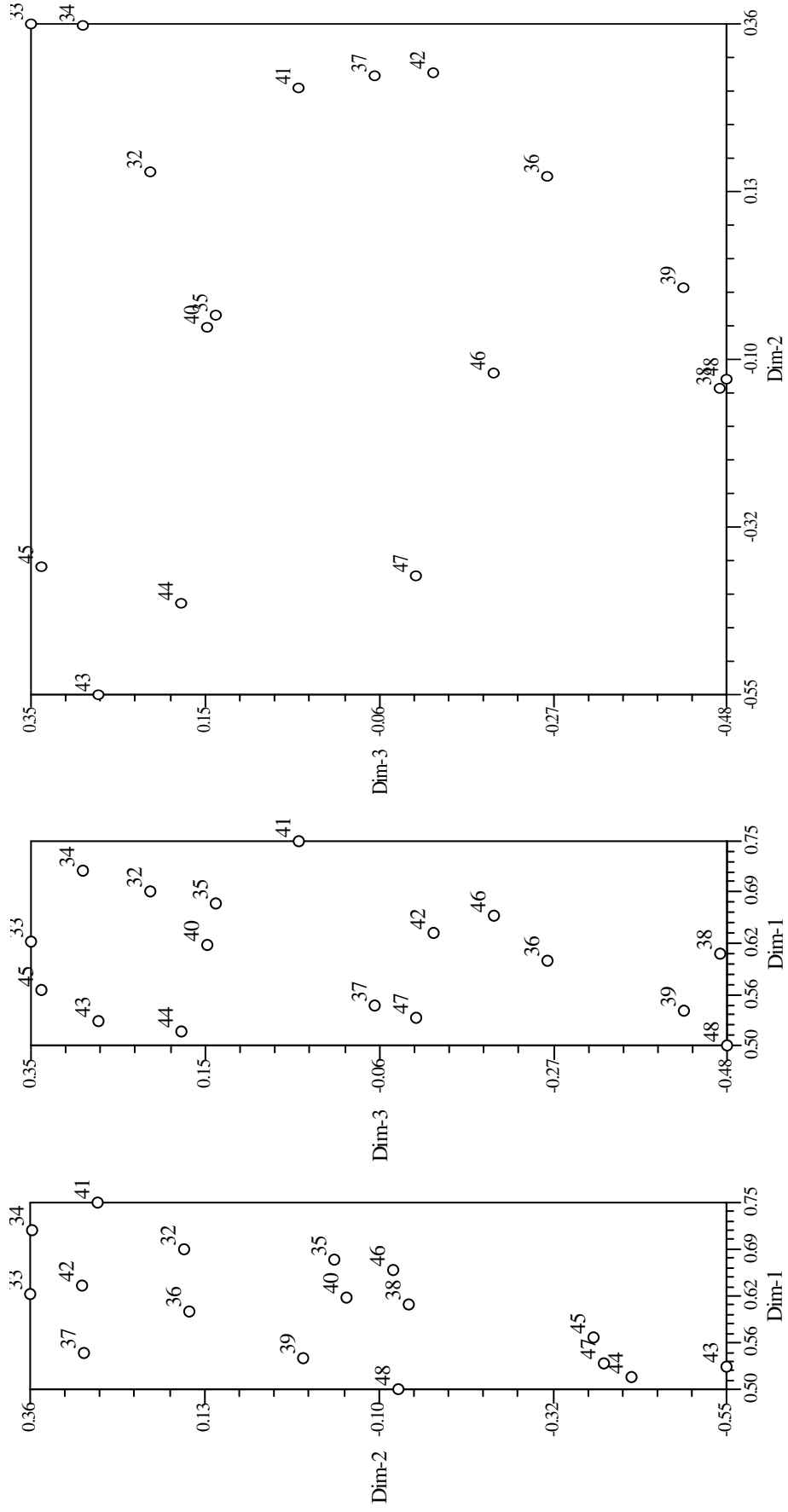
Mıhlıdere kestane popülasyonlarından alınan örneklerin Dice (1945) benzerlik matrisi ve UPGMA modülü kullanılarak oluşturulan kümeleme (cluster) analizi dendogramı Şekil 4.19’de gösterilmiştir. Genotipler arasındaki benzerlik katsayısı 0,61 ile 0,81 arasında değişim göstermiştir. Genotipler belirgin bir kümelenme oluşturmamışlardır. Ancak diğer alanlarla karşılaştırıldığında benzerlik oranları daha yüksek çıkmıştır.

Mantel (1967) testi ile, kümeleme analizi ile elde edilen dendogramın matris verilerinden oluşturulan “coph” (co-phenetic) matrisi ile Dice (1945) modülüne göre hazırlanmış benzerlik matrisi verileri arasındaki korelasyon katsayısı ; $r=0,612$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.20).

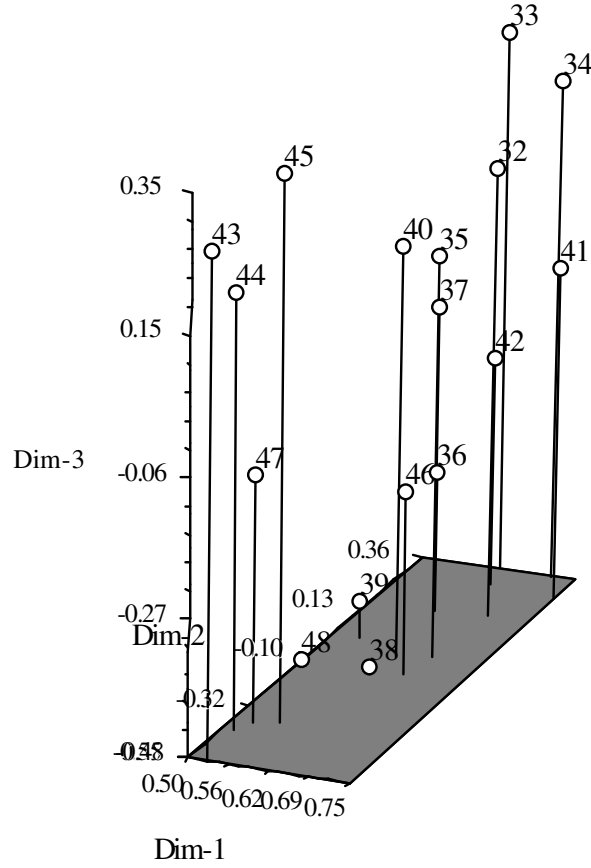


Şekil4.20 Mıhlıdere bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği.

Mıhlıdere popülasyonu örneklerinin ana bileşen (PC, Principle component) analizi sonucu 3 ana bileşen etrafındaki dağılımını gösteren iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Mıhlıdere popülasyonu örneklerinde de ana bileşen analizi sonucunda oluşturulan grafiklerde kümeleme analizinde olduğu gibi belirgin bir gruplaşma oluşmadığı, genotipik çeşitliliğin yagın olduğu, benzerliğin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.21 Ana bileşen analizi sonucu Mıhlıdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri.

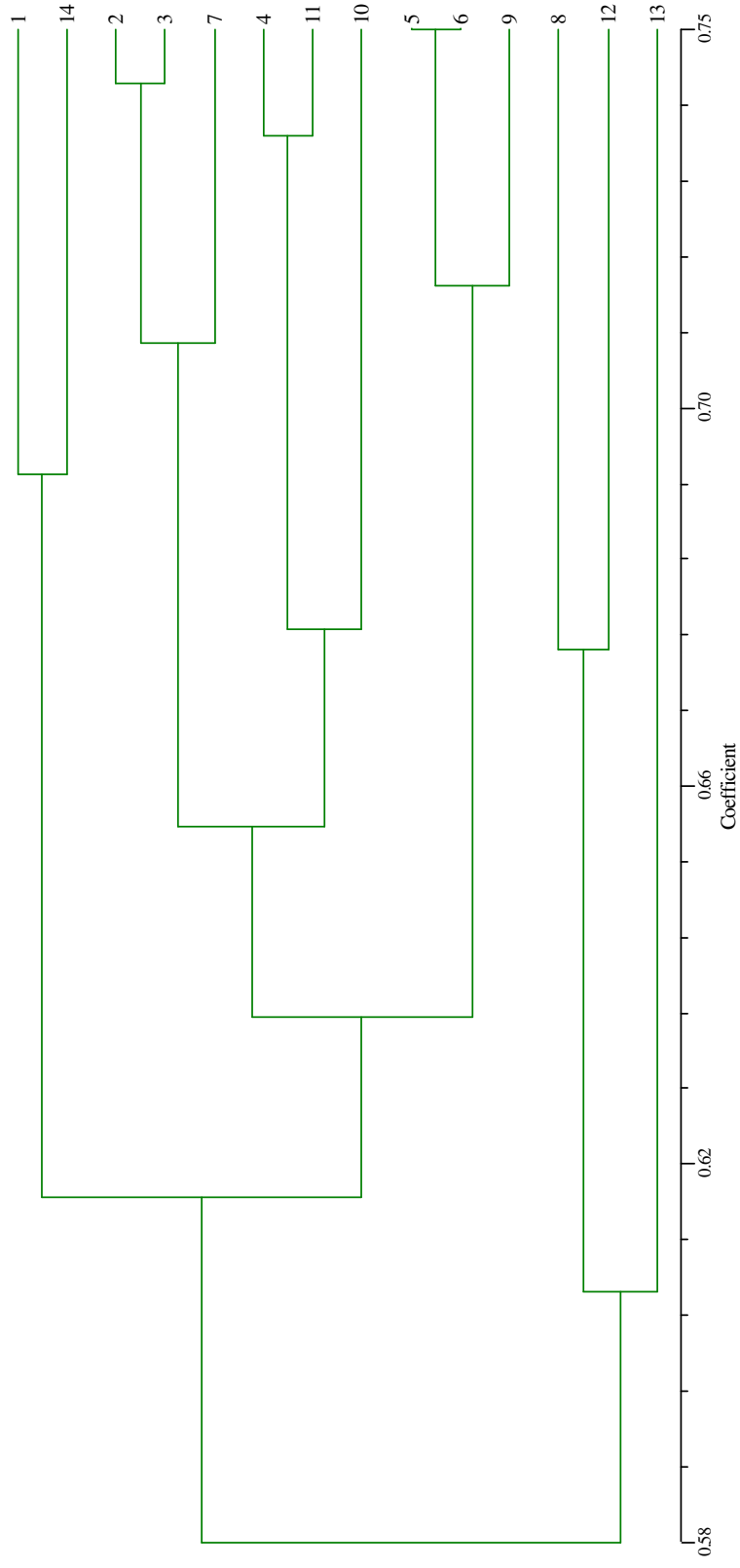


Şekil 4.22 Ana bileşen analizi sonucu Mıhlıdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.

Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ile, bu ana bileşenlerle açıklanabilen toplam varyasyona oranları Çizelge 4.6’da belirtilmiştir. İlk üç ana bileşen ile açıklanabilen toplam varyasyon oranı % 53 olarak bulunmuştur. Bu değer % 25’in üzerinde olduğu için, ana bileşen analizi verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

Çizelge 4.6 Mıhlıdere popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.

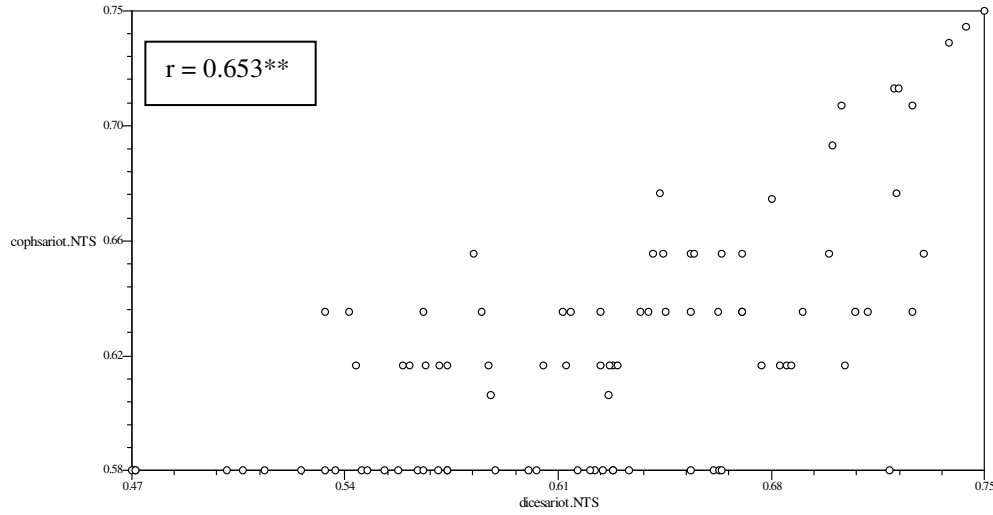
Ana bileşen	“Eigen” değeri	Açıklanan varyasyon (%)	Kümülatif varyasyon (%)
1	6.35	37.4	37.4
2	1.37	8.0	45.4
3	1.28	7.5	53.0



Şekil 4.23 Sartot bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendrogramı.

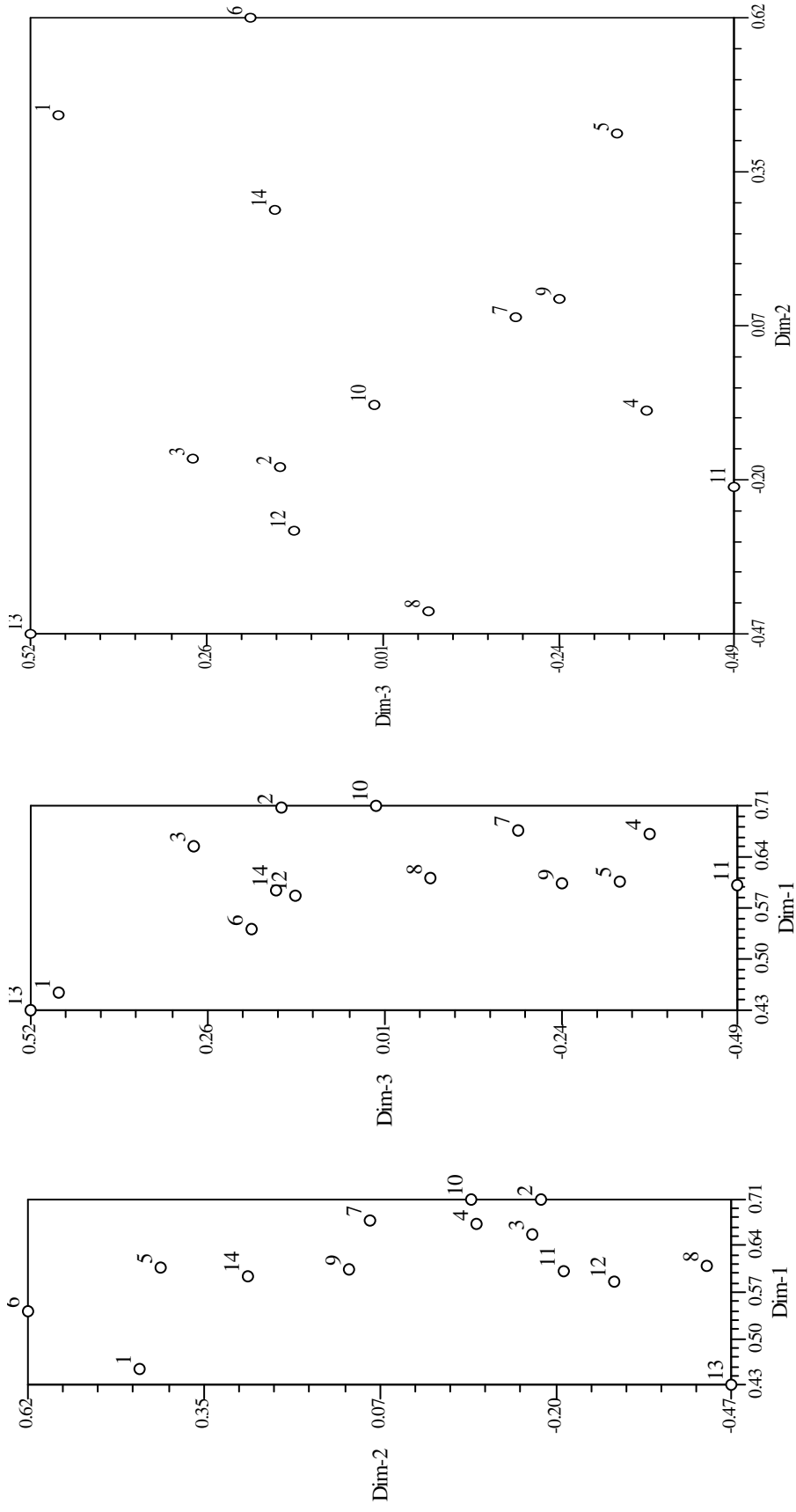
Sarıot kestane popülasyonlarından alınan örneklerin Dice (1945) benzerlik matrisi ve UPGMA modülü kullanılarak oluşturulan kümeleme (cluster) analizi dendogramı Şekil 4.23’de gösterilmiştir. Genotipler arasındaki benzerlik katsayısı 0,58 ile 0,75 arasında değişim göstermiştir. Genotipler belirgin bir kümeleme oluşturmamışlardır.

Mantel (1967) testi ile, kümeleme analizi ile elde edilen dendogramın matris verilerinden oluşturulan “coph” (co-phenetic) matrisi ile Dice (1945) modülüne göre hazırlanmış benzerlik matrisi verileri arasındaki korelasyon katsayısı ; $r=0,653$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.24).

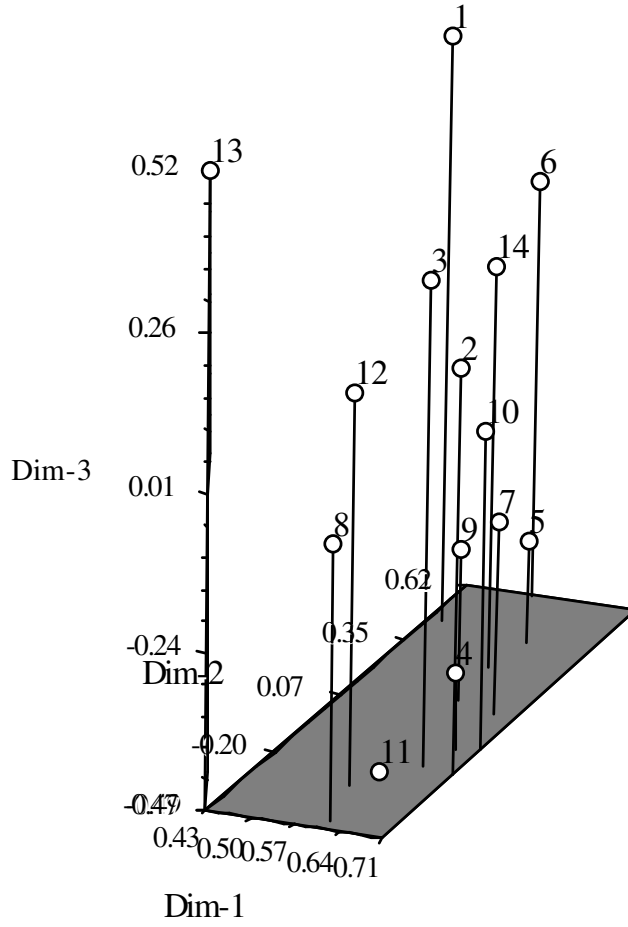


Şekil 4.24 Sarıot bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği.

Sarıot popülasyonu örneklerinin ana bileşen (PC, Principle component) analizi sonucu 3 ana bileşen etrafındaki dağılımını gösteren iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler Şekil 4.25 ve Şekil 4.26’de gösterilmiştir. Sarıot popülasyonu örneklerinde de ana bileşen analizi sonucunda oluşturulan grafiklerde kümeleme analizinde olduğu gibi belirgin bir gruplaşma oluşmadığı, genotipik çeşitliliğin yagın olduğu, benzerliğin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.25 Ana bileşen analizi sonucu Sarıot bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri.

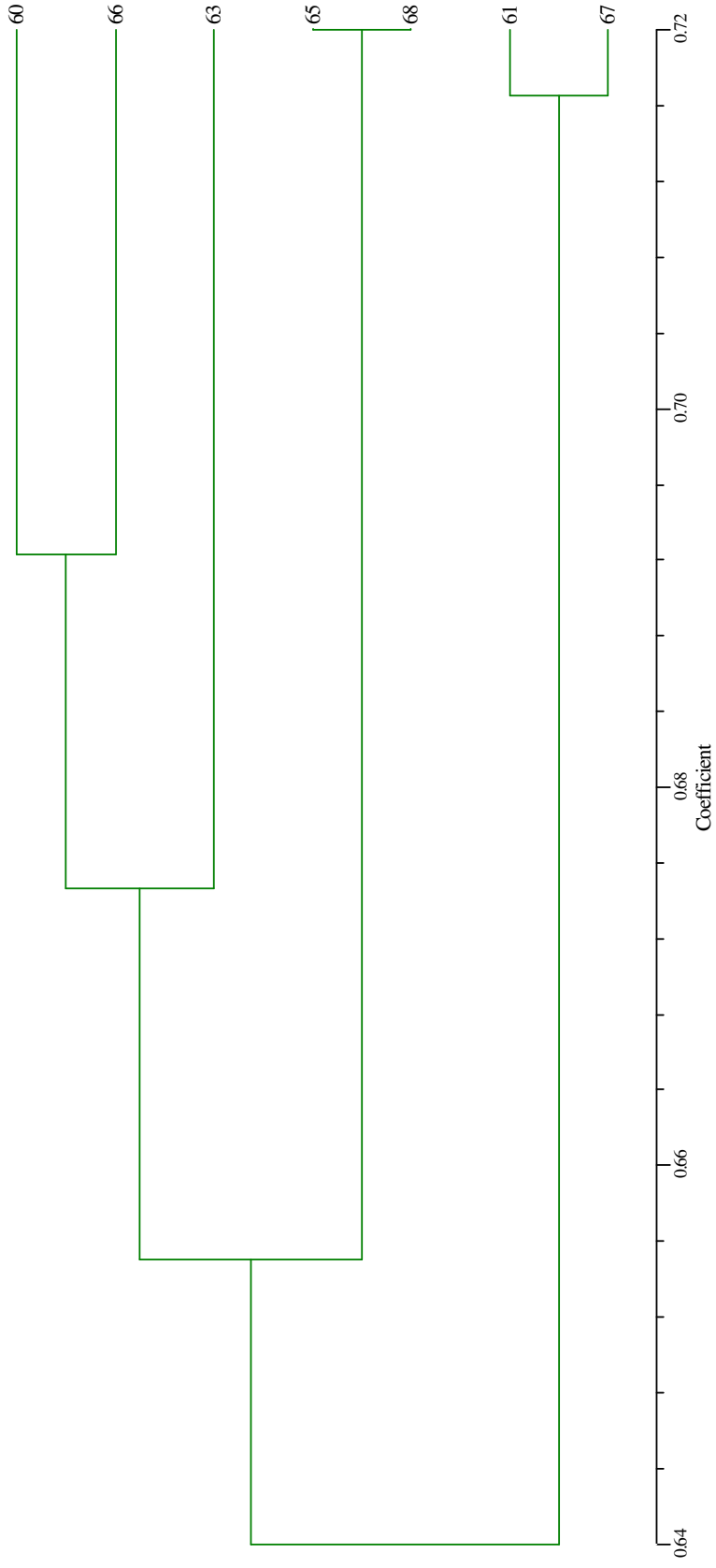


Şekil 4.26 Ana bileşen analizi sonucu Sarıot bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.

Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ile, bu ana bileşenlerle açıklanabilen toplam varyasyona oranları Çizelge 4.7’de belirtilmiştir. İlk üç ana bileşen ile açıklanabilen toplam varyasyon oranı % 56,5 olarak bulunmuştur. Bu değer % 25’in üzerinde olduğu için, ana bileşen analizi verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

Çizelge 4.7 Sarıot popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.

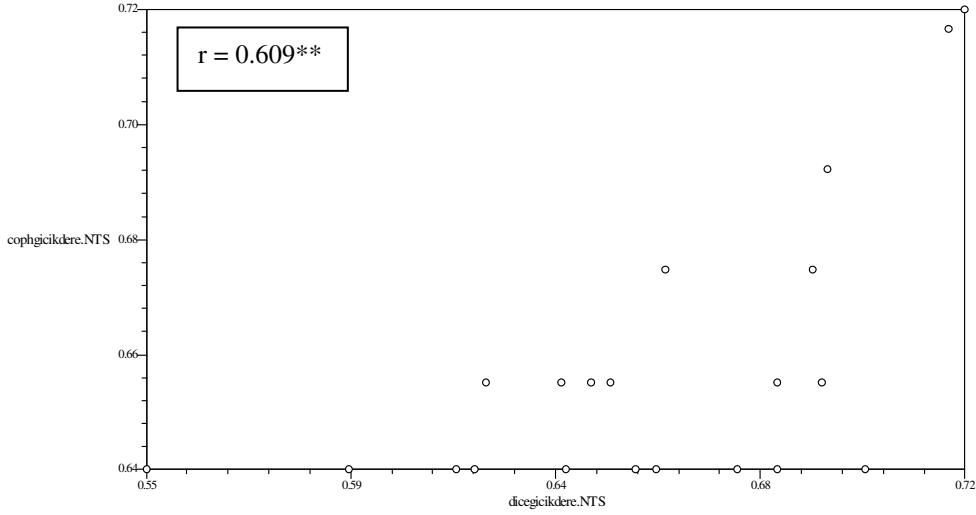
Ana bileşen	“Eigen” değeri	Açıklanan varyasyon (%)	Kümülatif varyasyon (%)
1	5.21	37.2	37.2
2	1.45	10.3	47.5
3	1.2	9.0	56.5



Şekil 4.27 Gıcıkdere bölgesi örneklerinin kümeleme analizi ile oluşturulan dendrogramı.

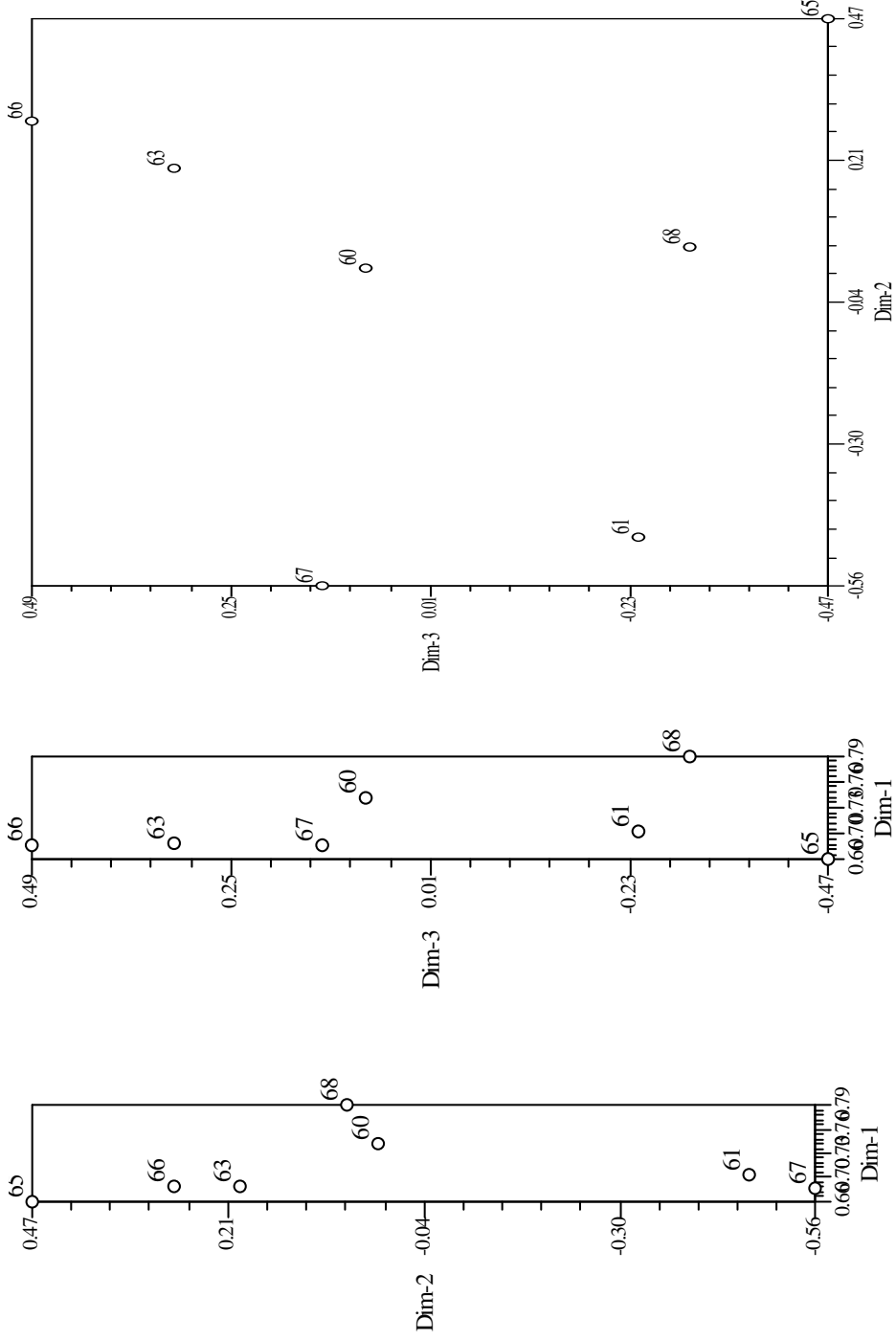
Gicikdere kestane popülasyonlarından alınan örneklerin Dice (1945) benzerlik matrisi ve UPGMA modülü kullanılarak oluşturulan kümeleme (cluster) analizi dendogramı Şekil 4.27’de gösterilmiştir. Genotipler arasındaki benzerlik katsayısı 0,64 ile 0,72 arasında değişim göstermiştir. Genotipler belirgin bir kümelenme oluşturmamışlardır.

Mantel (1967) testi ile, kümeleme analizi ile elde edilen dendogramın matris verilerinden oluşturulan “coph” (co-phenetic) matrisi ile Dice (1945) modülüne göre hazırlanmış benzerlik matrisi verileri arasındaki korelasyon katsayısı ; $r=0,609$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.28).

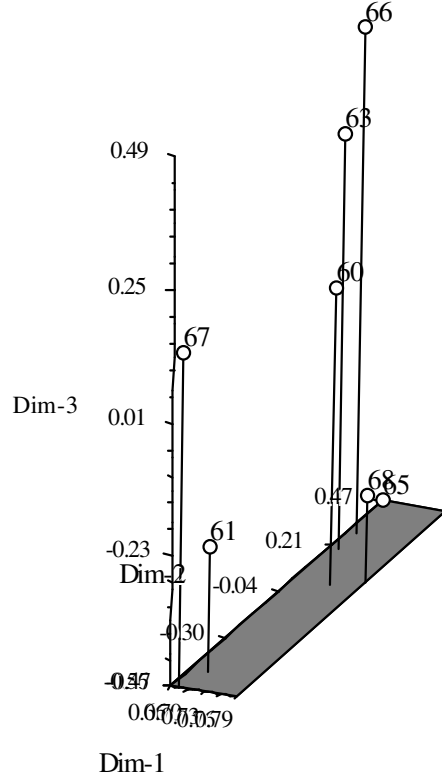


Şekil4.28 Gicikdere bölgesi örneklerinin benzerlik katsayıları matrisi ile “coph” matrisi arasındaki korelasyon grafiği.

Gicikdere popülasyonu örneklerinin ana bileşen (PC, Principle component) analizi sonucu 3 ana bileşen etrafındaki dağılımını gösteren iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’de gösterilmiştir. Gicikdere popülasyonu örneklerinde de ana bileşen analizi sonucunda oluşturulan grafiklerde kümeleme analizinde olduğu gibi belirgin bir gruplaşma oluşmadığı, genotipik çeşitliliğin yoğun olduğu, benzerliğin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.29 Ana bileşen analizi sonucu Gıcıkdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının iki boyutlu grafikleri.



Şekil 4.30 Ana bileşen analizi sonucu Gıcıkdere bölgesi örneklerinin ilk üç bileşen etrafındaki dağılımlarının üç boyutlu grafiği.

Ana bileşen analizinde ilk üç “eigen” değeri ile, bu ana bileşenlerle açıklanabilen toplam varyasyona oranları Çizelge 4.8’de belirtilmiştir. İlk üç ana bileşen ile açıklanabilen toplam varyasyon oranı % 72,9 ile diğer bölge verileri ile kıyaslandığında en yüksek değer olarak bulunmuştur. Bu değer % 25’in üzerinde olduğu için, ana bileşen analizi verileri anlamlı olarak kabul edilmiştir (Mohammadi and Prasanna 2003; Gulsen et al., 2007).

Çizelge 4.8 Gıcıkdere popülasyonu örneklerinin ana bileşen analizi sonucu “eigen” değeri ve varyasyonu açıklama oranları.

Ana bileşen	“Eigen” değeri	Açıklanan varyasyon (%)	Kümülatif varyasyon (%)
1	3.49	49.9	49.9
2	0.87	12.4	62.3
3	0.73	10.5	72.9

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında orijin merkezi olduğumuz kestane türünde (*Castanea sativa* Mill.), mikrosatelit (SSR) markörleri kullanılarak, Ülkemizdeki ilk moleküler karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın bitkisel materyalini, “Kestane Genetik Kaynaklarının Kazdağları’nda Yerinde (*in situ*) Muhafazası” çalışması (Küçük et al., 1998) kapsamında “Kestane Gen Koruma Ve Yönetim Alanları” (GEKYA) olarak önerilen Mıhlidere, Sivrikatran, Sarıot, Ayıgediği ve Gıcıkdere’deki kestane popülasyonlarından alınan 66 örnek ile, 17 adet Ege Bölgesi örneği ve 2 adet Karadeniz Bölgesi örneği olmak üzere toplam 81 kestane genotipi oluşturmuştur.

Moleküler karakterizasyon çalışmasında elde edilen verilerin analizi sonucunda, gerek bütün örnekler birlikte değerlendirildiğinde; gerekse her alanın örnekleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde, genotipik varyasyonun yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bütün örneklere ait verilerin Dice (1945)’e göre oluşturulmuş benzerlik matrisi ile çizilen UPGMA kümeleme (cluster) analizi dendogramı incelendiğinde genotipler arasında 0,55 ile 0,87 arasında benzerlik katsayılarının olduğu görülmektedir. Dendogram genelinde belirgin bir kümelenme oluşmamıştır.

Bütün örneklerin birlikte değerlendirildiği ve her alanın kendi içerisinde değerlendirildiği ana bileşen analizlerinin tamamında ilk üç ana bileşenin toplam varyasyonu açıklama oranı güvenilir sınır olarak belirlenen % 25 değerinin üstünde, % 53- % 72,9 arasında değişim göstermiştir. Ana bileşen analizi sonucu, genotiplerin ana bileşenler etrafındaki dağılımı ile kümeleme analizi verileri uyumlu çıkmıştır. Analizlerde belirgin bir kümelenme görülmemiştir.

Elde edilen bu veriler ile öncelikle “Kestane Genetik Kaynaklarının Kazdağları’nda Yerinde (*in situ*) Muhafazası” çalışması (Küçük et al., 1998) kapsamında önerilen Kestane Gen Koruma Ve Yönetim Alanları’nın, *in situ* muhafazanın önemli bir unsuru olan genotipik çeşitliliği saptanmıştır. Sözkonusu çalışmada eksik kalan bir unsur bu vesile ile tamamlanmıştır. Bu veriler sözkonusu alanda, yine *in situ* muhafazanın önemli unsurlarından olan yönetim ve izleme çalışmalarında kullanılacaktır.

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından yürütölmekte olan “Kestane Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası, Karakterizasyonu ve Değerlendirmesi” çeręeve projesi (Küçük vd.,2008 (yayınlanmamış)) kapsamında da bu çalışmanın verilerinden yararlanılacaktır. Bu alanlarda belirlenen örneklerin arazi gen bankasında muhafaza edilecek olanlarının belirlenmesinde kullanılacaktır. Bu sayede, genel anlamda meyve türlerinde de genetik kaynakların muhafazası ve ıslah programları için geniş bir germplasm kaynağının oluşturulması için gerçekleştirilecek çalışmalarda, uygun survey ve örnekleme tekniklerinin yanı sıra, genotipleri arazi gen bankasına tesis etmeden önce moleküler düzeyde karakterizasyonunun yapılarak arazi gen bankasında muhafaza edilecek örneklerin belirlenmesi yöntemi ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alvarez, P.A., Anta, M.B., Aranda, U.D. 2006. Differentiation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars by leaf, nut and burr dimensions. *Forestry*, Vol. 79, No. 2, 2006.
- Anonim, 2008. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK).
- Anonymous, 2004. EUROFORGEN European Forest Genetic Resources Programme web site http://www.ipgri.cgiar.org/networks/euforgen/euf_home.asp, Aralık, 2004.
- Anonymous, 2010. Food and Agriculture Organization. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Aravanopoulos, F.A., Bucci, G., Akkak, A., Blanco Silva, R., Botta, R., Buck, E., Cherubini, M., Drouzas, A.D., Fernández-López, J., Mattioni, C., Marinoni, D., Papadima, A., Russell, K., Zas, R. and Villani, F. 2005. Molecular Population Genetics And Dynamics Of Chestnut (*Castanea Sativa*) In Europe: Inferences For Gene Conservation And Tree Improvement. *Acta Hort. (ISHS)* 693:403-412
- Ayfer, M., A. Soylu ve G. Çelebioğlu. 1977. Marmara Bölgesi kestanelerinin seleksiyon yoluyla ıslahı. TÜBİTAK. VI. Bilim Kongresi. 17-21 Ekim 1977. Ankara. s. 123- 134.
- Ayfer, M., Soylu, A., Çelebioğlu, G., Mermer, S., Sağlam, H., 1986. Marmara Bölgesi Kestanelerinin Seleksiyon Yoluyla Islahı- II. Bahçe 15, 71-81.
- Botta R., Marinoni D., Beccaro G., Akkak A., Bounous G. 2001. Development of a DNA Typing Technique For The Genetic Certification Of The Chestnut Cultivars. *Forest Snow and Land. Research*, 76 (3): 425-428pp.
- Botta,R., Torello, D., Bounous, M., Bounous, G. 2004, Molecular Markers and Certification, Proceedings from the Workshop Biotecnologia Forestal Global Biotechnology Forum, Forest Biotechnology In Latin America. March 2-5 2004, 63-72pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Budak,H., Bölek,Y., Dokuyucu, T., Akaya, A. 2004. Potential Uses of Molecular Markers in Crop Improvement. KSU Journal of Science and Engineering. 7(1)-2004 . p:75-79.
- Carvalho, L.C., Goulao, L., Oliveira, C., Gonçaves, C.J., Amancio, S. 2004, RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77: 23–27pp.
- Casasoli, M., Mattioni, C., Cherubini, M., Villani, F. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. Theor. Appl. Genet. 2001. 102:1190–1199
- Celiker, N. M. 2004. Kestane Kanseri ve Mücadelesi (Broşür). T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bornova/İZMİR Yayın NO:2004/1.
- Celiker, N. M., and E. Onogur. 2002. Studies on the Control of Chestnut Blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.)Barr.) by Hypovirulent Strains in Turkey. Working Group "Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens" Proceedings of the meeting influence of Abiotic and Biotic Factors on Biocontrol Agents. Kuşadası (Turkey), 22-25 May 2002. IOBC/wprs Bulletin Vol. 25 (10):203-206.
- Çeliker, N. M. ve E. Onogur. 2001. Türkiye’de Kestane Kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) Hastalığına Karşı Biyolojik Mücadele Olanakları. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri 3-8 Eylül 2001 Tekirdağ Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları No:45, sayfa 354-363.
- Çeliker, N. M. ve E. Onogur. 2004. Ege ve Marmara Bölgelerinde Kestane Kanseri Etmeni (*Cryphonectria parasitica* Murr.Barr)’nın Yeni Vejetatif Uyum Gruplarının Oluşma Şansı ve Bunun Biyolojik Mücadele Başarısına Etkisi. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri 8-10 Eylül 2004 Samsun.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Çeliker, N. M., and E. Onoğur. 1998. Determining the hypovirulence in the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) in Turkey. (First Record). *The Journal Of Turkish Phytopathology*, 27: 145-146.
- Davis, P.H. 1965. *Flora of Turkey*. Edinburg University Press. Vol:1. pp:1-25.
- Delen, N. 1979. Kestane Kanseri (*Endothia parasitica* Murril.) Hastalığının Yayılışı ve Biyolojisi. İzmir Bölge Zirai Müc. A.E. Araştırma Eserleri Serisi. No: 36.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species, *Ecology*, Vol.26, pp.297-302.
- Fernandez-LOpez, J., and R. Alia. 2003. Technical Guidelines for genetic conservation and use of chestnut (*Castanea sativa*). IPGRI, Rome, Italy.
- Fineschi, S., Turchini, D., Villani, F., Vendramin, G. G. 2000. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries *Molecular Ecology* (2000). 9, 1495–1503.
- Gobbin, D., Hohl, L., Conza, L., Jermini, M., Gessier, C., Condera, M. 2007, Microsatellite- based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland, *Genome*, 50: 1089-1103 pp.
- Goulao, L., Valdivieso, T., Santana, C., Oliveira, C.M. 2001, Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.), *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 329–338 pp.
- Gulsen, O., Karagul, S. & Abak, K., 2007. “Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism”, *Biologia Bratislava*, Vol.62/1, pp.41-45.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hozova, L., Jankovsky, L., Akkak, A., Torello Marioni, D., Botta, R., Smerda, J. 2009. Preliminary Study of the Genetic Structure of a Chestnut Population in the Czech Republic Based on SSR Analysis. Proceedings of the International Workshop on Chestnut Management in Med. Countries. Acta Hort. 815. ISHS 2009.
- IBPGR, 1985. Ecogeographical surveying and in situ conservation of crop relatives. International Board for Plant Genetic Resources Report. 84/132. Rome, Italy.
- Kaya, Z. 1998. Current status of forest genetic resources in Turkey. International Symposium on *In situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. P:17-31. Turkey.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D. R., Pandey, B. K. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology Plant Omics Journal Southern Cross Journals 2009 2(4):141-162 (2009)
- Küçük, E., Özkarakaş. İ., Gürnil. K., Çavdar. A., Tokmak, S., Çeliker. N.M., Poyraz, D., Kaplan, C., Çetinel, B. 2008. Kestane (*Castanea sativa* Mill) Genetik Kaynaklarının Toplanması, Muhafazası, Karakterizasyonu Ve Değerlendirmesi. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Proje Gelişme Raporu. 14 sayfa. (Yayınlanmamış).
- Küçük, S. A., A. Ş. Tan, C. O. Sabancı, K. Önal, A. S. Cinsoy ve S. Kostak. 1998. Ecogeographical and floristic differentiation of chestnut gene manegment zones in Kazdağ. The Proceeding of International Symposium on *In situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. 135-147. CRIFC, Turkey.
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Amr J Hum Genet, 44: 397-401.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Manimekalai, R., Nagarajan, P., Kumaran, P.M. ????. Comparision of Effectiveness of RAPD, ISSR and SSR Markers for Analysis of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Germplasm Accessions. Tropical Agricultural Research Vol. 18.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach, Cancer Res., Vol.27, pp.209-220.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants-Salient Statistical Tools and Considerartions, Crop Sci., Vol.43, p.1235-1248
- Neale, D.B. 1998. Molecular genetic approaches to measuruing and conserving adaptative genetic diversity. International Symposium on *in situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. pp:395-390.
- Ovensa, J., Kucera, L., Jiang, L.J., Vagnerova, D. 2005, Characterization of Chinese elite cultivars and genetic resources of chestnut by AFLP, *Biologia Plantarum*, 49 (1): 125-127 pp.
- Önal, K., Sabancı, C.O., Küçük, S.A., Cinsoy,S. 1998. The pomological variation patterns of wild plum (*Prunus divericata* Ledeb.) and chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Kazdağı (Mt. Ida) area of Turkey. International Symposium on *In situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. P:149-153. Turkey.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyaroğlu, M. 2007. Sert Kabuklu Meyveler. Ilıman İklim Meyve Türleri Cilt III. S:269-305. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 566. Bornova, İzmir.
- Özkarakaş, İ. ve M. K. Önal. 1997. Kestane (*Castanea sativa* Mill.) Çoğaltımında En Uygun Göz Aşısı Yöntemi ve Zamanının Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. *Anadolu* 7 (2): 74-79.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Özkarakaş, İ., N. Gönülşen, M. Ulubelde, S. Özakman ve K. Önal. 1995. Ege Bölgesi kestane (*Castanea sativa* Mill.) çeşit seleksiyonu çalışmaları. II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt 1, S: 505-509, ÇÜZF, Adana.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. TRENDS in Plant Science, Vol.1, No.1, pp.215-222.
- Rutter, P.A., G. Miller and J.A. Payne. 1990. Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. Acta Horticulture No: 290. Chapter 16. p:761-788.
- Serdar, Ü. 1999. Selection of chestnuts (*C. sativa mill.*) in Sinop vicinity. Proc. 2 nd Int. Symp. on Chestnut. Acta Hort. 494, p. 327-332.
- Serdar, Ü. 2002. Camili yöresinde (Artvin-Borçka) kestane seleksiyonu. O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 17(1): 57-60.
- Serdar, Ü., and A. Soylu, 1999. Selection of chestnuts (*C. sativa mill.*) in Samsun vicinity. Proc. 2 nd Int. Symp. on Chestnut. Acta Hort. 494, p. 333-338.
- Sisco, P.H., Kubisiak, T. L., Casasoli, M., Barreneche T., Kremer, A., Clark, C., Sederoff, R.R., Hebard, F.V., Villani, F., 2005, An Improved Genetic Map for *Castanea mollissima/Casiana dentata* and Its Relationship to the Genetic Map of *Castanea sativa*,. III. Intl. Chestnut Congress, Acta Horticulture 693: 491-495pp.
- Smith, D.N., Devey, M.E.1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. Genome 37: 977-983
- Solar, A., Padjavorsek, A., Stampar, F. 2005, Phenotypic and genotypic diversity of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Slovenia- opportunity for genetic improvement, Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 381-394pp.
- Soylu, A. 1984. Kestane yetiştiriciliği ve özellikleri. Atatürk Bahçe Kùltürleri Araş.Ens. Yayın No.59 Yalova.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Soylu, A. ve M. Ayfer. 1981. Marmara Bölgesinde yetiştirilmekte olan önemli bazı kestane çeşitlerinin çiçek yapıları ve meyve tutmaları üzerinde araştırmalar. Bahçe 10 (2) 45-67.
- Soylu, A., 1986. Bazı önemli kestane çeşitleri arasındaki melezlemelerden elde edilmiş çöğürlerin gelişme karakterleri. Bahçe (1986) 15 (1-2): 23-33.
- Soylu, A., Ufuk, S., Ferhatoğlu, Y., 1994. Marmara Bölgesi Kestanelerinin Seleksiyon Yoluyla Islahı. Atatürk Bahçe Kült. Araşt. Enst., Bilimsel Araştırma ve İncelemeler Yayın No: 16, Yalova.
- Spooner, D., R. van Treuren, M.C. de Vicente, 2005, Molecular Markers for Genebank Management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Tan, A. 1998. Current status of plant genetic resources conservation in Turkey. International Symposium on *In situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. P:5-16. Turkey.
- Tan, A. Ş., and M.Ulubelde. 1998. Ecogeographical and floristic differentiation of chestnut gene management zones in Kazdağ. The Proceeding of International Symposium on *In situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. 363-372. CRIFC, Turkey.
- Tan, A., and A. Ş. Tan. 2004. In Situ Conservation for Genetic Diversity: Reserve Designation and Design. Encyclopedia of Plant and Crop Science Pages: 1-5.
- Ulubelde, M. 1983. Meyve Genetik Kaynaklarının Toplanması ve Korunması. Ege Bölge Ziraat Araştırma Enstitüsü Yayınları. Yayın No: 34. İzmir.
- Velioğlu, E., Çengel, B., Kaya, Z., Tolun, A. A. 1998. Kazdağları'ndaki Doğal Karaçam (*Pinus nigra* subspecies *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) Popülasyonlarında İzoenzim Çeşitliliği. Orman Bakanlığı Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü. Orman Bakanlığı Yayın No: 175. Müdürlük Yayın No:11. Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Villani, F., M. Cherubini, L. Parducci, M. Pigliucci, and O. Sun. 1993. Genetic diversity of *Castanea sativa* Mill. in Europe: theoretical aspects and applied perspectives. Proceeding of the International Congress on chestnut. Spoleto, October 20-23,1993.
- Villani, F., M. Pigliucci, M. Lauteri, and M. Cherubini. 1992. Congruence between genetic, morphometric, and physiological data on differentiation of Turkish chestnut (*Castanea sativa*). Genome, 35: 251-256.
- Villani, F., M. Pigliucci, S. Benedettelli, and M. Cherubini. 1991. Genetic, differentiation of Turkish chestnut (*Castanea sativa*) populations. Heredity, 66: 131-136.
- Yamamoto, T., Tanaka, T., Kotobuki, K. 2003. Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnut. Journal of horticultural science & biotechnology. Vol. 78, No. 2, 197-203pp.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi II Gen Mühendisliği ve Uygulamaları. S:334-363.
- Zohary, D., Hopf, M. 2000. Domestication of Plants in the Old World. Oxford University Press. P:189-190.

EKLER

Ek Çizelge 1. Genotiplerin benzerlik matrisi.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	1,00																		
2	0,60	1,00																	
3	0,67	0,74	1,00																
4	0,54	0,65	0,69	1,00															
5	0,68	0,67	0,61	0,72	1,00														
6	0,70	0,66	0,63	0,54	0,75	1,00													
7	0,57	0,70	0,72	0,65	0,71	0,70	1,00												
8	0,47	0,66	0,57	0,59	0,57	0,47	0,57	1,00											
9	0,56	0,65	0,61	0,64	0,72	0,72	0,67	0,63	1,00										
10	0,63	0,64	0,64	0,72	0,58	0,56	0,58	0,60	0,64	1,00									
11	0,57	0,67	0,66	0,73	0,69	0,53	0,73	0,65	0,62	0,64	1,00								
12	0,56	0,60	0,66	0,53	0,56	0,51	0,63	0,68	0,61	0,63	0,62	1,00							
13	0,55	0,71	0,66	0,53	0,51	0,54	0,55	0,62	0,52	0,56	0,50	0,59	1,00						
14	0,70	0,56	0,68	0,61	0,62	0,68	0,63	0,62	0,56	0,58	0,62	0,62	0,47	1,00					
15	0,71	0,59	0,71	0,65	0,66	0,64	0,62	0,53	0,62	0,67	0,58	0,62	0,55	0,66	1,00				
16	0,53	0,61	0,58	0,64	0,57	0,55	0,65	0,75	0,61	0,65	0,62	0,68	0,53	0,62	0,60	1,00			
17	0,58	0,67	0,70	0,56	0,63	0,69	0,71	0,62	0,57	0,55	0,59	0,69	0,57	0,63	0,66	0,64	1,00		
18	0,65	0,58	0,57	0,67	0,72	0,67	0,72	0,58	0,62	0,55	0,69	0,58	0,43	0,63	0,65	0,62	0,63	1,00	
19	0,67	0,67	0,55	0,69	0,72	0,70	0,63	0,55	0,64	0,69	0,65	0,54	0,43	0,66	0,65	0,69	0,58	0,73	1,00
20	0,59	0,62	0,49	0,65	0,72	0,62	0,62	0,63	0,60	0,55	0,63	0,58	0,53	0,54	0,57	0,64	0,55	0,76	0,71
21	0,59	0,76	0,64	0,61	0,65	0,65	0,71	0,68	0,59	0,59	0,67	0,61	0,68	0,59	0,66	0,65	0,61	0,61	0,65
22	0,61	0,74	0,70	0,62	0,65	0,60	0,57	0,68	0,68	0,63	0,69	0,68	0,63	0,57	0,70	0,64	0,67	0,53	0,63
23	0,61	0,69	0,67	0,71	0,66	0,49	0,59	0,72	0,55	0,66	0,71	0,66	0,55	0,62	0,59	0,68	0,57	0,54	0,66
24	0,62	0,60	0,59	0,60	0,58	0,57	0,57	0,59	0,59	0,59	0,63	0,55	0,54	0,66	0,55	0,57	0,55	0,60	0,64
25	0,68	0,73	0,67	0,55	0,63	0,67	0,67	0,52	0,57	0,63	0,58	0,71	0,60	0,67	0,67	0,61	0,61	0,62	0,66
26	0,65	0,80	0,77	0,65	0,66	0,67	0,72	0,62	0,70	0,61	0,71	0,64	0,61	0,68	0,76	0,60	0,65	0,59	0,60
27	0,54	0,72	0,67	0,58	0,64	0,65	0,62	0,61	0,56	0,70	0,59	0,63	0,53	0,65	0,67	0,62	0,72	0,49	0,63
28	0,53	0,69	0,66	0,59	0,58	0,60	0,68	0,72	0,53	0,63	0,58	0,73	0,70	0,62	0,60	0,72	0,85	0,55	0,50
29	0,60	0,67	0,65	0,70	0,72	0,70	0,74	0,62	0,59	0,54	0,62	0,66	0,58	0,66	0,75	0,67	0,75	0,67	0,70
30	0,63	0,71	0,67	0,62	0,70	0,63	0,72	0,61	0,62	0,57	0,69	0,59	0,53	0,66	0,69	0,60	0,68	0,71	0,67
31	0,54	0,69	0,67	0,65	0,58	0,47	0,70	0,69	0,56	0,76	0,68	0,70	0,57	0,59	0,66	0,72	0,64	0,55	0,59
32	0,53	0,71	0,67	0,63	0,65	0,69	0,72	0,65	0,60	0,61	0,64	0,65	0,61	0,56	0,64	0,65	0,78	0,59	0,59
33	0,53	0,58	0,58	0,49	0,57	0,61	0,67	0,52	0,54	0,42	0,61	0,63	0,50	0,56	0,52	0,61	0,73	0,55	0,49
34	0,55	0,65	0,65	0,58	0,59	0,52	0,70	0,60	0,49	0,55	0,62	0,71	0,59	0,55	0,54	0,66	0,70	0,52	0,49
35	0,61	0,77	0,59	0,68	0,69	0,63	0,63	0,62	0,56	0,72	0,72	0,57	0,51	0,62	0,56	0,68	0,65	0,60	0,72
36	0,59	0,58	0,64	0,65	0,71	0,53	0,62	0,61	0,55	0,52	0,67	0,70	0,53	0,65	0,60	0,55	0,66	0,63	0,54
37	0,70	0,73	0,67	0,60	0,70	0,66	0,63	0,60	0,62	0,54	0,64	0,67	0,65	0,67	0,61	0,53	0,65	0,55	0,61
38	0,64	0,59	0,61	0,57	0,65	0,60	0,67	0,60	0,59	0,53	0,62	0,61	0,49	0,66	0,67	0,64	0,66	0,70	0,62
39	0,68	0,53	0,56	0,60	0,67	0,57	0,69	0,55	0,64	0,54	0,62	0,67	0,46	0,62	0,68	0,68	0,59	0,72	0,64
40	0,67	0,76	0,62	0,63	0,71	0,62	0,64	0,65	0,60	0,65	0,63	0,56	0,66	0,66	0,57	0,55	0,61	0,61	0,63
41	0,63	0,71	0,68	0,60	0,67	0,70	0,75	0,60	0,55	0,54	0,63	0,68	0,55	0,67	0,64	0,63	0,79	0,61	0,65
42	0,64	0,55	0,59	0,57	0,69	0,65	0,70	0,59	0,58	0,49	0,55	0,67	0,54	0,70	0,62	0,59	0,71	0,68	0,60
43	0,59	0,61	0,62	0,66	0,63	0,58	0,62	0,57	0,58	0,64	0,63	0,57	0,60	0,64	0,61	0,66	0,53	0,54	0,67
44	0,56	0,61	0,65	0,66	0,60	0,63	0,73	0,59	0,64	0,62	0,63	0,62	0,60	0,73	0,67	0,59	0,58	0,58	0,60
45	0,52	0,54	0,55	0,58	0,58	0,54	0,54	0,60	0,53	0,66	0,56	0,58	0,54	0,59	0,51	0,63	0,50	0,41	0,58
46	0,64	0,67	0,68	0,65	0,69	0,69	0,78	0,60	0,67	0,65	0,72	0,59	0,54	0,59	0,68	0,58	0,68	0,65	0,59
47	0,64	0,66	0,61	0,58	0,67	0,74	0,69	0,47	0,63	0,66	0,61	0,56	0,55	0,62	0,67	0,55	0,62	0,60	0,72
48	0,70	0,57	0,60	0,60	0,62	0,58	0,61	0,67	0,58	0,58	0,63	0,66	0,53	0,70	0,71	0,64	0,65	0,69	0,67
49	0,59	0,65	0,60	0,65	0,65	0,57	0,57	0,68	0,62	0,61	0,64	0,63	0,55	0,70	0,55	0,65	0,61	0,53	0,67
50	0,52	0,67	0,58	0,59	0,57	0,50	0,53	0,66	0,55	0,68	0,66	0,54	0,55	0,55	0,51	0,60	0,53	0,56	0,58
51	0,67	0,58	0,54	0,65	0,78	0,64	0,68	0,59	0,60	0,58	0,65	0,56	0,51	0,68	0,76	0,63	0,59	0,78	0,69
52	0,50	0,64	0,51	0,54	0,54	0,47	0,43	0,60	0,59	0,59	0,55	0,45	0,58	0,49	0,49	0,63	0,44	0,40	0,54
53	0,60	0,70	0,60	0,59	0,65	0,62	0,57	0,71	0,72	0,61	0,60	0,60	0,62	0,63	0,58	0,63	0,61	0,62	0,68
54	0,63	0,64	0,64	0,69	0,67	0,64	0,66	0,69	0,65	0,60	0,67	0,63	0,56	0,72	0,74	0,64	0,66	0,71	0,70
55	0,53	0,56	0,65	0,52	0,52	0,49	0,65	0,58	0,45	0,55	0,62	0,69	0,48	0,62	0,59	0,55	0,75	0,55	0,49
56	0,60	0,66	0,67	0,56	0,59	0,72	0,72	0,60	0,68	0,55	0,62	0,72	0,64	0,58	0,62	0,58	0,68	0,55	0,54
57	0,59	0,64	0,72	0,76	0,63	0,49	0,67	0,62	0,59	0,65	0,67	0,60	0,63	0,63	0,67	0,59	0,51	0,52	0,56
58	0,51	0,66	0,59	0,51	0,50	0,52	0,61	0,62	0,56	0,56	0,62	0,67	0,61	0,60	0,59	0,57	0,64	0,43	0,53
59	0,52	0,68	0,61	0,59	0,60	0,53	0,61	0,76	0,68	0,61	0,64	0,60	0,60	0,60	0,67	0,59	0,59	0,57	0,57
60	0,67	0,59	0,63	0,60	0,60	0,50	0,53	0,71	0,61	0,67	0,53	0,64	0,57	0,68	0,71	0,64	0,59	0,53	0,60
61	0,69	0,55	0,61	0,62	0,62	0,61	0,59	0,59	0,59	0,63	0,62	0,61	0,47	0,71	0,67	0,62	0,57	0,58	0,64
63	0,54	0,64	0,58	0,65	0,69	0,59	0,68	0,67	0,71	0,57	0,66	0,58	0,53	0,61	0,70	0,63	0,61	0,67	0,63
65	0,60	0,59	0,65	0,52	0,58	0,65	0,68	0,68	0,68	0,63	0,58	0,67	0,61	0,63	0,65	0,68	0,72	0,51	0,56
66	0,56	0,70	0,66	0,62	0,65	0,67	0,71	0,61	0,51	0,66	0,60	0,60	0,55	0,70	0,72	0,64	0,84	0,62	0,68
67	0,61	0,56	0,47	0,58	0,65	0,59	0,52	0,59	0,57	0,61	0,58	0,51	0,49	0,66	0,56	0,52	0,57	0,61	0,67
68	0,54	0,64	0,59	0,69	0,67	0,64	0,59	0,65	0,68	0,71	0,65	0,61	0,49	0,60	0,63	0,68	0,72	0,53	0,66
69	0,65	0,68	0,57	0,68	0,71	0,64	0,64	0,50	0,60	0,61	0,59	0,53	0,55	0,63	0,64	0,58	0,58	0,64	0,73
70	0,49	0,42	0,54	0,63	0,55	0,51	0,52	0,60	0,64	0,62	0,51	0,59	0,47	0,54	0,66	0,58	0,59	0,54	0,48
71	0,49	0,62	0,53	0,47	0,51	0,64	0,61	0,57	0,63	0,52	0,60	0,60	0,59	0,49	0,54	0,51	0,63	0,54	0,51
72	0,46	0,56	0,49	0,64	0,56	0,43	0,50	0,64	0,55	0,57	0,67	0,56	0,43	0,52	0,56	0,62	0,56	0,58	0,55
73	0,63	0,65	0,64	0,49	0,59	0,53	0,62	0,67	0,58	0,59	0,62	0,75	0,64	0,65	0,62	0,63	0,59	0,56	0,53
74	0,61	0,63	0,64																

Ek Çizelge 1 (Devam).

	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20	1,00																				
21	0,67	1,00																			
22	0,56	0,65	1,00																		
23	0,66	0,67	0,77	1,00																	
24	0,62	0,55	0,56	0,61	1,00																
25	0,62	0,60	0,64	0,65	0,63	1,00															
26	0,55	0,67	0,74	0,61	0,64	0,74	1,00														
27	0,54	0,60	0,69	0,66	0,56	0,70	0,66	1,00													
28	0,58	0,65	0,63	0,63	0,51	0,62	0,65	0,71	1,00												
29	0,73	0,76	0,68	0,68	0,61	0,68	0,69	0,68	0,73	1,00											
30	0,59	0,63	0,68	0,58	0,60	0,64	0,73	0,60	0,60	0,65	1,00										
31	0,59	0,63	0,66	0,70	0,55	0,62	0,68	0,72	0,73	0,64	0,71	1,00									
32	0,66	0,65	0,56	0,58	0,49	0,60	0,67	0,70	0,81	0,75	0,67	0,76	1,00								
33	0,57	0,60	0,57	0,55	0,48	0,58	0,55	0,55	0,66	0,65	0,59	0,59	0,70	1,00							
34	0,56	0,60	0,59	0,67	0,48	0,61	0,57	0,61	0,75	0,61	0,64	0,77	0,75	0,81	1,00						
35	0,65	0,61	0,64	0,73	0,53	0,67	0,65	0,70	0,62	0,62	0,67	0,72	0,65	0,59	0,67	1,00					
36	0,59	0,55	0,59	0,56	0,59	0,60	0,67	0,56	0,60	0,60	0,69	0,64	0,61	0,60	0,64	0,64	1,00				
37	0,57	0,63	0,68	0,69	0,68	0,74	0,69	0,69	0,64	0,68	0,63	0,61	0,68	0,60	0,65	0,63	0,67	1,00			
38	0,66	0,58	0,58	0,64	0,63	0,69	0,68	0,57	0,64	0,67	0,62	0,63	0,63	0,61	0,58	0,57	0,67	0,62	1,00		
39	0,68	0,57	0,59	0,62	0,64	0,67	0,62	0,58	0,57	0,66	0,58	0,63	0,61	0,61	0,63	0,54	0,69	0,64	0,75	1,00	
40	0,69	0,64	0,57	0,65	0,65	0,69	0,67	0,65	0,65	0,65	0,63	0,63	0,64	0,60	0,64	0,71	0,64	0,65	0,63	0,65	
41	0,61	0,70	0,60	0,65	0,63	0,67	0,67	0,73	0,73	0,78	0,65	0,66	0,69	0,76	0,72	0,71	0,66	0,71	0,69	0,63	
42	0,64	0,56	0,49	0,54	0,53	0,61	0,58	0,59	0,72	0,73	0,70	0,65	0,71	0,61	0,69	0,60	0,71	0,68	0,65	0,69	
43	0,69	0,65	0,55	0,69	0,69	0,68	0,64	0,63	0,57	0,70	0,63	0,66	0,67	0,56	0,61	0,64	0,61	0,62	0,65	0,64	
44	0,61	0,69	0,66	0,58	0,64	0,66	0,69	0,60	0,60	0,71	0,74	0,68	0,64	0,61	0,61	0,57	0,58	0,61	0,61	0,62	
45	0,59	0,59	0,65	0,74	0,53	0,58	0,56	0,63	0,60	0,61	0,49	0,67	0,58	0,57	0,56	0,56	0,54	0,52	0,55	0,56	
46	0,64	0,64	0,60	0,62	0,59	0,63	0,71	0,67	0,66	0,69	0,69	0,74	0,77	0,60	0,63	0,66	0,68	0,62	0,75	0,69	
47	0,66	0,61	0,58	0,57	0,62	0,77	0,68	0,68	0,56	0,66	0,68	0,60	0,65	0,57	0,56	0,67	0,63	0,62	0,69	0,65	
48	0,67	0,59	0,62	0,63	0,68	0,68	0,67	0,60	0,63	0,69	0,61	0,64	0,59	0,48	0,57	0,61	0,63	0,69	0,70	0,68	
49	0,59	0,62	0,60	0,62	0,67	0,67	0,63	0,62	0,56	0,64	0,63	0,64	0,64	0,64	0,67	0,66	0,68	0,71	0,63	0,65	
50	0,54	0,56	0,65	0,64	0,59	0,58	0,60	0,62	0,53	0,55	0,62	0,63	0,48	0,44	0,52	0,63	0,62	0,56	0,53	0,51	
51	0,67	0,62	0,56	0,59	0,55	0,61	0,61	0,61	0,58	0,70	0,65	0,62	0,68	0,56	0,60	0,64	0,66	0,62	0,73	0,76	
52	0,48	0,56	0,58	0,58	0,55	0,61	0,59	0,57	0,52	0,47	0,47	0,50	0,45	0,50	0,51	0,55	0,46	0,50	0,48	0,51	
53	0,64	0,62	0,63	0,64	0,61	0,67	0,66	0,59	0,62	0,67	0,66	0,56	0,64	0,51	0,51	0,67	0,62	0,66	0,63	0,57	
54	0,61	0,63	0,64	0,56	0,56	0,58	0,70	0,63	0,65	0,70	0,75	0,64	0,69	0,49	0,57	0,63	0,70	0,68	0,62	0,64	
55	0,49	0,54	0,62	0,58	0,47	0,56	0,63	0,63	0,68	0,62	0,68	0,68	0,66	0,68	0,77	0,60	0,71	0,54	0,59	0,60	
56	0,60	0,63	0,60	0,52	0,48	0,61	0,64	0,62	0,68	0,67	0,57	0,60	0,75	0,71	0,68	0,55	0,57	0,67	0,54	0,55	
57	0,59	0,67	0,62	0,72	0,60	0,58	0,67	0,60	0,60	0,65	0,58	0,66	0,60	0,52	0,62	0,55	0,54	0,64	0,55	0,62	
58	0,48	0,65	0,62	0,57	0,54	0,60	0,65	0,67	0,69	0,62	0,63	0,66	0,72	0,64	0,76	0,55	0,57	0,63	0,53	0,56	
59	0,62	0,67	0,68	0,61	0,62	0,55	0,71	0,61	0,56	0,64	0,62	0,66	0,62	0,51	0,50	0,62	0,63	0,62	0,61	0,53	
60	0,64	0,57	0,61	0,67	0,58	0,59	0,64	0,64	0,67	0,61	0,56	0,68	0,61	0,45	0,60	0,56	0,60	0,56	0,64	0,66	
61	0,57	0,52	0,56	0,61	0,66	0,66	0,65	0,61	0,54	0,63	0,58	0,58	0,53	0,59	0,59	0,60	0,65	0,63	0,66	0,66	
62	0,67	0,60	0,65	0,53	0,59	0,61	0,73	0,60	0,59	0,71	0,73	0,71	0,68	0,53	0,60	0,61	0,68	0,62	0,67	0,69	
63	0,56	0,63	0,59	0,60	0,56	0,58	0,64	0,68	0,73	0,69	0,58	0,71	0,75	0,66	0,67	0,57	0,56	0,61	0,62	0,62	
64	0,59	0,65	0,64	0,60	0,53	0,68	0,70	0,87	0,77	0,75	0,72	0,72	0,73	0,58	0,64	0,66	0,59	0,63	0,65	0,58	
65	0,61	0,55	0,54	0,51	0,62	0,58	0,59	0,56	0,52	0,63	0,65	0,52	0,51	0,47	0,49	0,61	0,61	0,57	0,60	0,56	
66	0,56	0,51	0,70	0,67	0,58	0,60	0,65	0,68	0,67	0,67	0,60	0,68	0,69	0,62	0,63	0,68	0,58	0,63	0,62	0,60	
67	0,67	0,62	0,53	0,59	0,70	0,60	0,65	0,59	0,55	0,70	0,70	0,56	0,62	0,64	0,62	0,71	0,60	0,65	0,65	0,65	
68	0,51	0,39	0,63	0,53	0,47	0,48	0,55	0,53	0,58	0,53	0,51	0,55	0,62	0,52	0,56	0,48	0,63	0,45	0,53	0,61	
69	0,54	0,54	0,57	0,46	0,49	0,60	0,61	0,60	0,59	0,60	0,54	0,54	0,72	0,67	0,61	0,55	0,54	0,61	0,48	0,53	
70	0,59	0,49	0,63	0,64	0,48	0,49	0,53	0,64	0,60	0,57	0,45	0,65	0,58	0,55	0,52	0,59	0,53	0,57	0,49	0,55	
71	0,60	0,62	0,56	0,73	0,54	0,68	0,60	0,73	0,71	0,62	0,57	0,74	0,64	0,60	0,73	0,62	0,61	0,70	0,67	0,62	
72	0,59	0,59	0,55	0,54	0,60	0,65	0,65	0,72	0,63	0,71	0,69	0,70	0,73	0,64	0,68	0,66	0,66	0,69	0,58	0,65	
73	0,65	0,59	0,60	0,64	0,60	0,73	0,67	0,67	0,60	0,76	0,72	0,55	0,71	0,68	0,68	0,65	0,57	0,71	0,72	0,65	
74	0,64	0,58	0,55	0,57	0,65	0,67	0,63	0,62	0,58	0,60	0,67	0,56	0,59	0,58	0,60	0,66	0,60	0,60	0,59	0,54	
75	0,60	0,62	0,59	0,58	0,57	0,62	0,67	0,68	0,67	0,75	0,62	0,59	0,73	0,58	0,61	0,62	0,56	0,69	0,61	0,63	
76	0,65	0,60	0,56	0,50	0,53	0,71	0,67	0,64	0,60	0,67	0,63	0,55	0,70	0,62	0,60	0,61	0,58	0,65	0,63	0,57	
77	0,57	0,59	0,60	0,51	0,52																

Ek Çizelge 1 (Devam).

	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23																				
24																				
25																				
26																				
27																				
28																				
29																				
30																				
31																				
32																				
33																				
34																				
35																				
36																				
37																				
38																				
39																				
40	1,00																			
41	0,68	1,00																		
42	0,69	0,71	1,00																	
43	0,67	0,60	0,59	1,00																
44	0,60	0,60	0,63	0,72	1,00															
45	0,64	0,59	0,55	0,72	0,63	1,00														
46	0,62	0,72	0,69	0,66	0,67	0,55	1,00													
47	0,67	0,65	0,60	0,67	0,71	0,54	0,74	1,00												
48	0,59	0,65	0,64	0,63	0,67	0,49	0,65	0,62	1,00											
49	0,72	0,64	0,58	0,73	0,67	0,54	0,56	0,65	0,63	1,00										
50	0,66	0,50	0,49	0,53	0,62	0,55	0,58	0,64	0,59	0,61	1,00									
51	0,68	0,60	0,71	0,61	0,61	0,48	0,70	0,67	0,67	0,66	0,52	1,00								
52	0,67	0,44	0,37	0,56	0,53	0,55	0,41	0,56	0,44	0,68	0,68	0,49	1,00							
53	0,76	0,60	0,67	0,63	0,64	0,60	0,58	0,63	0,66	0,62	0,64	0,60	0,63	1,00						
54	0,63	0,65	0,74	0,58	0,62	0,47	0,68	0,59	0,72	0,61	0,59	0,72	0,44	0,69	1,00					
55	0,56	0,61	0,59	0,60	0,64	0,49	0,59	0,55	0,60	0,65	0,62	0,61	0,45	0,52	0,65	1,00				
56	0,60	0,70	0,63	0,56	0,60	0,47	0,73	0,67	0,57	0,62	0,54	0,62	0,49	0,55	0,68	0,63	1,00			
57	0,65	0,63	0,57	0,69	0,69	0,66	0,60	0,55	0,55	0,57	0,57	0,57	0,59	0,57	0,58	0,53	0,61	1,00		
58	0,63	0,65	0,60	0,62	0,66	0,51	0,63	0,60	0,63	0,65	0,55	0,57	0,52	0,59	0,64	0,69	0,71	0,56	1,00	
59	0,63	0,60	0,57	0,57	0,66	0,52	0,65	0,55	0,67	0,60	0,63	0,63	0,55	0,68	0,72	0,58	0,61	0,57	0,57	1,00
60	0,67	0,60	0,61	0,66	0,64	0,65	0,63	0,60	0,75	0,58	0,64	0,61	0,58	0,67	0,67	0,61	0,59	0,68	0,66	0,63
61	0,63	0,65	0,60	0,60	0,68	0,58	0,59	0,68	0,71	0,70	0,68	0,65	0,66	0,61	0,62	0,61	0,61	0,64	0,53	0,62
62	0,62	0,62	0,67	0,61	0,71	0,45	0,74	0,72	0,75	0,68	0,63	0,70	0,49	0,67	0,73	0,60	0,62	0,53	0,65	0,74
63	0,62	0,62	0,67	0,61	0,71	0,45	0,74	0,72	0,75	0,68	0,63	0,70	0,49	0,67	0,73	0,60	0,62	0,53	0,65	0,74
64	0,65	0,68	0,67	0,70	0,63	0,66	0,74	0,61	0,65	0,59	0,53	0,60	0,58	0,70	0,63	0,65	0,71	0,66	0,70	0,65
65	0,62	0,75	0,66	0,61	0,66	0,56	0,67	0,68	0,64	0,64	0,55	0,67	0,49	0,53	0,75	0,68	0,61	0,56	0,67	0,61
66	0,68	0,56	0,64	0,60	0,67	0,53	0,55	0,65	0,65	0,64	0,79	0,59	0,61	0,71	0,65	0,55	0,49	0,53	0,58	0,55
67	0,61	0,64	0,56	0,69	0,62	0,63	0,68	0,67	0,61	0,66	0,71	0,61	0,66	0,64	0,63	0,66	0,68	0,64	0,62	0,65
68	0,73	0,69	0,69	0,63	0,70	0,51	0,65	0,76	0,61	0,69	0,63	0,68	0,62	0,70	0,59	0,53	0,63	0,64	0,57	0,59
69	0,50	0,50	0,62	0,56	0,54	0,58	0,64	0,50	0,53	0,46	0,56	0,60	0,58	0,46	0,60	0,55	0,63	0,64	0,65	0,60
70	0,66	0,59	0,57	0,53	0,51	0,49	0,62	0,61	0,49	0,57	0,57	0,54	0,55	0,62	0,63	0,53	0,75	0,51	0,71	0,58
71	0,49	0,54	0,47	0,49	0,47	0,57	0,55	0,44	0,63	0,51	0,55	0,59	0,56	0,50	0,58	0,51	0,55	0,58	0,48	0,62
72	0,62	0,67	0,70	0,64	0,57	0,60	0,68	0,58	0,69	0,58	0,52	0,67	0,49	0,63	0,64	0,59	0,68	0,64	0,64	0,62
73	0,68	0,75	0,80	0,54	0,65	0,49	0,68	0,65	0,67	0,68	0,55	0,72	0,45	0,67	0,75	0,62	0,69	0,55	0,63	0,70
74	0,72	0,70	0,72	0,69	0,68	0,56	0,67	0,75	0,63	0,72	0,54	0,74	0,56	0,70	0,64	0,60	0,67	0,60	0,65	0,60
75	0,64	0,66	0,59	0,58	0,61	0,48	0,60	0,72	0,63	0,56	0,60	0,58	0,46	0,60	0,55	0,62	0,60	0,51	0,63	0,50
76	0,64	0,71	0,71	0,58	0,62	0,49	0,69	0,67	0,65	0,58	0,51	0,67	0,47	0,61	0,67	0,55	0,74	0,62	0,68	0,66
77	0,68	0,64	0,67	0,51	0,57	0,45	0,60	0,69	0,57	0,56	0,56	0,64	0,51	0,67	0,67	0,52	0,69	0,57	0,63	0,61
78	0,55	0,61	0,62	0,57	0,58	0,42	0,63	0,62	0,59	0,53	0,56	0,67	0,49	0,62	0,73	0,57	0,73	0,58	0,67	0,67
79	0,65	0,59	0,66	0,53	0,57	0,41	0,62	0,65	0,56	0,56	0,56	0,63	0,58	0,67	0,60	0,61	0,67	0,55	0,55	0,60
80	0,63	0,67	0,72	0,64	0,68	0,51	0,71	0,62	0,67	0,59	0,55	0,69	0,52	0,66	0,69	0,61	0,67	0,64	0,73	0,71
81	0,60	0,68	0,63	0,49	0,55	0,51	0,54	0,56	0,63	0,71	0,62	0,63	0,63	0,56	0,65	0,58	0,52	0,53	0,64	0,61
82	0,63	0,55	0,52	0,60	0,49	0,70	0,56	0,57	0,53	0,64	0,52	0,59	0,67	0,65	0,64	0,55	0,61	0,61	0,64	0,57
83	0,63	0,55	0,52	0,60	0,49	0,70	0,56	0,57	0,53	0,64	0,52	0,59	0,67	0,65	0,64	0,55	0,61	0,61	0,64	0,57

Ek Çizelge 1 (Devam).

	60	61	63	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		
21																		
22																		
23																		
24																		
25																		
26																		
27																		
28																		
29																		
30																		
31																		
32																		
33																		
34																		
35																		
36																		
37																		
38																		
39																		
40																		
41																		
42																		
43																		
44																		
45																		
46																		
47																		
48																		
49																		
50																		
51																		
52																		
53																		
54																		
55																		
56																		
57																		
58																		
59																		
60	1,00																	
61	0,67	1,00																
63	0,66	0,65	1,00															
65	0,69	0,62	0,64	1,00														
66	0,69	0,59	0,69	0,62	1,00													
67	0,68	0,72	0,64	0,55	0,61	1,00												
68	0,65	0,70	0,68	0,72	0,64	0,66	1,00											
69	0,59	0,72	0,71	0,61	0,59	0,71	0,69	1,00										
70	0,67	0,59	0,59	0,65	0,51	0,53	0,71	0,54	1,00									
71	0,49	0,53	0,64	0,68	0,58	0,55	0,64	0,54	0,58	1,00								
72	0,59	0,61	0,58	0,59	0,64	0,46	0,68	0,49	0,58	0,56	1,00							
73	0,70	0,64	0,60	0,76	0,66	0,48	0,56	0,55	0,53	0,59	0,67	1,00						
74	0,60	0,65	0,72	0,69	0,75	0,61	0,60	0,67	0,55	0,69	0,56	0,69	1,00					
75	0,62	0,71	0,69	0,71	0,71	0,65	0,72	0,76	0,53	0,67	0,47	0,69	0,76	1,00				
76	0,53	0,55	0,60	0,57	0,64	0,60	0,59	0,65	0,37	0,60	0,44	0,62	0,68	0,69	1,00			
77	0,66	0,61	0,70	0,70	0,68	0,60	0,65	0,70	0,53	0,68	0,46	0,66	0,74	0,78	0,60	1,00		
78	0,52	0,59	0,68	0,61	0,67	0,62	0,58	0,67	0,50	0,81	0,51	0,65	0,72	0,76	0,70	0,73	1,00	
79	0,57	0,58	0,65	0,67	0,64	0,57	0,63	0,60	0,56	0,71	0,57	0,75	0,69	0,71	0,67	0,72	0,81	1,00
80	0,55	0,60	0,68	0,70	0,58	0,65	0,68	0,75	0,58	0,66	0,44	0,54	0,73	0,74	0,68	0,72	0,68	0,61
81	0,66	0,64	0,69	0,80	0,64	0,60	0,68	0,64	0,61	0,66	0,56	0,77	0,79	0,73	0,65	0,77	0,72	0,79
82	0,60	0,74	0,63	0,54	0,67	0,68	0,61	0,68	0,57	0,53	0,62	0,61	0,68	0,57	0,51	0,59	0,55	0,57
83	0,63	0,54	0,53	0,65	0,67	0,52	0,71	0,48	0,65	0,71	0,63	0,63	0,60	0,56	0,54	0,56	0,60	0,57

Ek Çizelge 1 (Devam).

	80	81	82	83
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				
61				
63				
65				
66				
67				
68				
69				
70				
71				
72				
73				
74				
75				
76				
77				
78				
79				
80	1,00			
81	0,70	1,00		
82	0,53	0,64	1,00	
83	0,54	0,56	0,62	1,00

ÖZGEÇMİŞ

Erol KÜÇÜK

1991 yılında Malatya Ziraat Meslek Lisesi'ne başladı ve 1995 yılında Ziraat Teknisyeni olarak mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne girdi. 1996 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nda Ziraat Teknisyeni olarak çalışmaya başladı. 1999 yılında Ziraat Fakültesinden mezun oldu. 2001 yılında Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne tayin oldu. 2003 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda "Bazı Nar Çeşitlerinin Kendine Verimlilik Durumlarının Saptanması" isimli yüksek lisans çalışmasını tamamladı. Aynı yıl doktora öğrenimine başladı. Halen Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Meyvecilik Şubesi'nde çalışmaktadır.