

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

131711

KIZILÇAMIN (*PİNUS BRUTİA* TEN.) ÇAMELİ-GÖLDAĞI ORİJİNLİ
ASAR-ANTALYA KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE EŞLEŞME SİSTEMİNİN
VE GENETİK KONTAMİNASYONUN SAPTANMASI

DOKTORA TEZİ

Nuray KAYA

Anabilim Dalı: Biyoloji

131711

Ekim 2001

T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**KIZILÇAMIN (*PİNUS BRUTIA* TEN.) ÇAMELİ-GÖLDAĞI ORİJİNLİ
ASAR-ANTALYA KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE EŞLEŞME SİSTEMİNİN
VE GENETİK KONTAMİNASYONUN SAPTANMASI**

Nuray KAYA

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2001**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIZILÇAMIN (*PINUS BRUTIA* TEN.) ÇAMELİ-GÖLDAĞI ORJİN Lİ
ASAR-ANTALYA KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE EŞLEŞME SİSTEMİNİN VE
GENETİK KONTAMİNASYONUN SAPTANMASI

Nuray KAYA

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 19.10/2001 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından (9.5.) not takdir edilerek
Oybirliğı / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kâni İŞİK (Danışman)

Prof. Dr. Fatih TOPÇUOĞLU

Prof. Dr. İbrahim UZUN

Prof. Dr. Mustafa GÖKÇEOĞLU

Prof. Dr. Musa GENÇ

ÖZET

KIZILÇAMIN (*PINUS BRUTIA* TEN.) ÇAMELİ-GÖLDAĞI ORJİNİ ASAR-ANTALYA KLONAL TOHUM BAHÇESİNDE EŞLEŞME SİSTEMİNİN VE GENETİK KONTAMİNASYONUN SAPTANMASI

Nuray KAYA

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kâni IŞIK
Ekim 2001, xii + 81 sayfa

Bu çalışmanın amacı, Asar-Antalya’da kurulmuş bulunan 11 yaşındaki bir kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) klonal tohum bahçesinde eşleşme sistemini ve polen kontaminasyonu oranını izoenzim analizleri yardımıyla tahmin etmektir. İzoenzim analizleri için Asar tohum bahçesi ve tohum bahçesine yakın iki doğal populasyondan (Populasyon A ve Populasyon B) toplanan tohumların megagametofit ve embriyo dokuları kullanıldı. Analizler, dokuz enzim sistemi tarafından kodlanan 14 lokusta yapıldı.

Çalışılan lokuslar bakımından Asar tohum bahçesindeki 28 klonun genotipi, her bir klondan örneklenen tohumların megagametofitik dokusundaki bantlaşma yapısına göre belirlendi. Tohum bahçesindeki 28 klonun her biri beklendiği gibi farklı genotiplere sahipti. Ancak, incelenen toplam 84 rametten %6’sının ait oldukları sanılan klonlara ait olmadıkları tespit edildi.

Çok-lokus tahmin yöntemine dayanarak kendinden-başka bireylerle döllenme sonucu oluşan yaşayabilir nitelikteki tohumların oranının (t_m) 0.947 olduğu bulundu. Başka bir deyişle, kendi-kendine döllenme sonucu oluşan tohumların oranının ise %5.3 olduğu belirlendi. Kendinden-başka bireylerle döllenme oranının %85.7’si tohum bahçesi dışından gelen polenlerle, %9’u ise tohum bahçesi içindeki klonlar arasındaki polenlerle gerçekleşmiştir. Tohum bahçesinde polen kontaminasyonu yoluyla oluşan tohumların tahmin edilen oranı (m) oldukça yüksek (%85.7) bulundu. Bu düzeydeki polen kontaminasyonunun, tohum bahçesi tohumlarında öngörülen genetik kazancı %43 kadar azaltacağı belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: Eşleşme sistemi, polen kirliliği, gen göçü, *Pinus brutia*, izoenzim

JÜRİ: Prof. Dr. Kâni IŞIK

Prof. Dr. Fatih TOPÇUOĞLU

Prof. Dr. İbrahim UZUN

Prof. Dr. Mustafa GÖKÇEOĞLU

Prof. Dr. Musa GENÇ



ABSTRACT

ESTIMATION OF THE MATING SYSTEM AND GENETIC CONTAMINATION IN A CLONAL SEED ORCHARD OF *PINUS BRUTIA* TEN. IN ASAR-ANTALYA

Nuray KAYA

Ph. D. Thesis in Biology
Advisor: Prof. Dr. Kâni IŞIK
October 2001, xii + 81 Pages

The aim of this study is to estimate patterns of mating system and pollen contamination level in a 11 year-old Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) clonal seed orchard, located in Asar, Antalya, with the aid of isozyme markers. Isozyme analysis was performed on both maternal and embryo tissues of seeds collected from seed orchard and two neighboring natural populations (Population A and Population B). Fourteen loci encoding nine enzyme systems were analyzed.

Genotypes of each of the 28 clones in the seed orchard were determined based on studies on the banding patterns of megagametophyte tissues of seeds sampled from each clone. As expected, each of the 28 clones in the seed orchard had different genotypes. Yet, six percent of the 84 ramets studied in the seed orchard were not belong to the clones that they are supposed to be.

Based on a multilocus estimator, the proportion of viable seeds originating from outcrossing (t_m) was found to be 0.947. In other words, selfing in the seed orchard was estimated to be 5.3%. We estimated that 85.7% of the outcrossing was due to pollen contamination from outside of the seed orchard, and 9% of the outcrossing was due to cross pollination among the clones within the seed orchard. Therefore, the estimated proportion of seeds resulting from pollen contamination (pollination by non-orchard sources) was quite high ($m=85.7\%$). This level of pollen contamination is expected to reduce predicted genetic gains in the seed orchard crop by 43%.

KEY WORDS: Mating system, pollen contamination, gene migration, *Pinus brutia*, isozyme

COMMITTEE: Prof. Dr. Kâni IŞIK

Prof. Dr. Fatih TOPÇUOĞLU

Prof. Dr. İbrahim UZUN

Prof. Dr. Mustafa GÖKÇEOĞLU

Prof. Dr. Musa GENÇ



ÖNSÖZ

Tohum Bahçeleri orman ağaçlarının genetik ıslahında büyük öneme sahiptir. Ağaçlandırma alanlarında kurulan ormanların kısa ve uzun vadedeki başarısı, kullanılan tohumların genetik kalitesine bağlıdır. Endüstriyel ağaçlandırmalarda tohum bahçelerinden elde edilen ve genetik kalitesi yüksek tohum kullanımı oranı arttıkça ağaç ıslahı programı da o oranda amacına ulaşmaktadır. Ülkemizde sayısı ve önemi gittikçe artan tohum bahçelerinin amacına uygun yönde işletilebilmesi için bir çok konuda yeni bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Orman Bakanlığı tarafından ülkemizin değişik bölgelerinde, değişik orman ağaçları için 2001 yılına kadar 163 adet tohum bahçesi kurulmuştur. Bu 163 adet tohum bahçesinden, Antalya’da yalnızca kızılçam türüne ait 11 adet tohum bahçesi bulunmaktadır. Bu çalışmaya konu olan  ameli-Göldağı orijinli Asar Tohum bahçesi de bunlardan birisidir. Çalışmada, on bir yaşındaki kızılçam Asar tohum bahçesinde, eşleşme sisteminin ve polen kontaminasyonu düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum Akademik Danışmanım Sayın Prof. Dr. K ni IşIK’a (Ak. Ün. . Fen-Ed. Fak., Biyoloji Bölümü) ve Tez İzleme Komitemde yer alan ve değerli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Fatih TOPçUOğLU’na (Ak. Ün. Fen-Ed. Fak., Biyoloji Bölümü) ve Sayın Prof. Dr. İbrahim UZUN’a (Ak. Ün. Ziraat Fak., Bahçe Bitkileri Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışmalarım sürecinde hem fikir alış-verişinde bulunduğum hem de laboratuvarında yedi ay çalışma imkanı bulduğum Prof. Dr. W. Tom ADAMS (Oregon State University, College of Forestry, Dept. of Forest Science, Oregon-USA), Dr. Valerie HIPKINS’e (USDA For. Ser. Nat. Forest Genetics Electrophoresis lab., USA , CA., USA), çalışmada kullandığım kimyasalların bir kısmını sağlayan Orman Bakanlığı, Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü’ne, araziye ulaşım ve materyallerin toplanması konusunda yardımlarını esirgemeyen Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü’ne bu çalışmaya yaptıkları katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ak.Ün., Araştırma Fonu projesi ile (Proje no: 98.01.0121.06), ve TÜBİTAK-TOGTAG/TARP projesi ile (Proje No:TARP-1971) desteklenmiştir. Ayrıca bu çalışmayı “Yurt İçi Doktora Bursu” ve “Yurt İçi-Yurt Dışı Bütünleştirilmiş Doktora Bursu” kapsamında destekleyen TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu’na teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, tez çalışmalarımın her aşamasında büyük özveri gösteren ve desteğini hiç esirgemeyen eşim Bülent KAYA’ya teşekkür ederim.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların kızılçamın genetik ıslahı konusunda halen yapılan ve yapılması planlanan çalışmalara yardımcı olmasını dilerim.

Ekim 2001, Antalya

Nuray KAYA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tohum Bahçesi Nedir?	1
1.2. Tohum Bahçelerine Neden İhtiyaç Duyulur?	1
1.3. Tohum Bahçelerinin Temel Özellikleri	3
1.4. Eşleşme Sistemi ve Önemi	5
1.5. Polen Kontaminasyonu	7
1.6. Eşleşme Sisteminin ve Polen Kontaminasyonunun Belirlenmesinde İzoenzim Analizlerinin Yeri	9
1.7. Çalışmanın Amacı	11
2. MATERYAL ve METOT	12
2.1. Tohum Bahçesinin Özellikleri	12
2.2. Analizler için Tohum Toplanması	13
2.3. Elektroforetik Metodlar	15
2.4. Verilerin Değerlendirilmesi	24
3. BULGULAR	28
3.1. Enzim Fenotipleri	28
3.2. Tohum Bahçesindeki Klonların Genotipik Kimliğinin Belirlenmesi	31
3.3. Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik	43
3.4. Kendisinden Başka Bireylerle Döllenme Oranı ve Polen Kontaminasyonu	47
4. TARTIŞMA	49
4.1. Enzim Fenotiplerinin Belirlenmesi	49

4.2. Klonların Genotipik Kimliklerinin Teşhisi.....	50
4.3. Tohum Bahçesinin, Populasyon A'nın ve Populasyon B'nin Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi.....	51
4.4. Eşleşme Sistemi ve Polen Kontaminasyonu Oranı	53
5. SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	68
7. EKLER.....	77
EK-1 Çameli-Göldağı Orijinli Asar Tohum Bahçesi Krokisi-Klonların Yerleşim Planı	77
EK-2. Tanımlar	79
8- ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	gram
Lt	litre
M	Molarite
μ l	mikrolitre (10^{-6} Lt)
ml	mililitre (10^{-3} Lt)
U	ünite (enzim birimi)

Kısaltmalar

Aco	Akonitaz
Adh	Alkol dehidrogenaz
Ak. Ün.	Akdeniz Üniversitesi
BIOSYS	Biyokimyasal Sistematik (Biochemical Systematics) istatistiki programı
E	Embriyo
E.C. No	Enzim Komisyon Numarası (Enzyme Comission Number)
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
G	Kontaminasyon olmadığında beklenen genetik kazanç değeri
G6PDH	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
Gdh	Glutamat dehidrogenaz
GENFLOW	Gen göçü (Genetic Flow) istatistik programı
G_n	Net genetik kazanç değeri
Got	Glutamat oksalaasetat transaminaz
GPS	Küresel konum belirleme cihazı
IBU	Uluslar arası Biyokimyacılar Birliği (International Union of Biochemists)

m	Polen kontaminasyonu tahmini değeri
M	Megagametofit
Mdh	Malat dehidrogenaz
MLTR	Çok-lokuslu Eşleşme Sistemi (Multi Loci Mating System) Programı
Mnr	Menadion reduktaz
NAD	β -nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	β -nikotinamid adenin dinükleotid, redüklenmiş formu
NADP	β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
6PGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
Pgi	Fosfoglukko izomeraz
PMS	Phenazine Methosulfate
Sdh	Şikimik dehidrogenaz
SE	Standart hata (Standart Error)
t_m	Çok-lokusa (multiple loci) dayalı olarak hesaplanan kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı
t_s	Tek-lokusa (single locus) dayalı olarak hesaplanan ortalama kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı
TARP	Tarımsal Araştırma Projeleri
TOGTAG	Tarım, Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Tohum bahçesinin ve bahçedeki klonların orijininin yeri	12
Şekil 2.2.	Tohum bahçesinin genel krokisi	14
Şekil 3.1.	Analiz edilen enzim sistemlerinin megagametofit ve embriyo dokuda bantlaşma şekillerinin şematik olarak gösterilmesi.....	32
Şekil 3.2.	Kızılçamda Akonitaz (Aco) enziminin jeldeki görünümü	36
Şekil 3.3.	Kızılçamda Alkol dehidrogenaz (Adh) enziminin jeldeki görünümü	36
Şekil 3.4.	Kızılçamda Glutamat dehidrogenaz (Gdh) enziminin jeldeki görünümü.....	37
Şekil 3.5.	Kızılçamda Glutamat-oksala asetat transaminaz (Got) enziminin jeldeki görünümü	37
Şekil 3.6.	Kızılçamda Malat dehidrogenaz (Mdh) enziminin jeldeki görünümü	38
Şekil 3.7.	Kızılçamda Menadion redüktaz (Mnr) enziminin jeldeki görünümü	38
Şekil 3.8.	Kızılçamda 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6-Pgd) enziminin jeldeki görünümü	39
Şekil 3.9.	Kızılçamda Fosfoglukono izomeraz (Pgi) enziminin jeldeki görünümü	39
Şekil 3.10.	Kızılçamda Şikimat dehidrogenaz (Sdh) enziminin jeldeki görünümü	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışılan enzimler hakkında bilgiler.....	17
Çizelge 2.2. Analizler için kullanılan jel ve elektrot tamponlarının içeriği.....	18
Çizelge 2.3. Jellerin boyanmasında kullanılan boya tamponlarının içeriği.....	21
Çizelge 2.4. Çalışılan enzimlerin boyama tamponu ve boya maddeleri.....	22
Çizelge 3.1. Asar-Antalya'da kızılçam klonal tohum bahçesindeki 28 klonun, çalışılan enzimler için genotipleri.....	41
Çizelge 3.2. Asar-Antalya'da kızılçam klonal tohum bahçesinde, beş farklı klonun ikişer rameti ile muhtemelen yanlış etiketlenme sonucu onlara dahil edilmiş rametlerin genotipleri.....	42
Çizelge 3.3. Asar-Antalya kızılçam klonal Tohum bahçesinin, ve iki komşu populasyonun (Populasyon A'nın ve Populasyon B) çalışılan enzimler ve belirlenen lokuslar bakımından allel frekansları.....	44
Çizelge 3.4. İki komşu populasyona (Populasyon A ve Populasyon B) ve Asar-Antalya klonal kızılçam tohum bahçesinin genetik çeşitliliğine ait parametreler	46
Çizelge 3.5. Asar-Antalya kızılçam klonal tohum bahçesinde üretilen tohumlar için Wright'ın Fiksasyon Indexi (F)	46
Çizelge 3.6. Asar-Antalya klonal kızılçam tohum bahçesinde eşleşme sistemi parametreleri	47
Çizelge 3.7. Asar-Antalya klonal kızılçam tohum bahçesinde polen kontaminasyonu parametreleri	48
Çizelge 4.1. <i>Pinus</i> cinsinin bazı türlerinde t_m ve t_s değerleri	55
Çizelge 4.2. Değişik türlere ait tohum bahçelerinde polen kontaminasyonu oranı (m) ..	59

1. GİRİŞ

1.1. Tohum Bahçesi Nedir?

Zobel ve Talbert'e göre (1984) tohum bahçesi şöyle tanımlanır: Seçilmiş klonlar ve kuşakların (generasyonların) oluşturduğu, kolay ve bol orman ağacı tohumu üretmek için işletilen, bahçe dışından gelen polen akışının (kontaminasyonun) azaltıldığı veya yok edildiği, izole edilmiş olan bahçelerdir. Uluslararası düzeyde benimsenmiş tanımı ise: Genetik olarak üstün ağaçlardan oluşan ve genetik açıdan istenmeyen polen kaynaklarından izole edilmiş, sık, bol ve kolay tohum elde edilen, özel bakım ve işletmeye tabi tutulan plantasyonlardır (Zobel vd. 1958, Ürgenç 1982, Zobel ve McElwee 1964, Di-Giovanni ve Kevan 1991, El-Kassaby vd.1989).

Tohum bahçeleri: a-) Belirli genetik özellikleri taşıyan ağaçları verecek tohumları elde etmek, b-) Genetik özellikleri sayesinde belirli bölgelere adapte olabilen ağaçları elde etmek ve c-) a ve b maddelerinde belirtilen ağaçları verecek olan genetik bakımdan üstün nitelikli tohumları daha çok miktarda ve daha ekonomik olarak elde etmek için kurulurlar. Orman popülasyonlarının genetik yapısını istenilen yönde değiştirmek ve doğadaki popülasyonları amacımıza göre evcilleştirmek (domestication) konusunda, tohum bahçeleri ağaç ıslahçısının elinde çok önemli bir araçtır.

Bu şekilde, istediğimiz genleri taşıyan bireyler tohum bahçesinde bir araya getirilir; ve bunlar arasına arzu edilmeyen genlerin karışması da engellenerek özel bir gen havuzu oluşturulur. Bunlardan üretilen tohumlarla istediğimiz özellikleri taşıyan yeni generasyonlar yetiştirilebilir.

1.2. Tohum Bahçelerine Neden İhtiyaç Duyulur?

Dünyada ve Türkiye'de nüfus hızla artmakta, sanayi gelişmekte ve hayat standardı gittikçe yükselmektedir. Bunlara paralel olarak odun hammaddesine olan talep de hızla artmaktadır. Öte yandan doğal orman alanlarımız yanlış ve bilinçsiz kullanım sonucu hızla

azalmakta; ve ormanlarımız, milletimizin odun hammaddesi talebini karşılayamayacak bir düzeye inmiş bulunmaktadır.

Türkiye’de 1999 yılında toplam odun tüketimi (endüstriyel odun + yakacak odun) yaklaşık 24,5 milyon m³ kadar olmuştur. Toplam odun hammaddesi arzının 13 milyon m³’ü (%53) doğal ormanlarımızdan, 10,5 milyon m³’ü (%43) özel sektörden ve bir milyon m³’ü de (%4) ithalat yolu ile sağlanmıştır. Kişi başına düşen odun tüketimi 1999 yılında 0,387 m³’dür. Nüfusumuzun, 2020 yılına gelindiğinde 104 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Odun hammaddesi üretiminin 2020 yılında 22,5 milyon m³, talebinin ise 40,3 milyon m³/yıl düzeyinde olacağı belirtilmektedir. Bu durumda 2020 yılında odun hammaddeleri açığı yaklaşık 17,8 milyon m³/yıl olacaktır (Anonim 2001b).

İşte, halen yaşadığımız ve gelecek yıllarda artacak olan talep açığını kapatmak, hiç olmazsa biraz azaltmak için orman alanları genetik bakımdan üstün özellikli (yüksek verimli ve hızlı büyüyen) tür ve ırklar ile ağaçlandırılmalıdır.

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), üç milyon hektarı aşan yayılış alanı ile, ülkemiz ormanlarında en geniş alanı kaplayan yerli bir ağaç türümüzdür. Türkiye ibrelili orman alanlarının yaklaşık %36’sı (3.096.064 ha) kızılçam ile kaplıdır (Anonim 1980). Kızılçamın verimli ve geniş ormanlar oluşturduğu bölgelerimizden biri de Antalya havzasıdır.

Kızılçam türü üzerinde bu güne kadar yapılan araştırma sonuçları; onun hızlı gelişen bir tür olduğunu göstermektedir (Alemdağ 1962, Işık 1986, Usta 1991, Erkan 1996). Odununun kullanım alanı da diğer yerli türlerimize göre daha fazladır. Bu nedenle, halen, Güney ve Batı Anadolu bölgelerimizde geniş alanların ağaçlandırılması amacıyla, kızılçam tohum ve/veya fidanları kullanılmaktadır.

Ormancılık ve ağaçlandırma çalışmalarında kullanılmak üzere gerek duyulan üstün özellikli tür ve ırkları elde edebilmek için, genetik bakımdan üstün olan bireyler seçilip bir araya getirilerek tohum bahçeleri kurulur. Gerek tarımda, gerekse ormancılık

literatüründe, tohum bahçelerine ve vejetatif üretme çalışmalarına sıkça rastlanmaktadır. İlk tohum bahçeleri kurma düşüncesi Berlin Akademisi Müdürü olan Friedrich August Ludwing von Burgsdorfun 1787 yılında yazdığı "Yerli ve Yabancı Meşe Türleri" adlı eserinde rastlanmıştır. Yazar bu eserinde her yıl belirli belirsiz yerlerden tohum toplanması yerine, bu iş için ayrılmış ve özel bakıma tabi tutulmuş meşe ormanlarından tohum toplanması gerektiğini önermiştir. Daha sonraları çeşitli yazarlar klonal tohum bahçeleri kurma düşüncesi üzerinde yazılar yazmışlardır. Aşılı fidanlar ile tohum bahçesi kurulması ise, ilk defa 1934 yılında Danimarka'da Syrach Larsen tarafından gerçekleştirilmiştir (Şimşek 1993).

Orman Bakanlığı tarafından ülkemizin değişik bölgelerinde, değişik orman ağaçları için 2001 yılına kadar 163 adet tohum bahçesi kurulmuştur. Bu 163 adet tohum bahçesinden 58 adeti kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) türüne aittir (Anonim 2001a).

1.3. Tohum Bahçelerinin Temel Özellikleri

Tohum bahçeleri oluşturmak için:

- a-) Önce fenotipik seleksiyona (görünüş özelliklerinin seçimine) dayanılarak, istenilen karakterler bakımından arzu edilen özellikte ağaçlar seçilir. Bu ağaçlara "plus ağaç" denir.
- b-) Bu plus ağaçlardan alınan çelikler, ya da bu ağaçların açık veya kontrollü tozlaşma ürünü olan tohumlarından elde edilen fidanlar kullanılarak tohum bahçeleri kurulur. Alınan çelikler ya köklendirilerek ya da ülkemizde yaygın bir şekilde yapıldığı gibi sıradan fidanlara aşılansarak tohum bahçelerine aktarılır. Bu şekilde kurulan tohum bahçeleri "birinci kuşak" tohum bahçeleri adını alır. Bunların arasında, genetik yönden değerli olmayan bireyler de bulunabilir.
- c-) Birinci kuşak tohum bahçelerindeki plus ağaçlar döl denemeleri veya klonal testlere tabi tutulur ve bu yolla her birinin genotipik değerleri saptanır.
- e-) Genotipik değerleri saptanan plus ağaçlar ikinci bir seçime tabi tutulurlar. Genetik bakımdan istenmeyen özellikleri taşıyan klonlar ve bireyler programdan elenir. Geri kalanların genetik üstünlüğü ispat edilmiştir. Bunların her biri "elit ağaç" adını alır.

f-) Bu elit ağaçlardan vejetatif olarak üretilen fidanlarla kurulan tohum bahçelerine ise “elit ağaç tohum bahçeleri”, “ikinci kuşak tohum bahçeleri” veya “ileri generasyon tohum bahçeleri” denir. Genetik kazancın en yüksek olduğu tohum bahçeleri elit ağaç tohum bahçeleridir. Böylece tohum bahçelerinden elde edilecek genetik kazancın %30-40’a çıkabileceği ileri sürülmektedir (Işık 1991).

Tohum bahçeleri, potansiyel olarak genetik kazançları yüksek tohum kaynakları olmaları yanı sıra, erken tohum verimi, sık, bol ve kolay tohum toplayabilme imkanları bakımından da önemlidir. Tohum bahçelerinde tohum oluşumu doğal ormanlara göre daha erken başlar ve sık periyotlar ile devam eder (Şimşek 1993). Tohum bahçelerinden bol tohum elde edilmesi tohum bahçesinin kurulduğu yer ile de ilgilidir. Genellikle tohum bahçeleri türün yayılışının en güney sınırı yakınında veya yayılışının daha alt zonlarında tesis edilir. Böylece sıcaklığın artması sonucu tohum verimi de artmaktadır. Ayrıca tohum bahçelerinden elde edilen tohumların çimlenme kabiliyeti de yüksektir (Ürgenç 1982).

Tohum bahçelerinin kurulması zaman, para, beceri ve konu ile ilgili birimlerin işbirliğini gerektirir. Ayrıca tohum bahçesinin kurulması sırasında, bahçenin kurulacağı yerin seçimi, dizaynı, fidanların dikim aralığı ve dikim şekli, bitkilerin korunması ve tohumun hasat edilmesi gibi bir çok faktörün de dikkate alınması zorunludur. Kısacası bir tohum bahçesinin kurulması, bakımı ve işletilmesi zaman, para ve yetişmiş iş gücü gerektirir. Üstelik bu tohum bahçelerinden elde edilen tohumların, genetik bakımdan güvenilir olması oldukça önemlidir (Di-Giovanni ve Kevan 1991).

Geleneksel orman ağacı ıslah programları, ağaçlandırmalarda kullanılmak üzere ıslah edilmiş tohum üretimi için, tipik olarak açık tozlaşan tohum bahçelerine bağımlıdır. Seleksiyon sonucu elde edilecek genetik kazanç hesaplamaları da, tohum bahçesi dışındaki bireylerden polen karışımı olmadığı ve tam panmiksiz (tohum bahçesi içindeki bireylerin birbirleriyle rasgele eşleşmesi) olduğu varsayımlarıyla, ideal açık tozlaşan tohum bahçelerine dayalı olarak yapılır. Eğer tohum bahçelerinde panmiktik şekilde üreme yoksa, beklenen genetik kazancın bir kısmı kaybolacaktır. Açık tozlaşma olan tohum bahçelerinde, genetik kazancın beklenen düzeyde olması için şu koşullar

gerçekleşmelidir: 1) Tohum bahçesi, tohum bahçesini çevreleyen doğal populasyonlardan tamamıyla izole olmalı, 2) Rametler dişi ve erkek çiçekler bakımından eşit üretim yapmalı, 3) Polenlerin yayılma dönemi ile dişi çiçeklerin polen kabul dönemi çakışmalı, 4) Bütün klonlar birbiriyle çaprazlandığında eşit eşleşme uyumuna sahip olmalı, 5) Kendi kendine döllenme veya yakın akrabalar arası bir eşleşme sonucu birey oluşmamalı (Fast vd 1986). Tohum bahçesi dışındaki bireylerden polen kontaminasyonu ve kendi kendine döllenme olayı tohum bahçelerinde tozlaşma ile ilgili potansiyel sorunlar olarak bilinir. Tozlaşmayla ilgili sorun olursa bu şartlardan biri veya bir kaç olumsuz yönde etkilenebilir. Son zamanlarda, tohum bahçelerinde eşleşme sisteminin belirlenmesi ve polen kontaminasyonu oranının tahmin edilmesi üzerine yapılan çalışmalar artmıştır (Adams ve Birkes 1989).

1.4. Eşleşme Sistemi ve Önemi

Bitki populasyonlarında yeni bir bireyi oluşturmak için dişi ve erkek gametlerin bir araya gelme şekilleri, “eşleşme sistemi” olarak adlandırılır. Orman ağacı populasyonlarında eşleşme sistemi kendi-kendine döllenme (selfing) ve kendinden-başka-bireylerle döllenme (outcrossing) şeklindedir. Tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme iki şekilde gerçekleşebilir. Birincisi tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin yine tohum bahçesindeki diğer klonlara ait polenlerle döllenmesi, ikincisi ise tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin tohum bahçesine yakın doğal populasyonlardaki bireylere ait polenlerle döllenmesidir.

Tohum bahçesine, doğal populasyonlardaki bireylerden gelen genlerin (gen göçü) dölleme oranı ile bahçe içindeki bireylerin birbirlerini dölleme oranı, tohum bahçesinde eşleşme sisteminin temel belirleyicileridir. Tohum bahçelerinde eşleşme sisteminin bilinmesi, tohum bahçesinin işletilmesi için önem taşır. Bu bilgiler ıslah edilmemiş polen kaynaklarından polen kontaminasyonunu sınırlandırmak ve tohum bahçesi içindeki bireyler arasındaki eşleşme oranını yükseltmek için kullanılır (Adams ve Birkes 1991). Tohum bahçelerinin, hem genetik olarak kaliteli, hem de bahçedeki klonların genetik çeşitliliğini yansıtan tohumlar üretmesi beklenir. Tohum bahçesinde eşleşme sisteminin üç elementi bu beklentinin gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini belirler. Bunlar: 1) Bahçe

içindeki klonların kendi-kendine dölleme oranı, 2) Bahçe dışındaki doğal ağaçlardan gelen polenler nedeniyle oluşan tohumların oranı, 3) Bahçe içindeki farklı klonların birbirlerini dölleme oranı.

Ayrıca, eşleşme sistemi populasyon içindeki genetik yapıyı ve soy-içi üremenin düzeyini etkiler ve bu nedenle de bitki populasyonlarının genetik yapısının önemli bir belirleyicisidir (Neale ve Adams 1985). Ayrıca, polen göçü (populasyonlar arası gen akımı) hakkındaki bilgiler, ıslah populasyonlarının kontrolü ve etkili gen koruma stratejilerinin geliştirilmesi için de gereklidir (Adams ve Birkes 1991, Burczyk 1996). Doğal populasyonlardaki eşleşme şeklinin bilinmesi, doğal populasyonlardan toplanan tohumların genetik yapısının değerlendirilmesi bakımından önemlidir (Adams 1992).

Genel olarak, orman ağaçlarının doğal populasyonlarında birbirine yakın olan ağaçlar birbirlerinin akrabasıdır. Ormanda tek bir ağaçtan etrafa saçılan tohumların çoğu, kısa mesafelere taşınır. Bu ise doğal populasyonlarda yakın akrabalar arasında eşleşmelere yol açar. Bu akrabalar (ebeveyn ve oğul döl, tam kardeşler ve yarım kardeşler) arasındaki eşleşmeler sonucu orman ağacı türlerinin doğal populasyonlarında önemli derecede soy-içi üreme oluşabilir ve bu soy-içi üreme de eşleşme sisteminin bir parçasıdır (Fast vd. 1986). Her bir kuşakta kendi-kendine dölleme (selfing) (s) ve kendinden-başka-bireylerle dölleme (outcrossing) ($t=1-s$) sonucu oluşan bireylerin oranı eşleşme sistemini tanımlamak için en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir.

Populasyonlar arasındaki ve içindeki genetik çeşitliliğin dağılımı ve etkili populasyon büyüklüğü soy-içi üremenin (inbreeding) düzeyini etkilemektedir. Ayrıca, polen dağılımının şekli, populasyonlar arasındaki gen akımı ve farklı üreme başarısı da soy-içi üremenin düzeyini etkiler (Adams ve Birkes 1991, Burczyk ve Prat 1997). Kendi-kendine dölleme (selfing) tohum bahçelerinde en muhtemel soy-içi üreme seklidir (Fast vd 1986). Kendi-kendine dölleme sonucu oluşan tohumların oranı önemlidir. Çünkü kendi-kendine dölleme, oluşan oğul döllerin yaşama kabiliyetinin düşük olmasına ve tohum sayısının azalmasına yol açar. Çoğu orman ağaçlarının doğal populasyonlarında kendi-kendine döllemeyi takiben hem yaşayabilir nitelikteki tohumların oranının düşük

olması hem de az sayıda tohum oluşması beklenir (Adams vd 1992, Erickson ve Adams 1990). Tohum bahçelerinde ise (özellikle klonal tohum bahçelerinde) aynı klonun rametleri arasındaki eşleşmeler sonucu etkin kendileme nedeniyle, kendi-kendine döllenme oranının doğal populasyonlara göre daha yüksek olması beklenir. Bununla birlikte tohum bahçesindeki klonların sayısının yüksek (örneğin >25) olması, ve ayrıca aynı klonun bahçede konuşlandırılmış rametleri arasındaki fiziksel mesafenin yeteri kadar büyük olması, kendileme ürünü tohumların oranını azaltmaktadır. Genel olarak klonal tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenerek oluşmuş tohum oranının yüksek olduğu bulunmuştur.

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

1.5. Polen Kontaminasyonu

Polen kontaminasyonu yani polen yoluyla genetik kirlenme tohum bahçesi dışındaki düşük genetik özellikli ağaçlardan gelen polenlerin üstün özellikli ağaçlardan oluşan tohum bahçesindeki dişi çiçekleri döllemesidir. Tohum bahçesine, tohum bahçesi kaynaklı olmayan polenlerin karışması yüzünden istenmeyen genotipteki tohumlar oluşabilmekte ve bu tohumlarla kurulan ormanlar genetik bakımdan düşük kaliteli olmaktadır (Wheeler ve Jech 1986). Eğer bir tohum bahçesi istenmeyen özellik gösteren (daha düşük kaliteli) populasyonlara yakın ise polen kirliliği oranı çok daha yüksek olacaktır (Greenwood ve Rucker 1985, Snieszko 1981). Yapılan çalışmalar orman ağacı türlerinin tohum bahçelerinde genetik kirlenme düzeyinin genellikle %30 ila %90 arasında değişen değerlerde olduğunu göstermiştir (Di-Giovanni ve Kevan 1991, Wheeler and Jech 1986, Adams vd 1997).

Eğer tohum bahçesi genetik bakımdan daha düşük kalitede populasyon veya ağaçlandırma alanlarıyla çevrili ise, iki kaynak arasındaki gen havuzu ve dolayısıyla gen frekanslarındaki fark artacağı için polen kirliliğinin sonuçları beklenenden daha şiddetli olacaktır. Örneğin 4. generasyon bir tohum bahçesi 1. generasyondan elde edilen tohumlarla veya ıslah edilmemiş populasyonlardan kurulan plantasyonlarla çevrili ise polen kontaminasyonunun etkisi ilk generasyon tohum bahçelerinde görüldenden daha şiddetli olacaktır (Snieszko 1981).

Polen kontaminasyonu oranını etkileyen faktörler arasında tohum bahçesinin doğal populasyonlardan uzaklığı, bahçenin büyüklüğü, bahçedeki polen üretimi ve yakın doğal populasyonlardaki çiçeklenme ile tohum bahçesindeki çiçeklenmenin aynı zamana gelip gelmemesi vardır (Di-Giovanni vd 1996).

Tohum bahçelerinde polen kontaminasyonu oranını belirlemenin değişik yolları vardır. Bunlar; polen tuzaklarının kurulması, tohum bahçesindeki bireylerin oluşturduğu erkek çiçeklerin kesilmesi (emaskülasyon) yönteminin uygulanması ve genetik markırların kullanılmasıdır. Polen tuzakları ve emaskülasyon yöntemlerinin genetik markırlara göre bazı dezavantajları vardır. Bu nedenle polen göçü ve genetik kontaminasyonun derecesinin belirlenmesinde genetik markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Friedman ve Adams 1985, Smith ve Adams 1983, El-Kassaby vd. 1989, Nagasaka ve Szmidt 1985, Harju ve Muona, 1989).

Bitki türlerinin doğal populasyonları ve tohum bahçelerinde eşleşme sisteminin incelenmesinde de genetik markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Greenwood ve Rucker 1985, Lowe ve Wheeler 1993). Başlangıçta bu amaçla monoterpenler kullanılmıştır. Daha sonraları kullanılmaya başlanan elektroforetik metotlar polen kontaminasyonunu ve eşleşme sistemini belirlemek için daha çok tercih edilmiştir. Elektroforetik bir yöntem olan izoenzimler sayesinde polen kontaminasyonu ve eşleşme sisteminin doğrudan belirlenebilmesi 1980'lerin başında mümkün hale gelmiştir (Smith ve Adams 1983).

1.6. Eşleşme Sisteminin ve Polen Kontaminasyonunun Belirlenmesinde İzoenzim Analizlerinin Yeri

İzoenzim analizleriyle eşleşme sisteminin belirlenmesi için çalışılan izoenzimler bakımından anne ağaçların genotipinin bilinmesi gerekmektedir. Genotipi bilinen bir anne ağacın farklı tohumlarında (oğul dölllerinde) çalışılan lokuslardaki allelerin ayrılımına dayalı olarak eşleşme sistemi parametreleri belirlenir. Öncelikle kendi kendine dölleme yoluyla oluşan canlı bireylerin oranının belirlenmesi gerekir. Tek bir lokus bakımından ve birden fazla lokusa dayalı olarak belirlenen oğul döl genotipleri kullanılarak bir çok eşleşme sistemi tahmin yöntemi geliştirilmiştir. Fakat bunların hepsi aynı basit modele dayanarak yapılır. Bu model "karışık eşleşme modeli" dir. Bu model, eşleşmeyi iki bileşene ayırır: Rasgele eşleşme ve kendi kendine dölleme (Helgason ve Ennos 1991). Bu model şu varsayımlar üzerine kurulur: a) Her eşleşme olayı rasgele kendinden-başka-bireylerle dölleme (t) veya kendi-kendine dölleme ($s=1-t$) sonucudur ve bütün embriyolar eşit uyuma sahiptir, b) Polen havuzundaki allellerin frekansı anne ebeveyn bitkilerin tümününkiyle benzerdir, c) Bir kendinden-başka-bireylerle döllemenin meydana gelme olasılığı anne ebeveyn genotipinden bağımsızdır. Sonuçlar genellikle tahmin edilen kendinden-başka-bireylerle dölleme oranı (t) terimiyle bildirilir. Yukarıdaki modele dayanarak, kendinden-başka-bireylerle dölleme (outcrossing) sonucu oluşmuş bireylerin oranını hesaplamak için Shaw ve vd (1981) tarafından tanımlanan çok-lokusa dayanan tahmin kullanıldı. Çok-lokusa dayanan tahmin yöntemi, kendinden-başka-bireylerle dölleme oranının tahminini yapmak için birden fazla lokusdan elde edilen bilgileri kombine etmektedir. Bir tohum bahçesinde çok sayıda klon olması (örneğin >25) ve bahçenin desenlenmesi sırasında aynı klonun rametlerinin belirli aralıklarla yerleştirilmesi, genel olarak kendileme ürünü tohumların oranını azaltmada etkili olmaktadır. Ortalama olarak klonal tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle dölleme sonucu oluşmuş tohumların bireylerin oranının yüksek olduğu (> %90) bulunmuştur (Adams ve Birkes 1989).

İzoenzim analizleriyle polen kontaminasyonu düzeyinin belirlenmesinde, incelenen izoenzimler bakımından tohum bahçesi içindeki klonların ve tohum bahçesi etrafındaki

doğal populasyonlardaki ağaçların genotipi belirlenerek her iki kaynaktaki allellerin varlığı/yokluğu ve frekansları esas alınır. İlk aşamada, mümkün olduğu kadar çok lokusta (genellikle 8 veya daha fazla) tohum bahçesinde dikili bulunan bütün bireylerin (anne-baba bireylerin) genotipi saptanır. İkinci olarak, tohum bahçesindeki bireyler üzerinde oluşan belirli sayıda tohumun embriyolarının çalışılan bütün lokuslar bakımından genotipleri belirlenir. Üçüncü aşamada, ebeveynlerin (anne-baba bireylerin) genotipleri ile karşılaştırılır. Burada amaç bir tohumun tohum bahçesi içindeki bireylerden üretilip üretilmediğini belirlemektir. Eğer bir tohumun embriyosunun genotipinde tohum bahçesi içinde bulunmayan bir allel tespit edilmiş ise o zaman bu tohum açıkça bir yabancı polen (yabancı baba) (kontaminasyon) ürünüdür. Bu bilgiye dayanarak kontaminasyonun minimum tahmini yapılır.

Gerçek kontaminasyon oranını belirleyebilmek için, çalışılan lokuslar bakımından, tohum bahçesi gen havuzundeki allellerin frekanslarıyla yakın doğal populasyonların gen havuzundaki allellerin frekanslarının da karşılaştırılması gerekir. Çünkü tohum bahçesi dışında bulunan allellerin çoğu tohum bahçesi içinde de üretilir. Yani tohum bahçesi dışından gelen bir allel zaten tohum bahçesi içindeki bireylerin genotipinde de bulunabilir. Fakat aynı allelin tohum bahçesi içindeki ve tohum bahçesi dışındaki komşu populasyonlarda frekansı farklı olabilir. Bu durumda tohum bahçesine farklı bir allelin girişi söz konusu değildir, fakat dışarıdan gelen alleller o allelin tohum bahçesindeki frekansını değiştirdiğinden bu da bir genetik kontaminasyon olarak değerlendirilir. Tohum bahçesinden elde edilen tohumlarda tohum bahçesinde bulunmayan farklı bir allele rastlanırsa, ve ayrıca hem tohum bahçesi hem de yakın doğal populasyondaki ortak allellerin frekansındaki farklılıklar bilinirse gerçek kontaminasyon düzeyi tahmin edilebilir. Bu nedenle bir çok tohum bahçesinde gerçek kontaminasyon düzeyinin, minimum tahminin muhtemelen iki katı olduğu ileri sürülmektedir (Harju ve Muona 1989).

Polen kontaminasyonu ve eşleşme şekillerinin incelenebilmesi için iğne yapraklı (konifer) ağaç türleri model organizma olarak kabul edilirler. Çünkü izoenzim çalışmalarında koniferlerin yüksek düzeyde genetik çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca embriyoya katkıda bulunan anasal ve babasal gametlerin genotipleri ayrı ayrı saptanabilmektedir (Burczyk 1996).

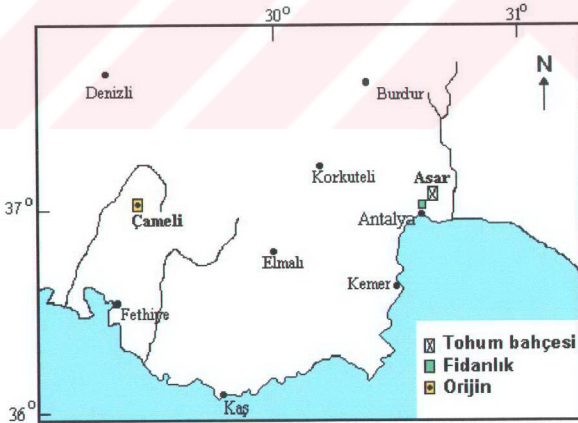
1.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışma ile, kızılçamın Asar (Antalya) mevkiindeki klonal tohum bahçesinde ve bu tohum bahçesinin yakın çevresinde yer alan iki doğal kızılçam populasyonunda izoenzim analizleri yapılmıştır. Çalışmanın amacı: 1) Çalışılan enzim sistemlerinin hem megagametofit (endosperm, n kromozomlu) hem de embriyo dokudaki (2n kromozomlu) bantlaşma yapılarının belirlenmesi, 2) Tohum bahçesindeki klonların çalışılan lokuslar bakımından genetik kimliklerinin belirlenmesi, 3) Tohum bahçesindeki eşleşme sisteminin incelenmesi, 4) Tohum bahçesinde polen kontaminasyonu düzeyinin belirlenmesidir. Bu çalışma, Türkiye'deki konifer orman ağacı türlerinin tohum bahçelerinde genetik kontaminasyonun düzeyi ve eşleşme şekilleri konusunda yapılan ilk çalışma olmaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Tohum Bahçesinin Özellikleri

Araştırma için seçilen tohum bahçesi (Asar-Antalya), Antalya'da kızılçam türüne ait olan 11 tohum bahçesinden birisidir (Şekil 2.1). Tohum Bahçesi Orman bakanlığının Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü tarafından 1986 yılında kurulmuştur. Bu tohum bahçesinin orijini, Denizli il sınırları içinde yer alan Çameli-Göldağı'dır. Başka bir deyişle, tohum bahçesini oluşturan klonların aşı çelikleri Çameli-Göldağı'daki doğal popülasyondaki plus ağaçlardan alınmıştır. Aşı çelikleri alındığı zaman Çameli-Göldağı popülasyonunun ortalama yaşı 80, ortalama boyu 20 m ve ortalama çapı 30 cm bulunmuştur. Göldağı popülasyonu deniz seviyesinden 800 m yükseklikte yer almaktadır. Belirli karakterler bakımından (boy, gövde çapı, odun kalitesi gibi) bu popülasyonda iyi görünüşlü (fenotipi iyi) olan 28 ayrı ağaçtan (ortet) 1985 yılında aşı kalemleri alınmıştır. Aynı ortetten alınan aşı kalemleri genotip olarak tıpatıp aynıdır ve bunlar kendi aralarında belirli bir klonu oluştururlar. Aşı kalemleri aynı yıl Antalya Orman



Şekil 2.1: Tohum bahçesinin ve bahçedeki klonların orijininin yeri

Fidanlığı'nda uygun altlıklara aşılanmış ve aşılı fidanlar bir yıl bakım ve gözlem altında tutulmuştur. Fidanlar 1986 yılı Şubat ayında Asar-Antalya'daki tohum bahçesi alanına götürülmüş ve önceden belirlenen dikim planına göre 8 m x 8 m aralıklarla dikilmişlerdir (Ek-1).

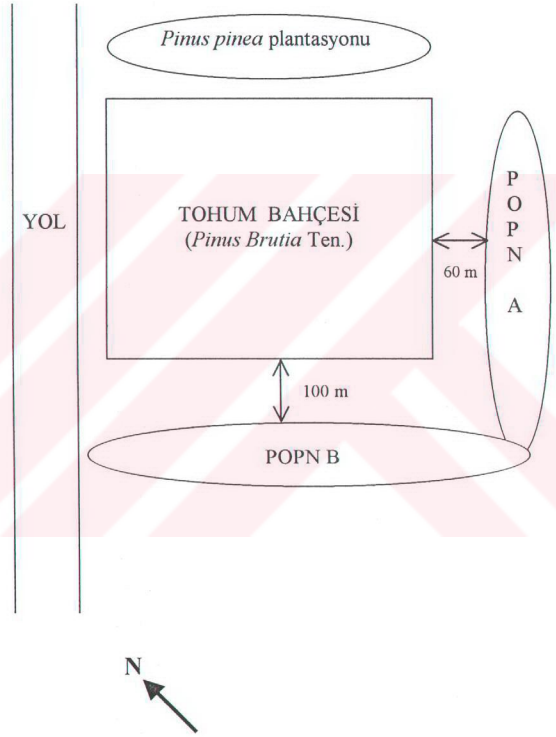
Tohum bahçesi, Antalya şehir merkezinden 19 km uzaklıkta ve denizden 240 m yüksekliktedir. GPS (küresel konum belirleme) aleti ile yapılan ölçümlere göre yeri, 37° 01' 30"N kuzey enlemi ile 30° 43' 30"E doğu boylamı arasındadır.

Orman Bakanlığının ilgili birimi tarafından 1982 yılında yapılan analizler, tohum bahçesi alanındaki arazi yapısının traverten olduğunu göstermiştir. Arazi hazırlığı sırasında ripperle toprak işlemesi yapılarak traverten yapı bozulmuş ve çok taşlı bir yapı ortaya çıkmıştır. Toprak özellikleri bakımından, toprak derinliği orta derinliktedir. Toprak tipi "kırmızı Akdeniz toprağı" (Terra-rosa) olup, bileşimi killi balçık, kil yapısındadır.

Tohum bahçesi, 11.2 ha.lık bir alan üzerinde, 28 klonun her birine ait, ortalama 60 birey (ramet) dikilerek kurulmuştur. Aynı ortete ait rametler belirli bir klonu oluşturur. Başka bir deyişle, bahçede 28 klon, her klona ait yaklaşık 60 birey dikilmiştir. Halen bahçe üzerinde 1653 ağaç yaşamaktadır. Bugün (2001 yılında) 15 yaşında olan bahçeden, fidan yetiştirmek amacıyla yedi yaşımdan itibaren kozalak (ve tohum) toplanmaya başlanmıştır. Tohum bahçesinin kuzey batısı boyunca bir yol uzanmaktadır. Kuzey doğusunda *Pinus pinea* plantasyonu yer alır. Güney batısında, bahçeden 100 m uzaklıkta bir doğal kızılçam popülasyonu (Popülasyon B), güney doğusunda ise bahçeden 60 m uzaklıkta bir doğal kızılçam popülasyonu (Popülasyon A) bulunmaktadır (Şekil 2.2).

2.2. Analizler için Tohum Toplanması

Tohum bahçesi yerleşim planında bahçedeki 28 klonun her birinden üç ramet olmak üzere toplam 84 ağaç rastlantısal olarak belirlenmiş ve bu 84 ağaç tohum bahçesi yerleşim planında işaretlenmiştir. Tohum bahçesi içerisinde seçilen ağaçların yerleri Ek-



Şekil 2.2: Tohum bahçesinin genel krokisi (ölçeğe göre değildir)

1'deki tohum bahçesine ait kroki üzerinde ayrıca gösterilmiştir. Nisan 1997'de tohum bahçesindeki bu 84 ağaçtan o yıl olgunlaşan kozalaklar (1997 yılına ait) toplanmıştır. Ayrıca, 1998 yılında tohum bahçesinin güney doğusundaki ve güney batısı iki doğal kızılçam popülasyonunun, sırasıyla popülasyon A ve popülasyon B, her birinden de yaklaşık 30'ar ağaçtan o yıl olgunlaşan kozalaklar (1998 yılına ait) toplanmıştır. Her bir ağaca ait kozalaklar ayrı ayrı torbalara konmuş ve torbaların üzerlerine ağacın kimliğini belirten bir etiket yapıştırılmıştır.

Her bir ağaca ait kozalaklar, tohumların çıkarılması işleminde ayrı ayrı file şeklindeki torbalara aktarılmıştır. Fileler kozalaklar açılıp tohumlar serbest kaldığında tohumlar dökülmeyecek, file içinde kalacak şekilde gözeneklere sahiptir. Filelerin içerisine kozalaklar konduktan sonra, fileler düz bir zemine yayılarak, doğal koşullarda, güneş ısısında kozalakların açılması ve fileler elle sallanarak tohumların serbest kalması sağlanmıştır. Çıkarılan tohumlar tekrar ayrı ayrı torbalara konulmuş ve her birinin üzerine tohumların kimliklerini (Popülasyon kodu, anaç kodu, ramet kodu) belirten etiketler yapıştırılmıştır. Tohumlar analizlere başlanıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

2.3. Elektroforetik Metotlar

Elektroforetik analizler, çimlenmiş tohumun megagametofitik (endosperm, n kromozomlu) ve embriyo (2n kromozomlu) dokusunda gerçekleştirilmiştir. Çimlendirme işlemi için her bir ağaca ait tohumlar, önce %1'lik H₂O₂ (Hidrojen peroksit) ile bir gece ıslatılmış; sonra da birbirine değmeyecek şekilde, içerisine Whatman kağıdı konmuş petri kaplarına dizilmiştir. Nemliliği sağlamak için petri kaplarının içerisine başlangıçta 10 ml distile su ilave edilmiştir. Petri kapları günlük 12 saat aydınlatma ve 24 °C sıcaklıktaki iklim odasına yerleştirilmiştir (Kara 1996, Krugman vd 1974). Petri kaplarının içerisindeki Whatman kağıtlarının nemliliğini korumak için daha sonra gerek duyuldukça distile su ilavesi yapılmıştır. Yaklaşık 8-10 günde tohumlar çimlenmeye başlamıştır. Çalışılan enzimler, radikulası 3-5 mm olan çimlenmiş tohumlara ait dokularda en iyi bantlaşmaları verdiği için analizlerde, radikulası 3-5 mm'yi geçmeyen tohumlar

kullanılmıştır. Radikula kısmının fazla büyümemesi için, çimlenen tohumlar, analizler yapılıncaya kadar +4°C'de tutulmuştur. Analizler için yeteri kadar tohum çimlendikten sonra testa bir bistüri yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Tohumun megagametofit ve embriyo dokusu yine bir bistüri yardımıyla birbirinden ayrılmıştır. Her bir deneme seti için 16 tohumun megagametofiti ve embriyosu bu şekilde birbirinden ayrılmıştır. Bu dokular, üzerinde 0.5 cm çapında ve 1 cm derinliğinde, 96 adet kuyucuk bulunan ekstraksiyon kabında ayrı ayrı kuyucuklara konmuş ve her bir kuyucuktaki doku üzerine 75 ml ekstraksiyon tamponu (buffer) ilave edilmiştir.

Ekstraksiyon tamponu:

0.2 M Fosfat tamponu pH:7.5	5 ml
Triton X-100	10 µl
2-Merkaptoetanol	10 µl
Bovın Serum Albümin	4 mg

Bu şekilde hazırlanan örnekler ya hemen cam bir çubuk (baget) yardımıyla ekstrakte edilerek analizlerde kullanılmış ya da -80 °C'de dondurularak daha sonraki günlerde kullanılmıştır.

Elde edilen özütler Nişasta Jel Elektroforezi tekniği kullanılarak 9 enzim sistemi tarafından belirlenen 14 lokus için analiz edilmiştir (Çizelge 2.1). Seçilen lokuslar tohumun hem megagametofitik hem de embriyo dokusunda net bantlar verip vermemesine göre seçilmiş ve net bantlar verenler değerlendirilmiştir. Jellerin hazırlanması ve elektroforez işleminin yapılmasında bazı küçük modifikasyonlarla Conkle vd (1982) metodu kullanılmıştır (Kara 1996).

Çalışılan enzim sistemlerine uygun olarak pH'ları 6.1 ile 8.8 arasında değişen dört farklı jel ve elektrot tamponu kullanılmıştır. Hangi enzimler için hangi jel ve elektrot tampon sisteminin kullanıldığı Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1: Çalışılan enzimler hakkında bilgiler

No	Enzimin Adı	Kodu	E.C. No*	Tampon Sistemi	Gözlenen Lokus Sayısı#	Belirlenen Lokus Sayısı♣
1	Akonitaz	Aco	4.2.1.3	MC _{8.1}	1	1
2	Alkol dehidrogenaz	Adh	1.1.1.1	TBE	2	1
3	Glutamat dehidrogenaz	Gdh	1.4.1.2	TC	1	1
4	Glutamat oksalaasetat transaminaz	Got	2.6.1.1	TC	3	3
5	Malat dehidrogenaz	Mdh	1.1.1.37	MC _{8.1}	4	1
6	Menadion reduktaz	Mnr	1.6.99.2	TBE	2	2
7	6-Fosfoglukonat dehidrogenaz	6pgd	1.1.1.44	MC _{6.1}	2	2
8	Fosfoglukono izomeraz	Pgi	5.3.1.9	MC _{8.1}	2	2
9	Şikimik dehidrogenaz	Sdh	1.1.1.25	MC _{6.1}	2	1

* E.C. No: Enzim Komisyon referans Numarası Enzim sınıflandırması için IUB (International Union of Biochemists) tarafından verilen numara

Çalışılan bireylerde her bir enzim isteminde gözlenen toplam lokus sayısı

♣ Her bir enzim sisteminde gözlenen lokuslardan bantlaşma fenotipleri belirlenebilen lokus sayısı

Çizelge 2.2: Analizler için kullanılan jel ve elektrot tamponlarının içeriği

Tamponun Adı	Elektrot Tamponu	Jel Tamponu	Uygulanan Elektrik Akımı (mA)	Ortalama Süre (Saat)
TBE (Tris-Borat-EDTA)	0.2 M Tris-baz, 0.2 M Borik asit 0.01 M EDTA, 1 ml/L Triton X-100, pH:8.3.	0.02 M Tris-baz 0.02 M Borik asit 0.001 M EDTA pH:8.3	50	3
TC (Tris-Sitrat)	0.05 M Sodyum hidroksit, 0.3 M Borik asit pH:8.0 (4 N Sodyum hidroksit ile ayarlandı.)	0.1 M Tris-baz 2 M Sitrik asit ile pH:8.8'e ayarlandı	55	3
MC _{6,1} (Morfolin-Sitrat)	0.04 M Sitrik asit Morfolin [N-(3-aminopropil)] ile pH:6.1'e ayarlandı, 1 ml/L Triton X-100.	0.002 M Sitrik asit, Morfolin [N-(3-aminopropil)] ile pH:6.1'e ayarlandı.	50	6
MC _{8,1} (Morfolin-Sitrat)	0.04 M Sitrik asit Morfolin [N-(3-aminopropil)] ile pH:8.3'e ayarlandı. 1 ml/L Triton X-100.	0.002 M Sitrik asit, Morfolin [N-(3-aminopropil)] ile pH:8.3'e ayarlandı.	50	4,5

Jelin hazırlanmasında elektrofereze uygun olarak hazırlanmış patates nişastası kullanılmıştır. Nişasta jel, farklı büyüklük ve iyonik kuvvetteki protein moleküllerinin elektrik akımı altında birbirinden ayrılması için, örneklerin uygulandığı bir destek dolgu maddesidir (Feret ve Bergmann 1976, Cheliak ve Pitel. 1984, Stuber vd. 1988, Andrews 1990, Shields vd. 1983). Jeller, % 12.5'luk olarak elektroforezden bir gün önce hazırlanmıştır. Jel tamponunun 1/3'ü nişastayı çözelti haline getirmek için ayrılmıştır. Kalan kısım (2/3) 1000 ml'lik emzikli bir erlen içerisine boşaltılmıştır. Erlen içerisindeki tampon, bir Bunzen Bek (Bunzen Burner) alevi üzerinde 4-5 dakika ısıldıktan sonra vakum pompası yardımı ile ısınan tamponun havası uzaklaştırılmış ve 1-2 dakika daha ısıtmaya devam edilmiştir. Bu arada jel tamponunun ayrılan kısmı, nişastanın üzerine boşaltılmış ve bir cam çubuk ile iyice karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. Nişasta çözüldükten sonra, ısınan tampon ile karıştırılmış ve berraklaşınca kadar Bunzen Bek alevi üzerinde karıştırılarak kaynatıldı. Kaynatma sırasında oluşan hava kabarcıkları tekrar vakum pompası yardımı ile uzaklaştırıldı. Bu işlem her bir deneme seti için yaklaşık 10-15 dakika sürdü. Hazırlanan jeller, cam plakalar üzerine sabitleştirilmiş 15x19x0.7 cm ebatlarında pleksiglas çerçeveler içerisine boşaltılarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Her bir jelin üzeri, donduktan sonra kurumaması için streç film ile kapatıldı ve gece boyunca oda sıcaklığında tutuldu. Ertesi sabah jeller, elektroforez işlemi uygulanmaya başlanılmasından bir saat önce +4 °C'ye alındı.

Elektroforez için, pleksiglastan yapılmış elektroforez tankları ve Consort marka, E-132 model (azami 500 V, 50 W ve 100 mA) güç kaynağı kullanılmıştır. Özütlemeden hemen sonra, bir gün önceden hazırlanan ve elektroforezden bir saat önce +4 °C'ye taşınan jel, bir buz kabı üzerine alınmıştır. Jel, katodal kısımdan anodal kısma doğru yaklaşık 3 cm öteden bir bistüri ile kesilmiştir. Jelin kesilen iki parçası birbirinden ayrılmıştır. Özütleme kabında her bir kuyucuktaki özütlr 0.3x1 cm ebatlarında kesilmiş Whatman No:3 kromotografi kağıtlarına emdirilmiştir. Emdirilen Whatman kağıtları jelin kesilen kısmına uygulanmıştır. Elektroforezin ne zaman sonlandırılacağına karar verebilmek için %0.1'lik Brom fenol blue emdirilmiş iki Whatman kağıdı da jele yerleştirilmiştir (Brom fenol blue molekül ağırlığı oldukça küçük mavi renkli bir boyadır. Brom fenol blue hem molekül ağırlığının küçük olması hem de renkli olmasından dolayı

jelde izlenmesi kolaydır. Bu nedenle de elektroforetik çalışmalarda markır boya olarak kullanılır). Örnekler, Whatman kağıdı aracılığı ile jele uygulandıktan sonra jelin her iki parçası tekrar birleştirilmiş ve jelin iki parçası ince bir sünger bez ile sıkıştırılmıştır. Elektroforez tankına elektrot tamponu konularak, jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel ve elektrot tamponu arasındaki bağlantı sünger bezler ile sağlanmış ve jelin üzeri streç film ile örtülmüştür. Güç kaynağının + ve - çıkışları ile elektroforez tankının + ve - girdileri arasındaki bağlantı sağlanmış ve her bir jele gerekli akım uygulanmıştır (Çizelge 2.2) (Kara 1996). Elektroforez sırasında, jele akım uygulandığında oluşan ısınmadan dolayı enzimlerin aktivitelerini kaybetmemeleri için jellerin altına ve üzerine birer buz paketi konarak elektroforez işlemi yapılmıştır. Markır boya olarak kullanılan Brom Fenol Blue, orijinden 8 cm uzaklığa varınca elektroforez işlemi sonlandırılmıştır.

Elektroforez tamamlandıktan sonra jeller, elektroforez tankından uzaklaştırılmış ve bir misina yardımıyla yatay yönde dilimlere ayrılmıştır. Her zaman en üstteki dilim atıldı ve geri kalan jel dilimlerinin her biri boyama için ayrı cam kaplara alınmıştır. Boyama işleminde enzimlere özgü maddeler (substrat + boya) kullanılmıştır. Enzim, kendisine özgül madde ile reaksiyona girip ürüne dönüştürdüğünde, ürün ortamdaki renkli madde ile bağlanmış ve böylece enzimin bulunduğu bölgeler jel üzerinde renkli bantlar olarak görünmüştür.

Got enzimi dışındaki diğer enzim sistemlerinde, boya maddeleri boyama işleminden hemen önce, boyama tamponuna katılmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra cam kap içerisindeki jelin üzerine boşaltılarak 37 °C'de, karanlıkta boyanmaya bırakılmıştır. Adh enziminde substrat olarak kullanılan etanolün buharlaşarak uzaklaşmaması için cam kap bir streç film ile örtülmüştür.

Got enzimi için, boya maddelerinin ilk üçü boyamadan 5-10 dakika önce boyama tamponuna eklenmiş ve boyamadan hemen önce Fast Blue BB salt çözeltisi ilave edilerek jelin üzerine boşaltılmıştır. Jel oda sıcaklığında karanlıkta boyanmaya bırakılmıştır. Boya tamponlarının içeriği Çizelge 2.3 'de, enzimlerin boyama tamponu ve boya maddeleri

Çizelge 2.3: Jellerin boyanmasında kullanılan boya tamponlarının içeriği

Tampon	PH	İçerik
0.2 M Fosfat tamponu	7.5	Sodyum fosfat monobazik 3.84 g Sodyum fosfat dibazik 23.86 g Distile su 1.0 L
0.1 M Tris-HCl tamponu*	7.0	Trizma baz 16.0 g Trizma hidroklorid 137.4 g Distile su 1.0 L
0.1 M Tris-HCl tamponu*	8.3	Trizma baz 74.0 g Trizma hidroklorid 61.4 g Distile su 1.0 L

* Bu çözeltiler Çizelge 2.4'deki konsantrasyonlara seyreltilir.

Çizelge 2.4'de gösterilmiştir. Boyamadan sonra bütün enzimlere ait jeller, musluk suyu altında yıkanmıştır.

Jellerin boyanması işleminden sonra, jelde görünen bantların, örneklerin uygulanma noktasından itibaren (orijin) ne kadar mesafe (cm) uzakta olduğu ölçülmüştür. Markır boya olarak kullanılan Brom Fenol Blue her bir jelde orijinden 8 cm uzaklığa varınca elektroforez işlemi sonlandırıldığı için, alleller doğrudan mobilitelerine göre bir birinden ayrılmış ve her bir allele daha önceki çalışmalarda verilen numaralara da sadık kalınarak numara verilmiştir. Eğer daha önceki çalışmalardan farklı relatif mobiliteye sahip bir bant gözlenmişse bu allele yeni bir numara verilmiştir. Böylece her bir jeldeki bantlaşma fenotipleri belirlenmiştir.

Çizelge 2.4: Çalışılan enzimlerin boyama tamponu ve boya maddeleri

Enzim	Boyama taponu	Boya maddeleri
Aco	0.2 M Tris-HCl, pH:8.3	Cis-akotininik asit 150.0 mg
		%1'lik MgCl ₂ 1.0 ml
		NADP 10.0 mg
		NBT 10.0 mg
		PMS 5.0 mg
Adh	0.05 M Tris-HCl, pH:8.3	%95'lik Etil alkol 2.0 ml
		NAD 10.0 mg
		NBT 10.0 mg
		PMS 5.0 mg
Gdh	0.05 M Tris-HCl, pH:8.3	1 M L-Glutamik asit 2.0 ml
		0.1 M CaCl ₂ 2.0 ml
		NAD 10.0 mg
		NBT 10.0 mg
		PMS 5.0 mg
Got	0.2 M Fosfat, pH:7.5	%0.5'lik Pridoksal fosfat 1.6 ml
		0.2 M Aspartik asit, pH:7.5 13.6 ml
		α -ketoglutarat 2.0 ml
		Fast blue BB salt 225mg/15 ml
Mdh	0.05 M Tris-HCl, pH:8.3	1 M Malik asit, pH:7.5 2.0 ml
		NAD 10.0 mg
		NBT 10.0 mg
		PMS 5.0 mg

Devamı arkada

Çizelge 2.4'ün devamı

Mnr	0.05 M Tris-HCl, pH:7.0	Menadion	20.0 mg
		NADH	25.0 mg
		NBT	10.0 mg
Pgd	0.05 M Tris-HCl, pH:8.3	6-fosfoglukonik asit	50.0 mg
		NADP	10.0 mg
		NBT	10.0 mg
		PMS	5.0 mg
Pgi	0.05 M Tris-HCl, pH:8.3	D-fruktoz-6-fosfat	40.0 mg
		%1'lik MgCl ₂	2.0 ml
		G6PDH	20.0 U
		NADP	10.0 mg
		NBT	10.0 mg
		PMS	5.0 mg
Sdh	0.1 M Tris-HCl, pH:8.3	Şikimik asit	200.0 mg
		NADP	10.0 mg
		NBT	10.0 mg
		PMS	5.0 mg

Fenotipler belirlendikten sonra bazı jeller, ya sabitleştirme solusyonun içinde ya da kurutularak saklanmıştır. Kurutma işlemi için %25'lik gliserin ve naylon filmler kullanılmıştır. Jelden biraz daha büyük kesilmiş iki naylon film %25'lik gliserin içerisinde yumuşatılmıştır. Gliserinli naylon filmin bir katı bir cam tabakası üzerine yayılmıştır. Üzerine jel yerleştirilmiş ve diğer naylon film ile kapatılmıştır. İki naylon film arasında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilerek üzerine bir kurutma kağıdı konmuş ve kurumaya bırakılmıştır. Bazı jellerin görüntüleri bir tarayıcı (scanner) aracılığı ile doğrudan bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

2.4. Verilerin değerlendirilme Yöntemleri

Çalışılan lokuslar bakımından jelde oluşan bantlaşma şekline göre önce enzimlerin bantlaşma fenotipleri belirlenmiştir. Bu enzim fenotiplerine dayanarak:

- 1- Her bir enzimin kızılcıam türünde kalıtım şekli belirlenmiştir.
- 2- Tohum bahçesindeki 28 klonun, verilen lokuslar açısından, çok-lokuslu allozim genotipleri belirlenmiştir. Bunun için her klondan 3'er ramet ve her rametten de yaklaşık 16 tohumun megagametofit ve embriyo dokusu analiz edilmiştir. Her klondan 3 ramet üzerinde analizler yapmakla aynı zamanda aynı klona ait olduğu varsayılan rametlerin de, gerçekten aynı klondan olup olmadığı (yani aynı genotipe sahip olup olmadığı) belirlenmeye çalışılmıştır. Her bir ramet (ağaç) için yaklaşık 16 megagametofitin allozim dağılımından, 11 lokus için, bahçedeki 28 klonun genotipleri belirlenmiştir. Bir bireyin genotipinin yanlış tesbit edilme olasılığı, o bireyden sadece 7 megagametofit analiz edildiğinde bile, %2'den (0.02^7) daha azdır [$P: (1/2)^{n-1}$, n: her bir ağaçtan örneklenen megagametofitlerin sayısıdır.]. Çünkü megagametofit doku koniferlerde haploiddir ve tohum oluşumuna katkıda bulunan anneye ait gamet ile genetik olarak aynıdır.
- 3- Tohum bahçesinden, Populasyon A'dan ve Populasyon B'den örneklenen her bir birey üzerinde yapılan analizler sonucu, verilen lokuslar için, hangi allellerin mevcut olduğu ve her bir lokustaki alel frekansları belirlenmiştir. Tohum

bahçesinin, Populasyon A'nın ve Populasyon B'nin genetik çeşitliliğine ait parametreler (polimorfizm düzeyi, ortalama allel sayısı ve gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeyleri) hesaplanmıştır. Bu parametreleri hesaplayabilmek için BIOSYS-2 programı kullanılmıştır (Black 1997). Böylece tohum bahçesinin, Populasyon A'nın ve Populasyon B'nin gen havuzu ve genetik çeşitliliği hakkında bilgiler edinilmiştir.

- 4- Tohum bahçesi içindeki bir ağaca gelen polenlerin gametik çok-lokuslu genotipleri, o bireyin tohumlarında megagametofit ve embriyo dokunun ardışık olarak analizi ile belirlenmiştir. Megagametofit doku embriyo oluşumuna katkıda bulunan anasal gametin genotipini yansıtır. Böylece her bir lokus için megagametofit dokudaki bant ile, o megagametofit dokusuna karşılık gelen embriyo dokusundan elde edilen bant karşılaştırılarak, embriyo oluşumuna katkıda bulunan polen gametinin genotipi belirlenmiştir. Tohum bahçesinden örneklenen 84 bireyin her birinden rastgele seçilen yaklaşık 16 tohumda (toplam olarak yaklaşık 1400 tohum) polen gametlerinin genotipi belirlenmiştir.

Polen kontaminasyonu oranının tahmini için yukarıda 2., 3. ve 4. maddelerde elde edilen bilgiler kullanılmıştır. Çünkü polen kontaminasyonu oranının belirlenebilmesi için, ilgilenilen tohum bahçesindeki bütün klonların genotipinin, çalışılan lokuslar bakımından bilinmesi gerekir. Tohum bahçesi içerisindeki bireyler tarafından oluşturulan tohumların embriyolarına katkıda bulunan polen gametlerinin genotipi bilinmelidir. Ayrıca tohum bahçesi civarındaki doğal populasyonlarda, çalışılan enzimlerin allel frekanslarının bilinmesi gerekir. Polen kontaminasyonu tahmini için geliştirilen model tohum bahçesindeki olası tüm çok-lokuslu polen genotipleriyle analiz edilen her bir embriyonun oluşumuna katkıda bulunan çok-lokuslu polen genotipinin karşılaştırılmasına dayanır. Tohum bahçesi tarafından üretilmeyen bütün polen gametleri belirlenebilir kontaminantlardır (b). Belirlenebilir kontaminantların oranı polen kontaminasyonunun “minimum tahmini”dir. Bunun “minimum” tahmin olmasının nedeni, bazı kontaminantların muhtemel olarak tohum bahçesi klonları tarafından üretilenlerinkinden ayırt edilemeyen çok-lokuslu genotiplere sahip olmasındandır. Gerçek polen kontaminasyonu oranını (m) gözlenen kontaminantların oranının (b), doğal

populasyondaki bir polen taneciğinin belirlenebilir bir çok-lokuslu marker genotipi taşıyabilme olasılığına (d) bölünmesiyle hesaplanır (Smith ve Adams 1983).

$$m=b/d$$

m: Gerçek polen kontaminasyonu oranı

b: Gözlenen kontaminantların oranı

d: Doğal populasyondaki bir polen taneciğinin belirlenebilir bir çok-lokuslu marker genotipi taşıyabilme olasılığı

Polen kontaminasyonu ile ilgili olan parametrelerin hesaplanmasında Turbo BASIC'de yazılan bir bilgisayar programı olan GENFLOW kullanılmıştır (Adams ve Burczyk 1993).

Eşleşme sistemine ait parametrelerin belirlenebilmesi için, annenin genotipinin ve anneye ait genotipik frekansların tahmini, yabancı polen havuzundaki allel frekansları ve kendi-kendine döllenme ve dışarıdan döllenme sonucu oluşan oğul döllerin oranının belirlenmesi gerekmektedir (Shaw ve Allard 1982). Shaw vd 1981'de karışık eşleşme modeline (Mixed-Mating) dayanarak s ve t tahmini yapmıştır. Çok-lokus metodu kendi-kendine döllenler ile kendinden-başka-bireylerle döllenler arasında doğrudan bir ayrım yapar. Tohum bahçesinin eşleşme sistemiyle ilgili parametreler, Ritland (1998) tarafından yazılan ve maximum likelihood prosedürüne dayanan "Multi Locus Mating System Programı" (MLTR) kullanılarak hesaplanmıştır.

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

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

$$G_n = G - G_a$$

Burada;

G_a = Kontaminasyon olması halinde, beklenen genetik kazançtaki azalma,

G_n = Net genetik kazanç,

G = Kontaminasyon yoksa beklenen genetik kazanç,

m = Polen kontaminasyonu oranı

3. BULGULAR

3.1. Enzim Fenotipleri

Yapılan analizler sonucunda çalışılan her bir enzim sistemi için öncelikle bantlaşma fenotipleri belirlenmiştir. Bantlaşma fenotipleri hem megagametofit hem de embriyo dokuda karşılaştırmalı olarak incelenmiş, böylece her bir enzimin bantlaşma şekli hakkında bilgiler ortaya konmuştur. Her bir enzimin bantlaşma fenotipi aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

Akonitaz (Aco): Akonitaz için boyanan jellerde tek bir zonda aktivite gözlenmiştir. Bu durum, Akonitaz enziminin tek bir lokusunun olduğunu göstermektedir. Aco lokusunda haploid megagametofitik dokudaki bantlar incelendiğinde farklı mobilitelere sahip iki allel gözlenmiştir. Megagametofit dokunun her zaman tek bantlı olduğu görülmüştür. Embriyo dokuda, homozigot bireyler tek bant, heterozigot bireyler ise her iki allelin homozigot olduğu durumdaki mesafede iki bant oluşturmuştur. Bu bantlaşma şekli Akonitaz lokusunun monomerik bir alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Populasyon A ve Populasyon B'de her iki allele de rastlanmıştır. Tohum bahçesinde ise sadece 1. allel gözlenmiştir.

Alkol dehidrogenaz (Adh) enzimi: Alkol dehidrogenaz için boyanan jellerde iki farklı zonda bantlar gözlenmiştir. Bu zonlardan önde olana Adh-1=1. lokus, diğerine Adh-2=2. lokus denmiştir. Adh-1 lokusundaki boyanmanın zayıf olması yüzünden, Adh-1 lokusundaki genotipler belirlenememiştir. Adh-2 lokusunda haploid megagametofitik dokudaki bantlar incelendiğinde farklı mobilitelere sahip iki allel gözlenmiştir. Megagametofit dokunun her zaman tek bantlı olduğu görülmüştür. Embriyo dokuda, homozigot bireyler tek bant, heterozigot bireyler ise üçlü bant (her iki allelin bulunduğu pozisyonda iki bant ve bir de her iki allele ait bantların ortasında bir heterobant) oluşturmuştur (Şekil 3.1, Şekil 3.3). Bu bantlaşma şekli Adh-2 lokusunun dimerik alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Populasyon A'da, Populasyon B'de ve ayrıca tohum bahçesindeki bireylerde her iki allele de rastlanmıştır.

Glutamat dehidrogenaz (Gdh) enzimi: Tek bir zonda bant gözlenmiştir. *Pinus brutia* üzerinde yapılan daha önceki çalışmalarda Gdh enzimine ait 3 farklı allel belirtilmesine rağmen, bu çalışmada sadece 1 no'lu allel gözlenmiştir. (Şekil 3.1, Şekil 3.4). Analiz edilen tohumlardan her hangi birinde (embriyo dokularında) heterozigot bir bireye rastlanılmadığından bu enzimin alt birim yapısı belirlenememiştir. Hem Populasyon A ve Populasyon B'deki bireylerde, ve hem de tohum bahçesindeki bireylerde sadece 1 no'lu allel gözlenmiştir

Glutamat-oksaloasetat-transaminaz (Got) enzimi: Analizler sonucunda üç farklı zonda aktivite gözlenmiştir. Got-1, Got-2 ve Got-3 lokuslarının her birinde ikiye farklı allel gözlenmiştir. Got-1 ve Got-2 lokuslarında megagametofit dokunun her zaman tek bantlı olduğu görülmüştür. Embriyo dokuda, homozigot bireyler tek bant, heterozigot bireyler ise üç bant (her iki allele de ait olan bantları ve bir de her iki allele ait bantların ortasında heterobant) oluşturmuştur. Got-3 lokusunda ise megagametofit dokuda iki farklı mobilitate sahip üçlü bantlar gözlenmiştir. Embriyo dokuda ise homozigot bireyler üçlü bant verirken heterozigot bireylerde 9 bant gözlenmiştir. Bu bantlaşma şekli Got enziminin dimerik alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Bantlar Got-1 ve Got-2 lokuslarında negatif kutuptan pozitif doğru ilerlerken, Got-3 lokusunda pozitif kutuptan negatif kutba doğru da ilerlediği gözlenmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.5). Got-1 lokusundaki Allel 1 hem tohum bahçesinde hem de Populasyon A'da ve Populasyon B'de gözlenirken, Allel 2 sadece populasyon A'da gözlenmiştir. Got-2 lokusunun her iki allele de, hem doğal populasyonlarda (Populasyon A ve Populasyon B) ve hem de tohum bahçesinde rastlamıştır. Got-3 lokusunda ise, Got-1 lokusunda olduğu gibi, sadece Populasyon A'da Allel 2'ye rastlanmıştır.

Malat dehidrogenaz (Mdh) enzimi: Dört (4) farklı zonda aktivite gözlenmiştir. Fakat sadece Mdh-1'e ait bantlar net olarak belirlenebilmiştir. Mdh-1'e ait bantların jelde koyu olarak boyandığı gözlenmiştir. Mdh-1 lokusunda iki allel gözlenmiştir. Mdh-1 lokusunda megagametofit dokunun her zaman tek bantlı olduğu görülmüştür. Embriyo dokuda, homozigot bireyler tek bant, heterozigot bireyler ise üç bant (her iki allele de ait olan bantları ve bir de her iki allele ait bantların ortasında heterobant) oluşturmuştur. Bu

bantlaşma şekli Mdh-1 lokusunun dimerik alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Mdh-1'in 1. alleli ve Mdh-2 lokusu çakıştığı için Mdh-2 lokusundaki allel(ler) belirlenememiştir. Mdh-3 lokusuna ait bant ise Mdh-1'in 2. alleli ile çakışmıştır. Bundan dolayı Mdh-3 de değerlendirmeye alınmamıştır. Mdh-4 lokusunda ise çok silik boyanma olduğu gözlenmiştir. Mdh-4 lokusunda bir varyasyon gözlenmesine rağmen bantlar silik olduğundan bu lokusdaki alleller tam olarak belirlenememiştir ve değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.6). Mdh-1 lokusundaki her iki allele, hem Populasyon A ve Populasyon B'deki bireylerde ve hem de tohum bahçesindeki bireylerde rastlanmıştır.

Menadion redüktaz (Mnr) enzimi: İki aktif zonda bantlar gözlenmiştir. Mnr-1 lokusunda sadece bir allel gözlenmiştir. Mnr-2 lokusunda ise iki allel gözlenmiştir. Embriyo dokuda, homozigot bireyler, tek bant heterozigot bireyler ise iki bant (her iki allele de ait olan bantları) oluşturmuştur (Şekil 3.1, Şekil 3.7). Bu bantlaşma şekli Mnr-2 lokusunun monomerik alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Mnr-2 lokusunda Populasyon A, Populasyon B ve tohum bahçesindeki bireylerde her iki allele de rastlanmıştır.

6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6pgd) enzimi: Analizler sonucunda iki (2) farklı zonda bantlar gözlenmiştir. Hem 6pgd-1 lokusunda hem de 6pgd-2 lokusunda üçer allel gözlenmiştir. Her iki lokusta da embriyo dokuda, homozigot bireyler tek bant, heterozigot bireyler ise üç bant (her iki allele de ait olan bantları ve bir de her iki allele ait bantların ortasında heterobant) oluşturmuştur (Şekil 3.1, Şekil 3.8). Bu bantlaşma şekli 6pgd enziminin dimerik alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Populasyon A, Populasyon B ve tohum bahçesindeki bireylerde, 6pgd-1 ve 6pgd-2 lokuslarındaki her üç allele de rastlanmıştır.

Fosfoglucoizomeraz (Pgi): Analizler sonucunda iki farklı zonda bantlar gözlenmiştir. Pgi-1 lokusunda sadece bir allel gözlenmiştir. Megagametofit dokuda her zaman ikili banta, embriyo dokuda ise tek banta rastlanmıştır. Pgi-2 lokusunda ise üç allel gözlenmiştir. Pgi-2 lokusunda alleller megagametofit dokuda üçlü bantlar

şeklinde. Embriyo dokuda ise homozigot bireyler tek bant oluştururken heterozigot bireylerde üç bant (her iki allele de ait olan bantları ve bir de her iki allele ait bantların ortasında heterobant) oluşmuştur (Şekil 3.1, Şekil 3.9). Bu bantlaşma şekli Pgi-2 lokusunun dimerik alt birim yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Pgi-2 lokusundaki Allel 1'e ve Allel 2'ye hem tohum bahçesindeki hem d populasyon A'daki ve populasyon B'deki bireylerde rastlanırken, Allel 3'e sadece tohum bahçesinde üretilen tohumların embriyolarına katkıda bulunan polen gametlerinde rastlanmıştır.

Şikimat dehidrogenaz (Sdh) enzimi: İki zonda bantlar gözlenmiştir (Sdh-1 ve Sdh-2 lokusları). Sdh-1 lokusunda üç allel gözlenmiştir. Megagametofit dokuda Allele 2 ve Allele 3 ikili bant oluştururken Allele 1 tek bant oluşturmuştur. Embriyo dokuda Allele 1 homozigot bireylerde tek bant oluşturmuştur. Allele 2 ve allele 3 homozigot bireylerde, megagametofit dokudaki gibi yine ikili bant oluşturmuştur. Allel 1 ve Allel 2'nin bantlaşma şekli heterozigot bireylerde Allel 2'ye benzemekle birlikte öndeki bantın Allel 2'dekine göre daha kalın olduğu görülmüştür. Allel 2 ve Allel 3'ün heterozigot bireylerde üçlü bant oluşturduğu görülmüştür. Allel 1 ve Allel 3 ise heterozigot bireylerde iki bant oluşmuştur. Sdh-2 lokusundaki bantlar çok silik olduğu için her zaman kaydedilememiştir. Bu nedenle Sdh-2 lokusu değerlendirmelere dahil edilmemiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.10).

3.2. Tohum Bahçesi Klonlarının Genetik Kimliklerinin Tespiti

Tohum bahçesindeki 28 klonun her birinden üçer ramet ve her rametten de 16 tohum üzerinde yapılan analizler sonucunda, tohum bahçesindeki klonların genotipi belirlenmiştir. Her bir klonun çalışılan enzim lokusları bakımından genotipi Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Bütün lokuslar hepsi birden aynı anda gözönüne alındığında 28 klonun her birinin farklı genotiplere sahip olduğu gözlenmiştir.

Tohum bahçesindeki her bir klon 30'dan (20 no'lu klon) 90'a (8 no'lu klon) değişen sayılarda rametlere sahiptir. Yapılan analizler sonucunda her bir klondan örneklenen üç

Lokus	Aco						Adh-2					
Allel	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E
+6 cm												
5 cm												
4 cm												
3 cm	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2 cm												
1 cm												
Orijin												
-1 cm												
	1	11	1	12	2	22	1	11	1	12	2	22
Lokus	Got-1						Got-2					
Allel	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E
+6 cm												
5 cm												
4 cm	---	---	---	---	---	---						
3 cm												
2 cm												
1 cm												
Orijin												
-1 cm												
	1	11	1	12	2	22	1	11	1	12	2	22

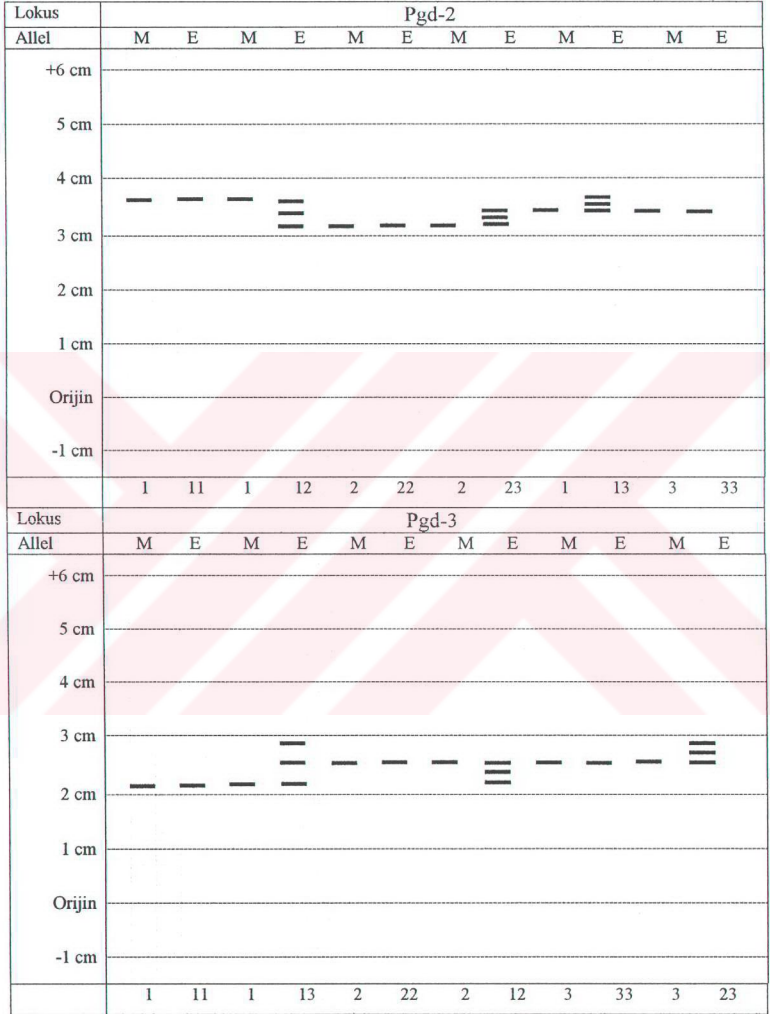
Şekil 3.1: Analiz edilen enzim sistemlerinin megagametofit ve embriyo dokuda bantlaşma şekillerinin şematik olarak gösterilmesi (M: Megagametofit, E: Embriyo) (Devamı arkada).

Şekil 3.1'in devamı

Lokus	Got-3						Mdh-1					
Allel	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E
+6 cm												
5 cm												
4 cm												
3 cm												
2 cm												
1 cm												
Orijin												
-1 cm												
	1	11	1	12	2	22	1	11	1	12	2	22
Lokus	Gdh		Mnr-1		Mnr-2							
Allel	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E
+6 cm												
5 cm												
4 cm												
3 cm												
2 cm												
1 cm												
Orijin												
-1 cm												
	1	11	1	11	1	11	1	12	2	22		

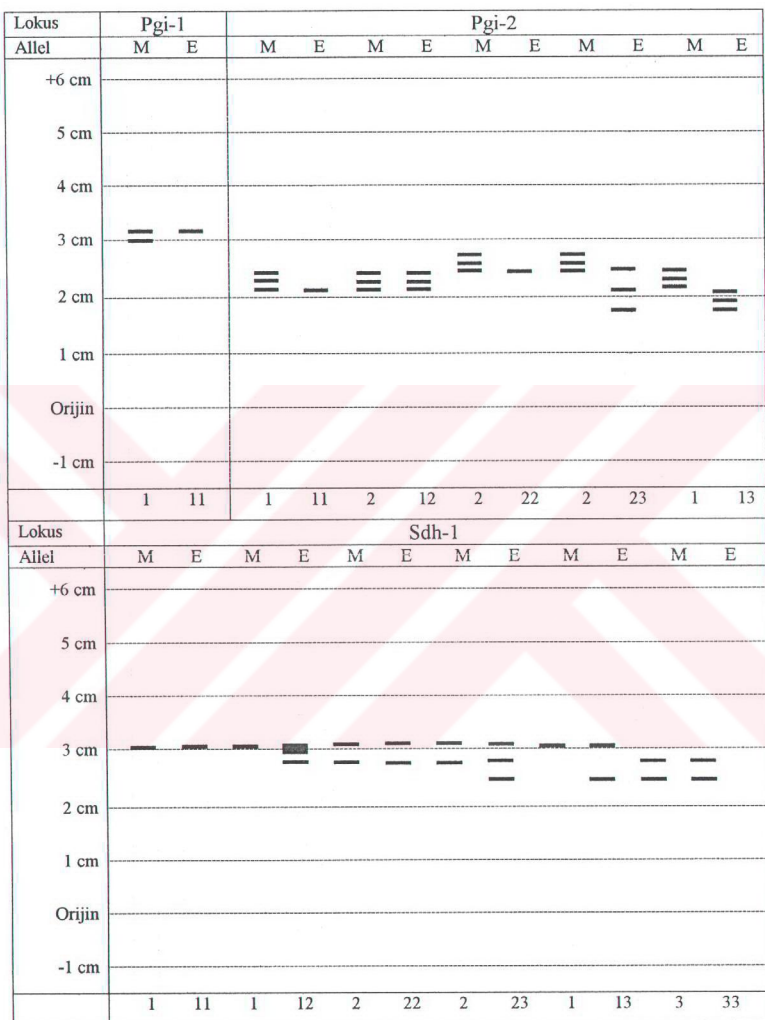
Devamı arkada

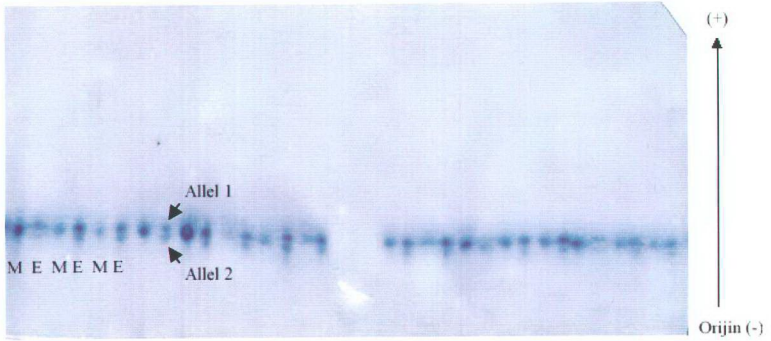
Şekil 3.1'in devamı



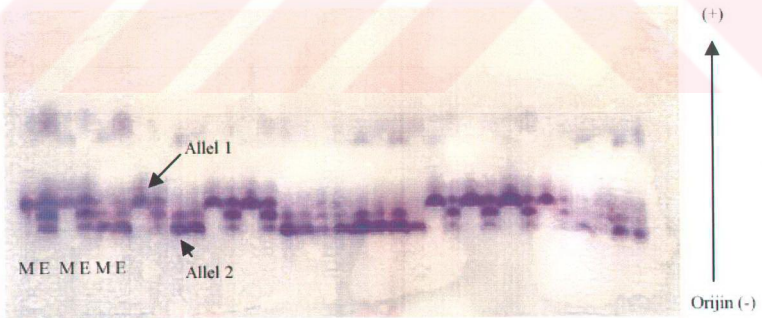
Devamı arkada

Şekil 3.1'in devamı

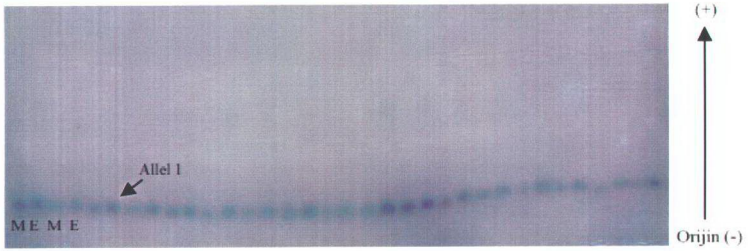




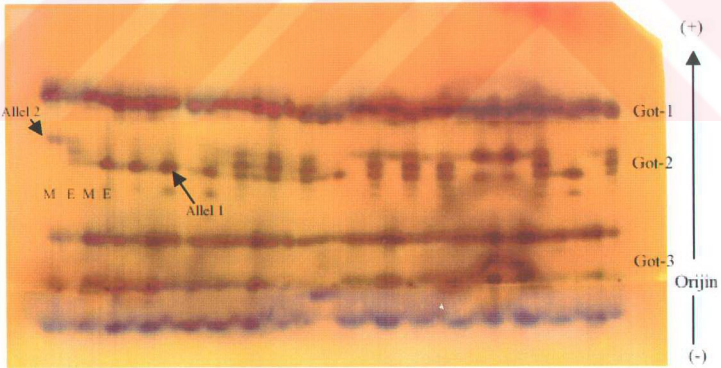
Şekil 3.2: Kızılçamda Akonitaz (Aco) enziminin jeldeki görünümü (M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



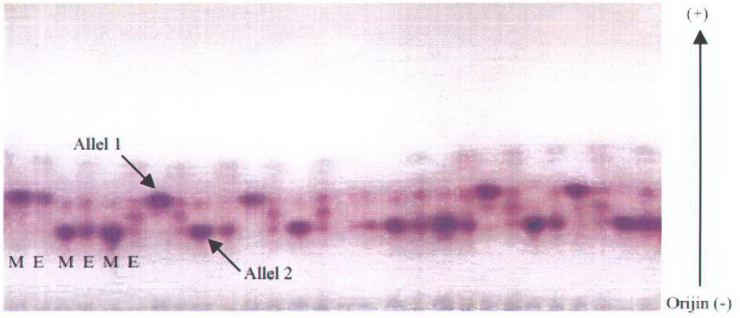
Şekil 3.3: Kızılçamda Alkol dehidrogenaz (Adh) enziminin jeldeki görünümü (M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



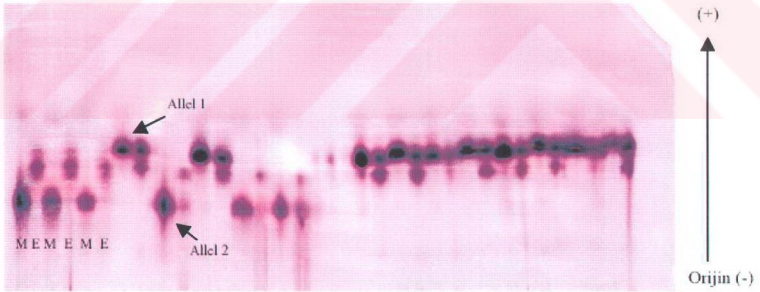
Şekil 3.4: Kızılçamda Glutamat dehidrogenaz (Gdh) enziminin jeldeki görünümü
(M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



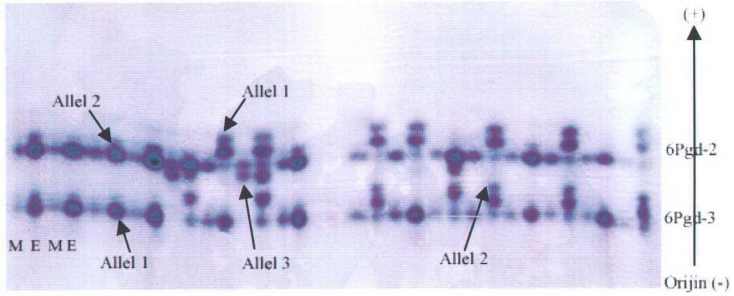
Şekil 3.5: Kızılçamda Glutamat-oksalaasetat transaminaz (Got) enziminin jeldeki görünümü (M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



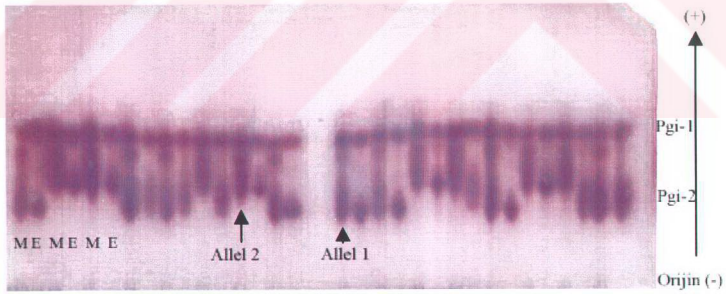
Şekil 3.6: Kızılçamda Malat dehidrogenaz (Mdh) enziminin jeldeki görünümü
(M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



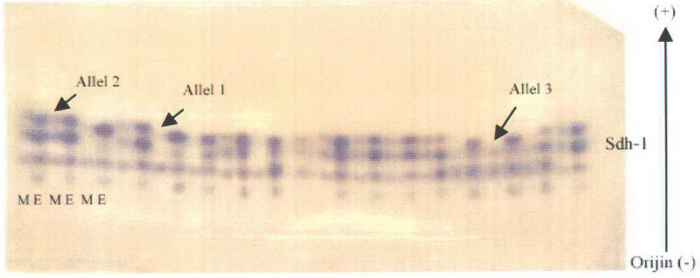
Şekil 3.7: Kızılçamda Menadion redüktaz (Mnr) enziminin jeldeki görünümü
(M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



Şekil 3.8: Kızılçamda 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6-Pgd) enziminin jeldeki görünümü (M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



Şekil 3.9: Kızılçamda Fosfogluko izomeraz (Pgi) enziminin jeldeki görünümü (M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)



Şekil 3.10: Kızılçamda Şikimat dehidrogenaz (Sdh) enziminin jeldeki görünümü
(M: Megagametofit dokuya ait bant, E: Embriyo dokuya ait bant)

Çizelge 3.1 : Asar-Antalya'da kızılçam klonal tohum bahçesindeki 28 klonun, çalışılan enzimler için genotipleri

Klon Numarası	Aco	Adh2	Gdh	Got1	Got2	Got3	Mdh1	Mnr1	Mnr2	Pgd2	Pgd3	Pgi1	Pgi2	Sdh1
1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/2	1/3	1/1	1/1	1/2
2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	3/3	1/1	1/1	1/2
3	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
4	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2
5	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/3
6	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	2/2
7	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2
8	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/3	1/1	1/2	2/2
9	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
10	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	2/3
11	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/3	1/1	1/1	1/2
12	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/3	1/1	1/1	2/2
13	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/2	2/3	1/1	2/2	2/3
14	1/1	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/3	1/1	1/2	2/3
15	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	2/2
16	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	3/3	1/1	2/2	1/2
17	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	2/3
18	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	2/3
19	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/3	1/1	1/2	1/2
20	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/3	1/3	1/1	1/1	2/2
21	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	2/2
22	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	2/2
23	1/1	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1
24	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/3	1/1	1/2	1/2
25	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/2	2/2
26	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	2/3	1/1	2/2	1/2
27	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2
28	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/3

Çizelge 3.2: Asar-Antalya'da kızılçam klonal tohum bahçesinde, beş farklı klonun ikiye rameti ile muhtemelen yanlış etiketlenme sonucu onlara dahil edilmiş rametlerin genotipleri

Klon No- Ramet No	Aco	Adh2	Gdh	Got1	Got2	Got3	Mdh1	Mnr1	Mnr2	Pgd2	Pgd3	Pgi1	Pgi2	Sdh1
4-1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2
4-2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2
4-3*	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/3	1/1	1/2	1/2
6-1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	2/2
6-2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	2/2
6-3*	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2
15-1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	2/2
15-3	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	2/2
15-2*	1/1	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/3	1/1	1/2	2/3
18-1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	2/3
18-3	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	2/3
18-2*	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1
20-1	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/3	1/3	1/1	1/1	2/2
20-3	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/3	1/3	1/1	1/1	2/2
20-2*	1/1	2/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/3	1/2	1/1	1/2

* Muhtemelen yanlış etiketlenme sonucu, ait olmadığı klonla dahil edilmiş rametler

rametin genotipleri karşılaştırılmıştır. Amaç, bir klonun genotipini belirlerken aynı zamanda çalışılan üç rametin gerçekten aynı klona ait olup olmadığını da tespit etmektir. Nitekim analizler sonucu elde edilen bulgular, 28 klondan beş klondaki birer adet rametin, aynı klonun diğer iki rametinin genotiplerine tıpatıp benzemediğini göstermektedir. Klon 4, klon 6, klon 15, klon 18 ve klon 21'e ait rametlerde bu durum tespit edilmiştir (Çizelge 3.2). Klon 4'ün farklı olan rametinin (3. ramet) klon 24'ün genotipine benzediği, klon 6'nın farklı olan rametinin (3. ramet) klon 7'nin genotipine benzediği, klon 15'in farklı olan rametinin (2. ramet) klon 14'ün genotipine benzediği ve klon 20'nin farklı olan rametinin (2. ramet) klon 24'ün genotipine benzediği tespit edilmiştir. Klon 18'in farklı olan rametinin (2. ramet) ise tohum bahçesindeki hiç bir klonun genotipine benzemediği görülmüştür. Bu durum adı geçen rametlerin yanlış etiketlenmiş olduğunun açık bir kanıtıdır. Adı geçen klonların bu rametleri, aşağıdaki değerlendirmelerde dikkate alınmamıştır.

3.3. Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik

Üç farklı populasyonda (Tohum bahçesi, Populasyon A ve Populasyon B'de) çalışılan dokuz farklı enzim göz önüne alındığında kızılcamda toplam 14 lokus belirlenmiştir. Bu 14 lokusta toplam 28 allel gözlenmiştir. Gözlenen her bir lokustaki allel frekansları Çizelge 3.3'de sunulmuştur. Analiz edilen 14 lokustan üçünün (Gdh, Mnr-1 ve Pgi-1) bütün populasyonlarda tam monomorfik olduğu gözlenmiştir. Got-1 ve Got-3 lokuslarının ise sadece Populasyon A'da, polimorfik tanımına uyan sınıra varmayacak derecede- çok düşük düzeyde- polimorfik olduğu görülmüştür, ki bu düzey bu iki lokusun da monomorfik olarak kabul edilebileceğini gösterir. Aco lokusunun tohum bahçesinde monomorfik, populasyon A ve populasyon B'de polimorfik olduğu bulunmuştur. Adh-2 lokusu ise tohum bahçesi ve populasyon B'de monomorfik bulunmuştur.

Çizelge 3.3: Asar-Antalya kızılçam klonal Tohum bahçesinin, Populasyon A'nın ve Populasyon B'nin çalışılan enzimler ve belirlenen lokuslar bakımından allel frekansları

Lokus	Allel	Tohum bahçesi	Populasyon A	Populasyon B
Aco	1	1.000	0.933	0.938
	2	0.000	0.067	0.063
Adh-2	1	0.025	0.067	0.000
	2	0.975	0.933	1.000
Gdh	1	1.000	1.000	1.000
Got-1	1	1.000	0.967	1.000
	2	0.000	0.033*	0.000
Got-2	1	0.618	0.933	0.906
	2	0.382	0.067	0.094
Got-3	1	1.000	0.983	1.000
	2	0.000	0.017*	0.000
Mdh-1	1	0.318	0.233	0.219
	2	0.682	0.767	0.781
Mnr-1	1	1.000	1.000	1.000
Mnr-2	1	0.870	0.883	0.938
	2	0.130	0.117	0.063
6pgd-2	1	0.613	0.333	0.475
	2	0.353	0.667	0.525
	3	0.034	0.000	0.000
6pgd-3	1	0.627	0.617	0.719
	2	0.152	0.133	0.063
	3	0.221	0.250	0.219
Pgi-1	1	1.000	1.000	1.000
Pgi-2	1	0.654	0.707	0.438
	2	0.346	0.293	0.563
Sdh-1	1	0.305	0.278	0.260
	2	0.553	0.333	0.460
	3	0.142	0.389	0.280

* Sadece Populasyon A'da gözlenen alleler (unique allel)

Populasyon A ve Populasyon B, çalışılan enzimlerin allel frekansları bakımından birbirinden istatistik olarak farklı değildir. Fakat her iki populasyonun allel frekansları tohum bahesinininkinden farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca Populasyon A ve Populasyon B'nin Aco lokusunda, tohum bahçesi ana gen havuzunda bulunmayan allele sahip olduğu tespit edilmiştir. Bundan başka populasyon A hem Got-1 hem de Got-3 lokuslarında tohum bahçesi ana gen havuzunda ve Populasyon B'nin gen havuzunda bulunmayan bulunmayan farklı allellere (unique allele) sahiptir. Analizler sonucunda bu allellere tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen tohumlarda da rastlanmıştır. Tohum bahçesindeki klonların, Populasyon A'dan ve Populasyon B'den analiz edilen bireylerin genotipinde Pgi-2 lokusundaki allel 3'e rastlanılmamıştır. Bununla birlikte, bu allele sadece tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen tohumların embriyolarına katkıda bulunan polen gametlerinden bir kaçında rastlanmıştır.

Populasyon A, Populasyon B ve Tohum bahçesinin genetik çeşitliliğine ait bilgiler izelge 3.4'de sunulmuştur. Gözlenen heterozigotluk düzeyi 0.170 ile 0.232 arasında değişmektedir. Polimorfizm düzeyi ise %50.0 ile %64.3 arasında değişen değerlere sahiptir. Tohum bahçesinin polimorfizm oranı populasyon A ve B'ye oranla daha düşük; fakat tohum bahçesinin ortalama heterozigotluk düzeyi iki doğal populasyona göre daha yüksektir. Ortalama allel sayısı ise 1.7 ile 1.9 arasında değişmektedir.

Tohum bahçesi içerisindeki bireyler tarafından üretilen tohumlarda, analiz edilen her bir lokus için Hardy-Weinberg koşullarında gözlenen heterozigotluk değerinin beklenen heterozigotluk değerlerinden sapma gösterip göstermediğini belirlemek için yapılan Wright'ın F istatistiği sonuçları izelge 3.5'de gösterilmiştir. Wright'ın Fiksasyon İndisinin (F) -0.034 ile 0.143 arasında değişen değerlere sahip olduğu görölmüştür. Üç (3) lokusta (Mnr2, Pgd3 ve Sdh1) gözlenen heterozigotluk değerinin beklenenden istatistiksel olarak önemli bir sapma gösterdiği bulunmuştur (izelge 3.5).

Çizelge 3.4: Populasyon A, B ve Asar-Antalya kızılcım tohum bahçesinin genetik çeşitliliğine ait parametreler

Populasyon Adı	Her bir lokus için ortalama örnek sayısı	Her bir lokus için ortalama allel sayısı	Polimorfik lokusların yüzdesi*	Ortalama Heterozigotluk**	
				Gözlenen	Beklenen
Populasyon A	29.7 (SE: 0.2)	1.9 (SE: 0.2)	64.3	0.197 (SE: 0.047)	0.225 (SE: 0.060)
Populasyon B	32.1 (SE: 0.8)	1.7 (SE: 0.2)	57.1	0.170 (SE: 0.054)	0.204 (SE: 0.063)
Tohum bahçesi	1653.0 (SE: 0.0)	1.8 (SE: 0.2)	50.0	0.232 (SE: 0.067)	0.232 (SE: 0.066)

* Bir lokusun, en yaygın allelinin frekanısı %95'i geçmiyorsa, o lokus polimorfik olarak nitelendirilir

** Tarafsız (unbiased) tahmin (Nei 1978)

Çizelge 3.5: Asar-Antalya kızılcım klonal tohum bahçesinde üretilen tohumlar için Wright'ın Fiksasyon indexi (F)

Lokus	Heterozigotlar		Fiksasyon İndeksi (F)	χ^2	P
	Gözlenen	Beklenen			
Aco	19	18.878	-0.007	0.06	0.8086
Adh2	125	124.876	-0.001	0.00	0.9705
Got1	15	14.925	-0.005	0.04	0.8511
Got2	570	551.639	-0.034	1.55	0.2133
Got3	1	1.000	0.000	0.00	1.0000
Mdh1	612	597.784	-0.024	0.80	0.3726
Mnr2	305*	355.873	0.143	27.77	0.0000
Pgd2	706	711.841	0.008	0.10	0.7529
Pgd3	687*	717.710	0.042	4.28	0.0385
Pgi2	598	597.465	-0.001	0.00	0.9739
Sdh1	682*	788.341	0.135	39.49	0.0000

*Beklenen değerden 0,001 düzeyinde farklı

3.4. Kendinden-Başka-Bireylerle Döllenme Oranı ve Polen Kontaminasyonu

Tohum bahçesinde çok-lokus tahmin yöntemine göre kendinden-başka-bireylerle (kendi-dışı) döllenme oranı (t_m) 0.947 (SE:0.007) olarak bulunmuştur. Kendinden-başka-bireylerle döllenmenin ortalama bir-lokus tahmini (t_s) 0.883 (SE:0.014) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Çok-lokus tahminine göre, t_m değerinin 0.947 olarak bulunması, yaşayabilir nitelikteki tohumlarda, kendisinden başka bireylerle döllenme oranının yaklaşık olarak %95 olduğunu, kalan %5'lik kısmın ise kendi-kendine döllenme (self-fertilization) sonucu oluştuğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen tohumlarda gözlenen kontaminantların oranı (b) 0.179 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.7). Tohum bahçesinde tahmin edilen gerçek polen kontaminasyonu (m) ise 0.857 (%85.7) olarak hesaplanmıştır. Polen kontaminasyonunun bu düzeyde olmasının tohum bahçesi tohumlarından beklenen genetik kazancı G_a =%43 oranında azaltacağı hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6: Asar-Antalya kızılçam klonal tohum bahçesinde eşleşme sistemi parametreleri

Kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı		Kendi-kendine döllenme oranı
Çok-lokus tahmini t_m^*	Tek-lokus tahmini t_s^{**}	s^{***}
0.947 (SE:0.007)	0.883 (SE:0.014)	0,053

* t_m : Çok-lokusa dayalı olarak hesaplanan kendisinden başka bireylerle döllenme oranı,

** t_s : Tek-lokusa dayalı olarak hesaplanan ortalama kendisinden başka bireylerle döllenme oranı

*** s =1- t : Kendi-kendine döllenme oranı

Çizelge 3.7: Asar-Antalya kızılcām klonal tohum bahçesinde polen kontaminasyonu parametreleri

b*	d*	m*
0.179 (SE: 0.01)	0.209 (SE: 0.028)	0.857 SE: 0.12

*b: kontaminantların gözlenen oranı, d: bir yabancı polen taneciğinin belirlenebilir bir çok-lokuslu markın taşıma olasılığı, $m=b/d$: polen kontaminasyonu tahmini

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Asar-Antalya mevkiinde kurulmuş bir kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) klonal tohum bahçesi ile onun yakın çevresinde yer alan iki doğal kızılçam popülasyonundan toplanan tohumlarda izoenzim analizleri yapılmıştır. Analizler dokuz enzim sistemi tarafından kontrol edilen 14 lokus üzerinde yürütülmüştür. Yaklaşık olarak 1400 tohumun megagametofit (endosperm, n kromozomlu) ve embriyo (2n kromozomlu) dokusu ayrı ayrı analiz edilmiştir. Analizler sonucu elde edilen verilerle hem tohum bahçesinin, popülasyon A'nın ve popülasyon B'nin genetik çeşitliliği, hem de tohum bahçesinde eşleşme sistemi ve polen kontaminasyonu oranı hakkında önemli bilgiler sağlanmıştır.

4.1. Enzim Fenotiplerinin Belirlenmesi

Elektroforez işlemi uygulandıktan sonra jellerin her bir enzim sistemine özgül boyama maddeleri ile boyanması sonucu megagametofit ve embriyo dokudaki bantlaşma modelleri, enzimin kalıtım şekli ve yapısı hakkında önemli bilgiler ortaya koymaktadır. Elektroforetik olarak incelenen enzimlerin çoğu monomer, dimer veya tetramer olarak bulunur. İzoenzimler kodominant olarak kalıtıldığından embriyo, tomurcuk ve yaprak gibi diploid dokularda heterozigot bireyler her bir allel tarafından kodlanan polipeptitlerin çoklu bantlaşma desenini gösterir. Jelde heterozigot bireyler için, monomerik enzimlerde iki, dimerik enzimlerde üç, tetramerik enzimlerde ise beş bant oluşur (Kephart 1990).

Bu çalışmada Aco, Mnr-2 ve Sdh-1 lokuslarının monomerik olduğu görülmüştür. Aco lokusunun monomerik olduğunu bildiren bir çok yayın mevcuttur (Adams vd 1989, Pascual vd 1993). Mnr-2 ve Sdh-1 lokuslarının ise monomerik olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra, bu iki lokusun alt ünite yapılarının belirsiz olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (Lewandowski ve Meinartowicz 1990, Murphy vd 1996). Adh-1, Mdh-1, Pgd-2, Pgd-3, Got-1, Got-2, Got-3 ve Pgi-2 lokuslarının ise dimerik olduğu tespit edilmiştir. Gdh lokusunu ise hiç bir bireyde heterozigot olarak gözlemleyemediğimiz için bu lokusun alt ünite yapısı belirlenememiştir. Fakat, Adams vd

(1989) Douglas-fir'de (*Pseudotsuga menziesii*) bu lokusun multimerik, Pascual vd (1993) *Abies pinsapo*'da, Boyle ve Morgenstern'de (1986) *Picea mariana*'da monomerik olduğunu belirtmektedir.

4.2. Klonların Genotipik Kimliklerinin Teşhisi

Tohum bahçesindeki tüm klonların genotiplerinin belirlenmesi ve tüm rametlerin ait oldukları varsayılan klonlara ait olup olmadığının belirlenmesi oldukça önemlidir. (Ladislav 1991, Adams 1993). Tohum bahçesindeki 28 klonun incelenen tüm lokuslar birlikte ele alınınca 14 lokus bakımından genotiplerinin karşılaştırılması sonucu her bir klonun farklı genotiplere sahip olduğu görülmüştür. Teorik olarak da beklenen bu durum, tohum bahçesindeki her bir klonun bir birinden genotipik olarak ayırt edilmesinde kolaylık sağlamaktadır. Böylece, bu enzimlere bakılarak, tohum bahçesindeki her bir rametin hangi klona ait olduğu kolayca belirlenebilmektedir.

Çalışmanın başlangıç aşamasında tohum bahçesindeki 28 klonun her birinden örneklenen üçer rametin genotiplerinin ait oldukları klonun genotipi ile tıpa tıpa aynı olduğu varsayımı yapılmıştır. Çünkü vejetatif yolla aynı bireyden (ortetten) üretilen bireylerde (rametlerde) genotiplerin tıpatıp birbirleriyle ve ortet bireylerle aynı olması beklenir. Bununla birlikte, analizler sonucunda bu varsayımın bütün klonlar için geçerli olmadığı gözlenmiştir. Örneğin, 28 klondan beşinin (Klon 4, Klon 6, Klon 15, Klon 18 ve Klon 20) incelenen üçer rametinden birer tanesinin ortet birey ve diğer iki ramet ile aynı genotipe sahip olmadığı gözlenmiştir. Şöyle ki; Klon 4'ün farklı olan bir rametinin 3 lokusta diğer iki ramete benzemediği, Klon 6'nın farklı olan bir rametinin 2 lokusta diğer iki rametle benzemediği, Klon 15'in farklı olan bir rametinin 6 lokusta diğer ramete benzemediği, Klon 18'un farklı olan bir rametinin 3 lokusta diğer iki ramete benzemediği ve Klon 20'nin ise farklı olan bir rametinin 4 lokusta diğer iki ramete benzemediği ortaya çıkmıştır. Adı geçen rametlerin ait oldukları sanılan klondan farklı genotiplere sahip olması, bu rametlerin tohum bahçesinin kuruluş aşamasında yanlış etiketlenmiş olmasıyla açıklanabilir. Tohum bahçesindeki 28 klona ait toplam 1653 ağaçtan rasgele seçilen 84 ağaca dayalı olarak elde edilen bu verilere bakılırsa, Asar tohum bahçesinde incelenen

rametlerin %6'sının yanlış etiketlenmiş olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Tohum bahçesinin kuruluş aşamasında bu çeşit deneysel hatalara ne yazık ki sık sık rastlanmaktadır. Nitekim, Ladislav (1991), bir *Pinus sylvestris* tohum bahçesinde 43 klon ve her bir klonun ikişer rametinde izoenzim analizlerini yapmış; incelediği 86 rametten 10 tanesinde (%11.6) genotiplerin ilgili ortet birey ve ilgili rametlerle tıpatıp uymadığını ortaya çıkarmıştır.

4.3. Tohum Bahçesinin, Populasyon A'nın ve Populasyon B'nin Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi

Çalışılan enzimlerin allel frekansları bakımından, tohum bahçesini çevreleyen Populasyon A ve Populasyon B birbirinden farklı bulunmazken, her iki populasyon tohum bahçesinden farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). Tohum bahçesini çevreleyen ve birbirine nispeten yakın olan doğal populasyonların polen gen havuzunun tohum bahçesininkinden farklı olması beklenen bir durumdur. Çünkü tohum bahçesindeki bireylerin orijini Çameli-Göldağı (Denizli) dir. Tohum bahçesinin orijini olan Çameli-Göldağı ile bu bahçenin kuruluş yeri (Asar-Antalya) farklı coğrafik bölge ve farklı iklim kuşakları içerisinde (Anonim 2000). Dolayısı ile Çameli-Göldağı kızılçam populasyonu gen havuzu ile Asar-Antalya'daki doğal kızılçam populasyonları farklı evrimsel güçlerin (özellikle farklı seleksiyon basıncının) etkisi altında bulunmaktadır. Bu durum, tohum bahçesinin gen havuzu ile tohum bahçesinin yakın çevresindeki doğal populasyonların gen havuzunun farklı olmasında önemli bir etkidir. Ayrıca, tohum bahçesindeki klonlar yoğun bir yapay seleksiyonla seçildikten sonra tohum bahçelerine getirildikleri için tohum bahçesi ve tohum bahçesine yakın doğal populasyonlar arasında gen frekansları bakımından daima bir fark olması beklenen bir durumdur (Snieszko 1981, Squillace ve Long 1981).

Tohum bahçesini çevreleyen yakın doğal populasyonların gen havuzunda, tohum bahçesi gen havuzunda bulunmayan allellerin bulunması ya da bunlar arasında allel frekansları bakımından önemli farklılıkların olması, kontaminasyon oranının daha doğru olarak tahmin edilmesinde yararlı olur (Smith ve Adams 1983). Bunun yanında, tohum bahçesinin yakın çevresindeki populasyonların gen havuzunun tohum bahçesinin gen havuzundan önemli ölçüde farklı olması, özellikle polen kontaminasyonu olması

durumunda tohum bahçesi tohumlarının genetik yapısını önemli derecede değiştirebilir (Ladislav vd 1993).

Çizelge 3.4'deki veriler ile, Çizelge 3.3.'deki tek bir populasyonda özel allellerin (unique allele) sayısı hakkındaki veriler, tohum bahçesinin, Populasyon A'nın ve Populasyon B'nin genetik çeşitliliği ile ilgili yeni bilgiler ortaya koymuştur. Tohum bahçesinin polimorfizm oranı Populasyon A'ya ve Populasyon B'ye oranla daha düşüktür; ancak tohum bahçesinde ortalama heterozigotluk düzeyi komşu populasyonlardan daha yüksektir. Tohum bahçesini oluşturan bireylerin belirli karakterler bakımından (boy, gövde çapı, gövde düzgünlüğü gibi) fenotipik seleksiyonla yapay olarak seçilmiş olması sonucu, tohum bahçesinin genetik tabanı daralmış ve bu durum bazı lokusları etkilemiş olabilir. Bu nedenle, polimorfik lokusların oranı tohum bahçesini çevreleyen doğal populasyonlara göre bu nedenle daha düşük çıkmış olabilir. Fakat genetik çeşitliliğin başlıca göstergesi heterozigotluk düzeyidir. Mevcut polimorfik lokusların heterozigotluk düzeyi tohum bahçesinde onu çevreleyen populasyonlarınkinden daha yüksek çıkmıştır. Bu durumda, tohum bahçesinin, Populasyon A'dan ve Populasyon B'den daha yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir. Nitekim, tohum bahçesindeki 28 klonun genotiplerinin her birinin, incelenen 14 lokus birlikte ele alınınca birbirinden farklı bulunması da tohum bahçesinin genetik çeşitliliğinin ayrı bir göstergesi olmaktadır.

Tohum bahçesi içindeki bireyler tarafından üretilen tohumların belirlenen alleller bakımından Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının göstergesi olan Wright'ın F-istatistiği kullanılarak fiksasyon indeksi (F değeri) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre üç lokusta (Mnr-2, Pgd-3 ve Sdh-1) gözlenen heterozigotluk değerinin beklenen değerden istatistiksel olarak önemli bir sapma gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.5). Fiksasyon indeksi Mnr-2 lokusunda 0,143, Pgd-3 lokusunda 0,042 ve Sdh-1 lokusunda ise 0,135'dir. Bu durum, tohum bahçesi içindeki bireyler tarafından üretilen tohumlarda bu lokuslar bakımından homozigotlukta bir aşırılığı (beklenen oranlardan fazlalığı) göstermektedir. Homozigotluktaki aşırılık (yani heterozigotluktaki azalma) Mnr-2 lokusu için %14.2, Pgd-3 lokusu için % 4.2 ve Sdh-1 lokusu için de %13.5'dir.

Heterozigotluktaki azalmanın nedenleri şunlar olabilir: Wahlund etkisi, benzer genotipler arasındaki tercihi eşleşme (positive assortative mating), homozigotlar lehine yararına bir seçim ve akrabalar arasında eşleşme ve bunun gibi nedenler. Bu durumlarda F değerinde sıfırdan pozitif sapma gözlenir.

F değerindeki sıfırdan negatif sapma ise homozigotluktaki azlığı (heterozigotluktaki aşırılığı) göstermektedir. Bu durum ise birbirine benzemeyen genotipler arasındaki tercihi eşleşme (negative assortative mating) ve heterozigotların lehine olan bir seçim sonucu oluşabilir (Brown 1979, Fast vd 1986, El-Kassaby vd 1987, Fady ve Conkle 1993).

4.4. Eşleşme Sistemi ve Polen Kontaminasyonu Oranı

Tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme (outcrossing) oranının belirlenmesi, soy-içi üreme (inbreeding) ile kendi-kendine döllenmenin (selfing) ve bunların beraberinde getireceği etkilerin değerlendirilmesi açısından faydalıdır. Şöyle ki: eğer tohum bahçesindeki bireyler arasında kendinden-başka-bireylerle döllenme sınırlı ise veya kendi-kendine döllenme oranı yüksek ise, tohum bahçesinde üretilen tohumların miktarı ve genetik kalitesinde önemli bir azalma olabilir (Omi ve Adams 1985). Çoğu araştırmacılar değişik orman ağaçlarında kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının yüksek olduğunu belirtmektedir (Shaw ve Allard 1982, Ritland ve El-Kassaby 1985, El-Kassaby ve Ritland 1986, El-Kassaby vd 1989). Asar tohum bahçesinde “çok lokusa dayalı tahmin yöntemi”ne göre, tohum bahçesinde kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı (t_m) 0,947 (SE:0,007) olarak bulunmuştur. Kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının “bir lokusa dayalı tahminleri”nin ortalaması (t_s) ise 0,883 (SE:0,014) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Çok lokusa dayanarak hesaplanan t_m değerinin 0,947 olması, tohum bahçesi içindeki bireyler tarafından üretilen tohumlarda kendi-kendine (selfing) döllenme sonucu oluşan bireylerin ($s=1-t$) oranının %5,3 olduğu anlamına gelir (Çizelge 3.6). Tohum bahçesi içindeki diğer klonlarla döllenme oranı ($1-s-m$, m =polen kontaminasyonu oranı) ise %9’dur. Böylece tohum bahçesinde kendinden-başka-

bireylerle döllenme oranı %94.7 olmaktadır (Bunun %85.7'si tohum bahçesi dışından, %9'u ise tohum bahçesi içinden gelen polenlerle gerçekleşmektedir.). Tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilen tohumlarda kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı diğer bir çok konifer türünde gözlenen değerler gibi değerlidir. Nitekim, *Pinus* cinsine ait bazı türlerle yapılan eşleşme sistemi analizlerine bakıldığında t_m değerinin genel olarak yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Ağaç ıslahı bakımından t_m değerinin yüksek olması arzu edilmektedir.

Bitki türlerinin eşleşme sistemi, ya genetik ya da çevresel faktörlerden kaynaklanan varyasyonlar gösterir (Clegg 1980, El-Kassaby ve Jaquish 1996). Koniferlerin büyük çoğunluğu tamamen kendinden-başka-bireylerle döllenirken, bazı konifer türlerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının düşük olduğu görülür. Koniferlerde, popülasyonlara, bireylere, mevsimlere bağlı olarak kendinden-başka-bireylerle döllenme oranında varyasyonlar olduğu bilinmektedir. Üreme ekolojisi, fenolojik varyasyonlar ve döl verimliliği (fertility), eşler arasındaki mesafe ve popülasyon yoğunluğundaki varyasyonlar gibi nedenlerle, kendinden-başka-bireylerle döllenme oranında da varyasyonlar ortaya çıkmaktadır (El-Kassaby vd 1988, El-Kassaby ve Jaquish 1996). Muhtemel olarak, fenolojik varyasyon, tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme şekli üzerine tek başına en önemli etkiyi yapmaktadır (Erickson ve Adams 1989, Burczyk ve Prat 1997). Uygulama açısından bakıldığında, kendi-kendine döllenme ürün kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Kendi-kendine döllenme yüksek oranda embriyonun gelişim bozukluğuna ve sonuç olarak boş tohum oluşmasına, tohum dolgun olsa bile özellikle fidecik çağında yüksek ölüm oranına, yaşasalar bile düşük büyüme hızına ve istenmeyen fenotipik özelliklere neden olur (Adams vd 1992, Erickson ve Adams 1990, Ladislav ve Gömory 1995). Doğada kendi-kendine döllenme yüksek olabilir fakat yaşayabilir nitelikteki bireylerin sadece %5-10'u kendi-kendine döllenme sonucu oluşmuş bireylerdir. Soy-içi üreme sonucu oluşan bireylerin çevreye uyum değerlerinin azalması nedeniyle, onların muhtemelen sadece küçük bir oranı hayatta kalıp üreme olgunluğuna ulaşabilirler (Neale ve Adams 1985).

Çizelge 4.1: *Pinus* cinsinin bazı türlerinde t_m ve t_s değerleri

Tür Adı	t_m	t_s	Yararlanılan kaynak
<i>Pinus attenuata</i>	0.927	0.915	Burczyk vd 1997
	0.964	-	Burczyk vd 1996
<i>Pinus cembra</i> L.	0.686	0.707	Krutovskii vd 1995
<i>Pinus sibirica</i>	0.894	0.862	Krutovskii vd 1995
<i>Pinus koraiensis</i>	0.974	0.936	Krutovskii vd 1995
<i>Pinus monticola</i>	0.977	0.952	El-Kassaby vd 1987
<i>Pinus sylvestris</i>	0.987	0.978	Burczyk 1998
	0.959	0.931	El-Kassaby vd 1989
<i>Pinus taeda</i>	-	0.988	Adams ve Joly 1980
<i>Pinus brutia</i>	0.947	0.883	Bu çalışma 2001

t_m : Çok-lokusa dayalı olarak hesaplanan kendisinden başka bireylerle döllenme oranı,

t_s : Tek-lokusa dayalı olarak hesaplanan ortalama kendisinden başka bireylerle döllenme oranı

Karışık eşleşme modeli (mixed mating model) yabancı polen havuzundaki allel frekanslarının homojen olduğu ve soy-içi üremenin olmadığı (kendi-kendine döllenme dışında) varsayımını yapar. “Çok-lokusa dayalı tahminler” yukarıdaki varsayımın ihlaline karşın “Tek lokusa dayalı tahminler”e göre daha kuvvetlidir ve kendi-kendine döllenme ve kendinden-başka-bireylerle döllenme arasında daha kuvvetli bir ayırım yapar. “Tek lokusa dayalı tahminler” ise karışık eşleşme modelindeki varsayımların ihlaline karşı daha duyarlıdır (Shaw ve Allard 1982). Yukarıdaki varsayımlar eğer ihlal ediliyorsa t_s değerinin t_m değerinden daha küçük olması beklenir (Burczyk vd 1997). Doğal popülasyonlarda tek lokus ve çok lokusa dayanarak hesaplanan kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı tahminlerinin karşılaştırılması kendi-kendine döllenme dışında diğer soy-içi üreme şekillerinin miktarı hakkında bilgi vermektedir (Shaw ve Allard 1982). Fakat, klonal tohum bahçelerinin kuruluş aşamasında, orijin popülasyondan alınan aşı kalemlerinin yakın akraba bireylerden olma olasılığı daha düşüktür. Bu nedenle, tohum bahçelerinin oğul döllerini kullanılarak, çok lokus ve tek lokusa dayalı olarak

yapılan kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı tahmini sadece kendi-kendine döllenmeden kaynaklanan soy-içi üremeyi yansıtır. Tohum bahçelerinde çok lokusa ve tek lokusa dayalı olarak hesaplanan kendinden-başka-bireylerle döllenme oranındaki farklılıklar, muhtemelen karışık eşleşme modelindeki diğer varsayımların ihlalininden kaynaklanabilir.

Bununla birlikte, kendi-kendine döllenmeyi minimuma indirmek için aynı klonun rametleri tohum bahçeleri içinde konuşlandırılırken bunlar arasındaki mesafenin maksimum düzeyde olması dikkate alınır. Çünkü sonuçta aynı klonun rametleri arasındaki eşleşmeler de kendi-kendine döllenmedir ve tohum bahçesindeki tohumlarda homozigotlarda bir aşırılık bulunmuşsa, bu durum, tohumların kendi-kendine döllenme sonucu oluşmuş olabileceğini gösterir (Fast vd 1986). Tohum bahçesindeki klonların sayısının ve aynı klona ait rametler arasındaki fiziksel mesafenin yaşayabilir nitelikteki kendi-kendine döllenmiş tohumların frekansını sınırlandırmada etkili olduğu görülmektedir (Adams ve Birkes 1989).

El-Kassaby ve Ritland (1986), tohum bahçelerinde sadece kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının incelenmesinin, polen kontaminasyonunun da etkisiyle, tahminlerde yanlışlıklara yol açabileceğini belirtmektedir. Bu araştırmacılar eşleşme sistemi incelenirken polen kontaminasyonu düzeyinin de mutlaka belirlenmesi gerektiğini belirtmektedir. Çünkü bu araştırmacılar her kontaminasyon olayının aynı zamanda başarılı bir kendinden-başka-bireylerle döllenme olayı olduğunu vurgulamaktadır. Tohum bahçelerinde kendi-kendine döllenme olayının olmaması arzu edilmektedir. Bu nedenle, tohum bahçelerinde kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının yüksek olması önemlidir. Fakat kendinden-başka-bireylerle döllenme olayının tohum bahçesi içindeki bireyler arasında olması arzu edilir. Eğer kendinden-başka-bireylerle döllenme tohum bahçesine yakın doğal populasyonlardaki bireylerle oluyorsa bu durumda kontaminasyon oranında bir artış olacaktır. Her durumda, kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının belirlenmesi, yorumlanması ve kontaminasyon düzeyinin ışığında tartışılması gereklidir (El-Kassaby vd 1989). Bu çalışmada, polen kontaminasyonu oranının oldukça yüksek

olduğu gözlenmiştir (%85,7). Kendinden-başka-bireylerle döllenme oranının, yüksek kontaminasyon düzeyinden dolayı yükselmiş olması muhtemeldir.

Bir tohum bahçesinde kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı farklı yıllarda farklı bulunabilir. Çünkü, tohum bahçesine giren yabancı polen oranı farklı yıllarda farklı olabilir. Ayrıca, her yıl tohum oluşumuna ebeveynlerin farklı katkısı ve her yıl polen dağılımını etkileyen faktörlerin de değişmesi, oluşan tohumlarda genetik kompozisyonu etkiler (Keskin 1999). Kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı genel olarak genetik kontrol altında olmasına rağmen, bir çok bitki türünün eşleşme sistemi esneklik gösterir ve çevresel faktörlere açıktır (Clegg 1980). Çeşitli bitki türü-bireylerinin kendinden-başka-bireylerle döllenme oranı farklı çevre koşulları altında belirgin farklılıklar göstermiştir. Populasyonun yapısı, yoğunluğu, denizden yükseklik ve çevrenin nemlilik derecesi kendinden-başka-bireylerle döllenme oranını etkiler (El-Kassaby vd 1988, Adams ve Birkes 1991).

Bu çalışmada, tohum bahçesinde gözlenen, kesin olarak belirlenebilir, kontaminantların oranı 0,179 olarak bulunmuştur. Yani tohum bahçesinde üretilen tohumların %17.9'u kesinlikle tohum bahçesindeki bireyler tarafından üretilmeyen polenlerle döllenme sonucu oluşmuştur. Bu polen kontaminasyonunun minimum tahminidir. Gerçek polen kontaminasyonu oranı ise %85.7 olarak belirlenmiştir. Gerçek polen kontaminasyonu oranı belirlenirken hem kesin olarak belirlenebilir kontaminantlar, hem de tohum bahçesi ve yakın doğal populasyonlar arasındaki allel frekansındaki farklılıklar göz önüne alınır. Yani polen kontaminasyonu sadece tohum bahçesinde bulunmayan allellerin tohum bahçesi tarafından üretilen tohumların yapısına katılmasıyla sınırlı kalmaz. Aynı zamanda polen kontaminasyonu sonucunda genetik olarak arzu edilen allellerin frekansında artma veya azalmalar söz konusu olabilir. Tohum bahçesini çevreleyen yakın doğal populasyonların gen havuzunda bulunan allellerin aynı tohum bahçesi gen havuzunda da bulunabilir. Eğer her iki gen havuzunun allel frekanslarında farklılıklar varsa, bu durumda doğal populasyonlardan yayılan polenlerle kontaminasyon sonucunda, tohum bahçesinde üretilen tohumların gen havuzu yine değişecektir. İşte bu nedenle, polen kontaminasyonunun gerçek düzeyi hesaplanırken tohum bahçesi ve yakın

doğal populasyonların allel frekanslarındaki farklılıklar göz önünde tutulur. Nitekim bu çalışmada polen kontaminasyonunun gerçek düzeyi (m) %85.7 olarak hesaplanmıştır. Değişik araştırmacılar tarafından farklı türler için polen kontaminasyonu oranının %5 ile %90 arasında değişen değerlerde olduğu bildirilmiştir (Çizelge 4.2). Bu durumda, Asar tohum bahçesinde tahmin edilen polen kontaminasyonu oldukça yüksektir. Bu derecede yüksek orandaki polen kontaminasyonu tohum bahçesi tohumlarında genetik çeşitliliği artırmasına rağmen, yabancı polenler istenmeyen genetik özellikler taşıyan populasyonların gen havuzundan geldiği için bahçedeki tohumlardan beklenen genetik kazancın azalmasına neden olmaktadır (Fast vd 1986, Wiseloge 1986).

Asar tohum bahçesinde tahmin edilen polen kontaminasyonu oranının bu kadar yüksek olmasında çeşitli faktörlerin etkisi söz konusudur. Bu faktörlerden birisi tohum bahçesinin yaşıdır. Bu çalışma için gerekli tohum örneklerinin toplandığı yıl (Mayıs 1997) tohum bahçesindeki bireyler sadece 11 yaşında idi. Bu yaş kızılçam türü için çok genç bir yaş sayılır. Yapılan çalışmalar genç tohum bahçelerinde polen üretiminin dolayısıyla polen dağılımının nispeten düşük olduğunu göstermektedir. Genel olarak koniferlerde fidanlar en azından beş-on yaşına gelinceye kadar polen üretimi başlamaz. Örneğin, *Picea mariana*'da polen üretimi yaklaşık 10. yılda başlar (Di-Giovanni ve Kevan 1991)). *Pinus* cinsinde ise dişi kozalak üretiminin genellikle erkek çiçek üretiminden birkaç yıl önce başladığı belirtilmektedir. *Pinus* türlerinde polen üretimi yedi yaş civarında başlar. *Pinus sylvestris* (L.) tohum bahçelerinde yapılan fenolojik gözlemlerde, ilk erkek çiçeklerin, ilk dişi çiçekler oluştuktan birkaç yıl sonra (yaklaşık olarak 11 yaşında) oluşmaya başladığı ve daha sonraki yıllarda yıldan yıla erkek ve dişi çiçek sayılarında artma olduğu belirtilmektedir (Greenwood ve Schmidtling 1981, Schmidtling ve Greenwood 1993). Bu çalışmaya konu olan aynı tohum bahçesinde, ağaçlar 10-12 yaşları arasındayken, Keskin (1999) tarafından yapılan üç yıllık fenolojik gözlemlerle, tohum bahçesinde yıldan yıla erkek ve dişi çiçek üretimi incelenmiştir. Keskin, bahçedeki klonların ürettiği hem erkek hem de dişi çiçek sayılarının her geçen yıl belirgin bir şekilde arttığını belirtmektedir. Dişi çiçek sayısı bakımından 1996 yılı genel ortalaması ağaç başına 89 adet iken, 1997 yılında 253 ve 1998 yılında da 217 adet olmuştur. Erkek çiçek sayılarında ise, 1996 yılı genel ortalaması ağaç başına 970 iken, 1997 yılında 2245 ve 1998 yılında da 3315 adet

olmuştur. *Pinus echinata* türünde arka arkaya yapılan üç yıllık gözlemler sonucunda da benzer bulgular elde edilmiştir (Schmidtling ve Greenwood 1993).

Çizelge 4.2: Değişik türlere ait tohum bahçelerinde polen kontaminasyonu oranı (m)

Tür Adı	Yaş	Metot	m (%)	Yararlanılan kaynak
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	-	İzoenzimler	48.9	Adam vd 1997
	-	İzoenzimler	44.0 ile 89.0	Fast vd 1986
	8-9	İzoenzimler	91.0	Adams ve Birkes 1989
	14	İzoenzimler	52.0	Smith ve Adams 1983
	20	İzoenzimler	40.0	Smith ve Adams 1983
<i>Pinus sylvestris</i>	12-16	İzoenzimler	36.0-21.0	El-Kassaby vd 1989
	16	İzoenzimler	52.0	Wang vd 1991
	17-18	İzoenzimler	24.0-40.0	Yazdani ve Lindgren 1991
	18-25	İzoenzimler	37.8	Nagasaka ve Szmidt 1985
<i>Pinus elliotii</i>	-	İzoenzimler	83.5	Squillace ve Long 1981
<i>Pinus taeda</i>	15	İzoenzimler	36.0	Friedman ve Adams 1985
	-	Polen tuzağı	31.0-88.0	Greenwood ve Rucker 1985
	>30	İzoenzimler	33.0	Harju ve Muona 1989
	-	İzoenzimler	51.0	Wiseloge 1986
	20-31	İzoenzimler	44.8-76.3	Pakkanen ve Pulkinen 1991
<i>Pinus brutia</i>	11	İzoenzimler	85.7	Bu çalışma
ORTALAMA	18		52.6	

Wang vd (1991), Harju ve Muona (1989) ve Pakkanen ve Pulkinen (1991) değişik türler üzerinde yaptıkları araştırmalarda (Çizelge 4.2), buldukları polen kontaminasyonu düzeyinin adı geçen tohum bahçelerinde bu kadar yüksek olmasının nedenini, bahçede üretilen polenlerin azlığına bağlamaktadırlar.

Değişik türlere ait tohum bahçelerinde, klonların polen üretimi bakımından farklılıklar gösterdikleri belirtilmektedir (Yazdani vd 1995, Keskin 1999). Bu çalışmaya konu olan aynı tohum bahçesinde 1996, 1997 ve 1998 yıllarına ait fenolojik gözlemler, her üç yılda da klonlar arasında erkek ve dişi çiçek üretimi bakımından önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Örneğin, 1996 yılında en çok erkek çiçek üreten ilk yedi klondan 5 tanesi (1, 4, 6, 9 ve 26 no'lu klonlar) 1997 ve 1998 yıllarında da ilk yedi klon arasında yer almıştır. Bu klonlar (1, 4, 6, 9 ve 26 no'lu klonlar), her üç yılda da, tohum bahçesindeki bütün klonlar tarafından üretilen erkek çiçeklerin ortalama %47'sini üretmişlerdir. Gözlemlerin yapıldığı ilk yıl yüksek sayıda dişi çiçek veren 3 ve 4 no'lu klonlar, daha sonraki yıllarda da üst sıralarda yer alabilmişlerdir. Bu klonlar (3 ve 4 no'lu klonlar), her üç yılda da, tohum bahçesindeki bütün klonlar tarafından üretilen dişi çiçeklerin ortalama %10,7'sini üretmişlerdir (Keskin 1999).

Ayrıca tohum bahçesindeki klonlardaki dişi çiçeklerin maksimum polen kabul dönemi ve erkek çiçeklerin de maksimum polen yayma döneminin çakışıp çakışmadığı da kendi kendine döllenme oranı ve polen kontaminasyonu düzeyini değiştirebilecek önemli bir faktördür. Keskin (1999) tarafından yapılan çalışmada, maksimum polen kabul evresinin bir hafta gibi kısa bir süreçte tamamlandığı ve 1996 yılına ait gözlemlere göre, tohum bahçesindeki 28 klondan beşinin (%18) maksimum polen kabul evresine erken girdiğini (30 Mart 1996'dan önce), beş klonun (%18) maksimum polen kabul evresine geç girdiğini (3 Nisan 1996'dan sonra) belirlenmiştir. Dişi çiçeklerde 1996 yılında polen kabul dönemi Nisanın ilk iki haftasında yoğunlaşmıştır. Yine aynı yıl yapılan gözlemlerde klonların %18'nin maksimum polen dağılma evresine geç girdiği belirtilmektedir. Dişi çiçeklerin polen kabul evresine geçişinin her üç yılda da erkek çiçeklerin polen dağılma evresinden daha önce başladığı belirtilmektedir. Dişi çiçeklerde braktelerin kapanmaya başlamasıyla, ki bu dönemde polen kabulü minimum düzeydedir, maksimum polen

dağılıma evresi aynı zamanda gerçekleşmiştir. Bu durum açıkça göstermektedir ki, tohum bahçesinde dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresi ile polenlerin yayılmaya başladığı evre tam olarak çakışmamaktadır. Bunun sonucu olarak, tohum bahçesindeki klonlar tarafından bahçeye yayılan polenlerin yine tohum bahçesindeki dişi çiçekleri döllenmedeki etkinlikleri azalacaktır. Tohum bahçesinde polen kabul evresine erken giren dişi çiçekler ya kendi erkek çiçekleri tarafından yayılan polenlerle döllenecek, ya da tohum bahçesi dışındaki doğal populasyonlardan etrafa yayılan polenlerle döllenecektir. Aynı durum geç çiçeklenen klonlar için de geçerli olacaktır. Bu durumda ya kendi-kendine döllenme ya da polen kontaminasyonu oranı artacaktır.

Polen kontaminasyonu açısından, tohum bahçesinin bizzat kendi yaşı kadar, tohum bahçesinin çevreleyen yakın doğal populasyonların yaşı da oldukça önemlidir. Asar tohum bahçesinin yakınındaki doğal populasyonların (Populasyon A ve Populasyon B) yaşı ortalama olarak 40-50'dir ve muhtemelen polen üretimi tohum bahçesindeki bireylere göre daha fazladır. Üstelik tohum bahçesini çevreleyen bu doğal populasyonların tohum bahçesine bu kadar yakın olmaları da polen kontaminasyonu oranının bu derece yüksek olmasında etkili olmuştur. Yapılan çalışmalar halen bir çok *Pinus* türünde polen kontaminasyonunu azaltmak için kullanılan 120-150 m'lik izolasyon zonlarının bile etkili olmadığını göstermektedir (Squillace 1967, Squillace ve Long 1981)

Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular sadece tek bir yılın (1997 yılının) tohum verimine ait bulgulardır. Fakat değişik türlere ait tohum bahçelerinde değişik yıllara ait gözlemlerde, yıllar arasında çiçeklenme ve tohum üretimi bakımından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Keskin'nin (1999) yaptığı çalışma da bu bulguyu desteklemektedir. Bir tohum bahçesinde üretilen polenlerin miktarının değişmesi muhtemel olarak kontaminasyon oranını etkileyecektir. Ayrıca bir tohum bahçesinin değişik kısımlarının (örneğin merkez ve kenardaki kısımlar) polen kontaminasyonundan ne derece etkilendiğinin bilinmesi de ilgi çekici bir konudur. Böyle bilgiler mevcut tohum bahçelerinden toplanan tohumların kontaminasyon riskine göre sınıflandırılmasını olası kılacak ve tohum bahçelerinin işletilmesinde faydalı olacaktır.

Tohum bahçesi dışındaki kaynaklardan bahçeye gelen polen göçü, açık tozlaşma yoluyla işletilen tohum bahçelerinden elde edilecek potansiyel genetik kazanca ciddi bir engel teşkil etmektedir. Üstelik dışardan gelen gen göçü, tohum bahçesinin genetik etkinliğini azaltan ve üretilen tohumların uyum değerini bozan bir faktör olabilir. Özellikle tohum bahçesine dışarıdan gelen polenler, tohum bahçesinden elde edilecek tohumların dikileceği alanlara daha zayıf adapte olan populasyonlardan geliyorsa, bu sorun daha büyük önem kazanır (Snieszko 1981). Nitekim, bu çalışmada bulunan %85.7'lik polen kontaminasyonun bu tohum bahçesinden beklenen genetik kazancı %43 kadar azaltacağı bulunmuştur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, Asar-Antalya mevkiinde yer alan 11 yaşında bir kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) klonal tohum bahçesinde eşleşme sistemi ve polen kontaminasyonu oranı izoenzim analizleriyle saptanmaya çalışılmıştır. İncelenen 14 lokus hep birlikte ele alınınca tohum bahçesindeki 28 klonun her birinin genotiplerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Bu durum, tohum bahçesindeki her bir klonun birbirinden genotipik olarak ayırt edilmesinde kolaylık sağlamaktadır. Böylece, tohum bahçesindeki klonlara ait rametlerin genotipik kimliklerinin belirlenmesi mümkün olmuştur. Tohum bahçesindeki 28 klondan beşinin (Klon 4, Klon 6, Klon 15, Klon 18 ve Klon 20) incelenen üçer rametinden birer tanesinin, ortetin diğer iki rameti ile aynı genotipe sahip olmadığı gözlenmiştir. Bu durumda, Asar tohum bahçesinde incelenen rametlerin %6'sının yanlış etiketlenmiş olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Tohum bahçesindeki tüm rametlerin genotipik kimlikleri belirlenerek, yanlış etiketlenmiş olanların ait oldukları klona dahil edilmeleri veya hiçbir klona dahil edilemiyorsa tohum bahçesinden elimine edilmeleri gerekir. Aksi takdirde gelecekte yapılacak döl denemeleri ve benzeri çalışmalarda hem bulguların doğruluk derecesi hem de araştırmacılar açısından bir takım sorunlar ortaya çıkacaktır.

Tohum bahçesini çevreleyen Populasyon A ve Populasyon B, çalışılan enzimlerin allel frekansları bakımından birbirinden farklı bulunmazken, her iki populasyon tohum bahçesinden farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). Genetik çeşitliliğin ana göstergesi olan heterozigotluk düzeyi tohum bahçesinde Populasyon A'dan ve Populasyon B'den daha yüksek çıkmıştır. Tohum bahçesinin Populasyon A'dan ve Populasyon B'den daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Tohum bahçesi içindeki bireyler tarafından üretilen tohumların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının göstergesi olan Wright'ın F-istatistiği kullanılarak fiksasyon indeksi (F değeri) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre üç lokusta (Mnr-2, Pgd-3 ve Sdh-1) gözlenen heterozigotluk değerinin beklenen değerden istatistiksel olarak önemli bir sapma gösterdiği bulunmuştur.

Bu çalışma, Türkiye’de bir tohum bahçesinde eşleşme sistemlerini ve polen kontaminasyonu oranının belirlenmesini konu alan ilk çalışmadır. Tohum bahçesindeki kendinden-başka-bireylerle döllenme (outcrossing) oranının yüksek olduğu ve kendine döllenme (selfing) sonucu oluşan yaşayabilir nitelikteki tohumların oranının kabul edilebilir bir düzeyde olduğu bulunmuştur. Tohum bahçesi tohumlarında polen kontaminasyonu oranının ise oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu düzeydeki polen kontaminasyonunun tohum bahçesi tohumlarından elde edilmesi beklenen genetik kazançta %43 kadar bir azalmaya neden olacağı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, Asar tohum bahçesinin, kızılçamın doğal populasyonlarından arzu edilen düzeyde izole edilemediği görülmektedir. Çalışmamız sonucu bulunan polen kontaminasyonu oranı kabul edilemeyecek kadar yüksektir. Öyle görünüyor ki, bu ve benzeri tohum bahçelerinde, tohum bahçesine doğru yabancı polenlerin aşırı göçünü önlemek için bir takım önlemlerin alınması gereklidir.

Bu tür sorunları hafifletmek için dikkate değer yaklaşımlar genel olarak şunlardır:

- 1- Polenlerin, önceki yıllardan veya erken polen yayan klonlardan yöntemine uygun bir şekilde toplanıp saklanması ve bu polenlerin dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresinde tekrar tohum bahçesine yayılması (Supplemental Mass Pollination=Destekleyici kitle polenlemesi). Bu tekniğin polen kontaminasyonu düzeyini azaltmada etkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (El-Kassaby ve Ritland 1986, El-Kassaby vd 1989)
- 2- Tohum bahçesindeki bireyler ile tohum bahçesine yakın doğal populasyonlardaki bireyler arasında fenolojik olaylar bakımından zamansal izolasyon sağlanması. Örneğin tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresi ve tohum bahçesindeki dışındaki doğal populasyonlardaki erkek çiçeklerin maksimum polen yayma dönemi çakışıyorsa, tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin polen kabul dönemine geçişini geciktirerek, gerekirse destekleyici kitle polenlemesi uygulanması.
- 3- Fiziksel izolasyon zonunun genişletilmesi. Bir çok *Pinus* türü için halen uygulanan standart 120-150 m’lik izolasyon zonunun polen kontaminasyonunu azaltmak için etkili olmadığı görülmüştür (Squillace 1967, Squillace ve Long 1981).

- 4- Tohum bahçesinin merkezi alanının (sonuç olarak tohum bahçesi alanının) genişletilmesi.
- 5- Tohum bahçesindeki polen üretimini arttıracak teknikler uygulanması. Tohum bahçelerindeki klonların bol miktarda polen üretimini teşvik etmek için gibberellinler veya gibberellin türevi sentetik maddeler kullanılması, gübreleme, halkalama (boğma) veya diğer teknikler kullanılarak çiçeklenmenin uyarılması sağlanır. Tohum bahçesinde bol miktarda polen üretilmesi; dışarıdan gelen polenlerin oranının daha az olmasına dolayısıyla kirliliğin azalmasını sağlar. Zamanında kullanılan bu tekniklerle, yaprakları oluşturacak tomurcukların çiçek veren tomurcuğa dönüşmesi teşvik edilmektedir. Eğer tohum bahçesi içinde çiçeklenme oranı artarsa tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin yine tohum bahçesi içinde üretilen polenlerle döllenme olasılığı da artacaktır (Lowe ve Wheeler 1993).
- 6- Tohum bahçesinin yeri belirlenirken, polen kontaminasyonunun az olabileceği ya da hiç olmayacağı yerlerin seçilmesi. Tohum bahçesinin 1000 m uzağına kadar aynı ağaç türü veya yakın akraba tür bulunmamalıdır (Yahyaoglu ve Atasoy 1983).
- 7- Tohum bahçesinin çevresinin modifiye edilmesi.
- 8- Polen kontaminasyonu sonucu genetik kazançtaki azalmayı hafifletmek için en son çare olarak başvurulabilecek alternatif bir yaklaşım da tohum bahçesinin, klonların seçildiği ana popülasyonun genetik kalitesinden daha zayıf olmayan ve benzer uyum değeri olan popülasyonların olduğu bir yere kurulması.
- 9- Kontrollü tozlaşma yapılması. Genellikle belirli genotipler arasında çaprazlama yapmak için kullanılan bir tekniktir. Fakat polen kirliliğinin önlenmesi amacıyla da sık olarak kullanılmaktadır. Kontrollü tozlaşma tekniği polenin dişi çiçeğe suni olarak verilmesi ve dolayısıyla ana ve baba ebeveynin her ikisinin de belli olmasını sağlayan bir tekniktir (Ürgenç 1982).

Yukarıdaki önerilerden bir kaç, bu çalışmaya konu olan Asar tohum bahçesinde uygulanabilir özelliktedir. Bu öneriler, uygulanabilirlik bakımından en ekonomik olanından başlayarak şöyle sıralanabilir:

- 1- Tohum bahçesinin çevresinin modifiye edilmesi. Tohum bahçesinin etrafındaki, A ve B ile gösterilen doğal populasyonlardaki bireyler tedrici olarak uzaklaştırılıp, o alan öncelikle o yöreye en iyi uyum yapabilen ve hızlı gelişen farklı bir tür ile (örneğin *Pinus pinea*, *Eucalyptus spp.* ve bunun gibi) ağaçlandırılabilir. Eğer yöreye iyi uyum yapan başka bir tür bulunamazsa o zaman bu alan tohum bahçesinden elde edilen tohumlarla ağaçlandırılabilir. Böylece yeni dikilen ağaçlar tohum bahçesi ile benzer gen havuzundan olduğu için, genetik olarak arzu edilmeyen polen kaynakları büyük oranda elimine edilmiş olacaktır.
- 2- Polenlerin, önceki yıllardan veya erken polen yayan klonlardan yöntemine uygun bir şekilde toplanıp saklanması ve bu polenlerin dişi çiçeklerin maksimum polen kabul evresinde tekrar tohum bahçesine yayılması (Supplemental Mass Pollination=Destekleyici kitle polenlemesi).
- 3- Tohum bahçesindeki polen üretimini arttıracak teknikler uygulanması.
- 4- Tohum bahçesinde, mümkün olduğu ölçüde çok sayıda bireyler üzerinde kontrollü tozlaşma yapılması.
- 5- Tohum bahçesindeki bireyler ile tohum bahçesine yakın doğal populasyonlardaki bireyler arasında fenolojik olaylar bakımından zamansal izolasyon sağlanması.

Bu önerilerden birincisi gerçekleşir ise, diğer önerileri uygulamaya büyük oranda gerek kalmayabilir. Çünkü dışarıdan gelen, görünürdeki yabancı polen kaynağı ortadan kalkmış olacaktır. Bununla birlikte adı geçen A ve B populasyonları ortadan kalktıktan sonra, tohum bahçesine gelen yabancı kaynaklı polenlerin ne kadar azaldığını anlamak için ayrı bir araştırma konusu önerilebilir.

Buna ek olarak, tohum bahçesindeki erkek ve dişi çiçeklerin sayısını arttıracak tekniklerin kullanılması yerinde olacaktır. Çünkü tohum bahçesindeki erkek ve dişi çiçeklerin sayısının artması her zaman arzu edilen bir durumdur. Böylece dişi çiçeklerin sayısındaki artmaya paralel olarak tohum bahçesinden elde edilecek tohum miktarı artacak, erkek çiçeklerin sayısının (dolayısı ile polenlerin) artmasıyla tohum bahçesindeki dişi çiçeklerin yine tohum bahçesinde üretilen polenlerle döllenme olasılığı artacaktır.

Bu çalışmaya konu olan tohum bahçesinden başka, Antalya'da Kızılçam türüne ait 10 tohum bahçesi daha bulunmaktadır. Bu 10 tohum bahçesinin her birinde de polen kontaminasyonu oranının belirlenmesi ve tolerans sınırları üstünde yabancı polen karışımı gözlenmesi halinde buna karşı gerekli önlemlerin alınması yerinde olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- ADAMS, W.T. 1992. Gene dispersal within forest tree populations. New Forest, 6:217-240.
- ADAMS, W.T. 1993. Application of isozymes in tree breeding. In: S.D. Tanksley and T. J. Orton (Eds), Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. 1993, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, p:381-400.
- ADAMS, W.T. and BIRKES, D.S. 1989. Mating patterns in seed orchards. In: Proceedings of 20th Southern Forest tree Improvement Conference, June 26-30, 1989, Charleston, South Carolina.
- ADAMS, W.T. and BIRKES, D.S. 1991. Estimating mating patterns in Forest tree populations. In: Fineschi, S., Malvolti, M.E., Cannata, F. and Hattemer, H.H. (Editors) Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands. pp. 157-172.
- ADAMS, W.T. and BURCZYK, J. 1993. GENFLOW: A computer program for estimating levels of pollen contamination in clonal seed orchards. Release 1. Dept. of Forest Science, Oregon State Univ., Corvallis, OR, USA.
- ADAMS, W.T., BIRKES, D.S. and ERICKSON, V.J. 1992. Using genetic markers to measure gene flow and pollen dispersal in forest tree seed orchards. In: R. Wyatt (ed.), Ecology and Evolution of Plant Reproduction. pp. 37-61.
- ADAMS, W.T., HIPKINS, V.D., BURCZYK, J. and RANDALL, W.K. 1997. Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. Can. J. For. Res. 27: (131-134).
- ADAMS, W.T. and JOLY, R.J. 1980. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: Clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. Silvae Genet., 29:1-4.
- ADAMS, W.T., NEALE, D.B., DOERKSEN, A.H. and SMITH D.B. 1989. Inheritance and linkage of isozyme variants from seed and vegetative bud tissues in coastal douglas-fir [*Psuedotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco]. Silvae Genet., 39:153-167.

- ALEMDAĞ, Ş. 1962. Türkiye'deki kızılçam ormanlarının gelişimi, hasılatı, ve amenajman esasları. Orm. Arş. Enst. Teknil Bülten Serisi, 11, 198 ss., Ankara.
- ANDREWS, A.T. 1990. Electrophoresis; Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications. (2nd ed) Oxford Science Publications. 452 p.
- ANONİM. 1980. Türkiye orman envanteri. Orman Bakanlığı, Orman Genel Müd., Yayın sıra No:13, seri No:630.
- ANONİM. 2000. Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü 1999 yılı Çalışma Raporu ve 2000 yılı Çalışma programı. Orman Bakanlığı, Ankara. 153 ss.
- ANONİM. 2001a. Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü 2000 yılı Çalışma Raporu ve 2001 yılı Çalışma programı. Orman Bakanlığı, Ankara. 149 ss.
- ANONİM. 2001b. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Ormancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu. Devlet Planlama Teşkilatı, Yayın No:DPT-2531-ÖİK:547. Ankara 539 ss.
- BLACK, W. C. 1997. Modified version of Biosys I by Swofford D. L. and Selander 1981. J.Hered. 72:281-283. Distributed by FTP from <http://lamar.colostate.edu/pub/wcb4>.
- BOYLE, T. J. and MORGENSTERN, E. K. 1986. Estimating of outcrossing rates in six populations of black spruce in central New Brunswick. Silvae Genet., 35(2-3):102-106,
- BROWN, A.D.H. 1979. Enzyme Polymorphism In Plant Populations. Theor. Pop. Biol., 15:1-42.
- BURCZYK, J. 1996. Variance effective population size based on multilocus gamete frequencies in coniferous population: an example of a scots pine clonal seed orchard. Heredity, 77: 74-82.
- BURCZYK, J. 1998. Mating system variation in Scots pine clonal seed orchard. Silvae Genet., 47(2-3): 155-158.

- BURCZYK, J. and PRAT, D. 1997. Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. Heredity, 79:638-647.
- BURCZYK, J., ADAMS, W.T. and SHIMIZU, J. Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. Heredity, 77:251-260.
- BURCZYK, J., ADAMS, W.T. and SHIMIZU, J. Y. 1997. Mating system and Genetic diversity in natural populations of knobcone pine (*Pinus attenuata*). Forest Genet., 4(4):223-226.
- CHELIAK, W.M., PITEL, J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42, Petawawa National Forestry Institute, Chalk River, Ontario, 49 p.
- CLEGG, M. T. 1980. Measuring Plant Mating Systems. Bioscience, 30(12):814-818.
- CONKLE, M.T., HODGSKISS, P.D., NUNNALLY, L.B. and HUNTER, S.C. 1982. Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds: A Laboratory Manual. U.S.D.A. Gen. Techn. Rept. PSW:64. 18 p.
- DI-GIOVANNI, F. and KEVAN, P.G. 1991. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. Can. J. For. Res. 21: 1155-1170.
- DI-GIOVANNI, F., KEVAN, P.G. and ARNOLD, J. 1996. Lower planetary boundary layer profiles of atmospheric conifer pollen above a seed orchard in northern Ontario, Canada. Forest Ecol. Manag., 83(1-2):87-97.
- EL-KASSABY, Y.A. and JAQUISH, S. 1996. Population density and Mating pattern in Western Larch. J. Hered., 87:438-443.
- EL-KASSABY, Y.A. and RITLAND, K. 1986. Low levels of pollen contamination in a Douglas-fir seed orchard as detected by allozyme markers. Silvae Genet., 35(5-6):224-229.
- EL-KASSABY, Y.A., MEAGHER, M.D., PARKINSON, J. and PORTLOCK, F.T. 1987. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith British Columbia. Heredity, 58:173-181.

- EL-KASSABY, Y.A., RITLAND, K., FSAHER, A. M. K. And DEVITT, W. J. B. 1988. The role of reproductive phenology upon the mating system of a Douglas-fir seed orchard. Silvae Genet., 37(2):76-82.
- EL-KASSABY, Y.A., RUDIN, D. and YAZDANI, R. 1989. Levels of outcrossing and contamination in two Pinus sylvestris L. seed orchards in Northern Sweden. Scand. J. For. Res. 4:41-49.
- ERICKSON, V.J. and ADAMS, W.T. 1989. Mating succes in a coastal Douglas-fir seed orchard as affected by distance and floral phenology. Can. J. For. Res. 19: 1248-1255.
- ERICKSON, V.J. and ADAMS, W.T. 1990. Mating system variation among individual ramets in a Douglas-fir seed orchard. Can. J. For. Res. 20: 1672-1675.
- ERKAN, N. 1996. Doğal kızılçam meşcerelerinde artım ve büyümenin değerlendirilmesi. Batı Akdeniz Orm. Arş Enst. Dergisi, Sayı 2, ss:33-42.
- FADY, B. and CONKLE, M.T. 1993. Allozyme variation and possible phylogenetic implications in Abies cephalonica Loudon and some related Eastern mediterranean firs. Silvae Genet., 42:351-359.
- FAST, W., DANCİK, B. P. and BOWER, R.C. 1986. Mating system and pollen contamination in a Douglas-fir Clone bank. Can. J. For. Res. 16: 1314-1319.
- FERET, P.P. and BERGMANN, F. 1976. Gel Electrophoresis of Proteins and Enzymes. In: J. P. MIKSCH (Ed), Modern Methods in Forest Genetics. Springer-Verlag, New York, pp: 49-77.
- FRIEDMAN, S.T. and ADAMS, W.T. 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of lobolly pine (Pinus taeda L.). Theor. Appl. Genet., 69:609-615.
- FURNIER, G. R. and ADAMS, W. T. 1986. Mating system in natural populations of Jeffrey pine. Amer. J. Bot., 72(4):1002-1008.
- GREENWOOD, M. S. and RUCKER, T. 1985. Estimating pollen contamination in Loblolly pine seed orchards by pollen trapping. Proc. 18th Southern Forest Tree Improv. Conf., May 21-23, 1985.
- GREENWOOD, M. S. and SCHMIDTLING, R. C. 1981. Regulation of catkinproduction. In:E. C. Franklin(Ed). Pollen Management Handbook. UDSA, Forest Service, Agric Handb. 587, Washington D. C., pp:20-25.

- HARJU, A. and MUONA, O. 1989. Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. Scand. J. For. Res. 4: 513-520.
- HELGASON, T. and ENNOS, R.A. 1991. The outcrossing rate and gene frequencies of a native scots pinewood population, determined using isozyme markers. Scottish-Forestry, 45 (2): 111-119.
- IŞIK, K. 1986. Altitudinal variation in *Pinus brutia* Ten.: Seed and seedling characteristics. Silvae Genet., 35:58-65.
- IŞIK, K. 1991. Amerika Birleşik Devletlerinin Güneydoğu eyaletlerinde orman ağacı ıslahı konusundaki uygulamalar ve gelişmeler. Orman Müh. Dergisi, 2:8-14, Ankara.
- KARA, N. 1996. Kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) Doğal Populasyonlarında İzoenzim Çeşitliliğinin Araştırılması. Ak.Ün.Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 77 s.
- KEPHART, S.R. 1990. Starch Gel Electrophoresis of Plant Isozymes: A Comparative Analysis of Techniques. Amer. J. Bot. 77(5): 693-712.
- KESKİN, S. 1999. Çameli-Göldağı Orijinli Kızılçam Tohum Bahçesinde Çiçek ve Kozalak Verimi Açısından Klonal Farklılıklar ve Çiçeklenme Fenolojisi. Orman Bak., Batı Akdeniz Ormancılık Arş. Müd. Yayınları, Yayın No:091, ss 96.
- KRUGMAN, S.L., STEIN, W.I., SCHIMITT, D.M. 1974. Seed Biology. In: Seeds of Woody Plants in the United States. C. S. Schopmeyer (Ed.), Agriculture Handbook No. 450, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. p:5-40.
- KRUTVSKII, K. V. POLITOV, D. V. And ALTUKOV, Y. P. 1995. Isozyme study of population genetic structure, Mating System and phylogenetic relationships of the five Stone pine species (subsection *cembrae*, section *strobi*, subgenus *strobilus*): In: Ph, Baradat, W. T. Adams and G, Muller-Starck (Eds), Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp:279-304.
- LADISLAV, P. and GÖMORY, D. 1995. Mating system in the seed orchards of European Larch (*Larix decidua* Mill.). In: Ph, Baradat, W. T. Adams and G,

- Muller-Starck (Eds), Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp:321-328.
- LADISLAV, P. LIDNGREN, D. and YAZDANI, R. 1993. Allozyme frequencies, outcrossing rate and pollen contamination in *Picea abies* seed orchards. Scand. J. For. Res., 8:8-17.
- LADISLAV, P. 1991. Clone identity and contamination in a Scots pine seed orchard. In: Proceedings of the Meeting of the Nordic Group for Tree Breeding 1991. Edited by D. Lindgren. Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Genetics and Plant Physiology Umeå rep.10, pp:22-32.
- LEWANDOWSKI, A. and MEINARTOWICZ, L. 1990. Inheritance of allozymes in *Larix deciduas* Mill. Silvae Genet., 39(5-6):184-188.
- LOWE, W.J. and WHEELER, N.C. 1993. Pollen contamination in seed orchards. In: D.L. Bramlett, G.R. Askew, T.D. Blush, F.E. Bridgwater and J.B. Jett (eds). Advances in Pollen Management. pp.49-54. USDA Agric. Handb. 698. Washington, DC.
- MURPHY, W. R., SITES, J. W. BUTH, D. G. and HAUFER, C. H. 1996. Proteins: Isozyme Electrophoresis (Part 2, Chapter 4). In: Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable B. K. (Eds), Molecular Systematics (2nd edition), Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts USA. 655 p.
- NAGASAKA, K. and SZMIDT, A.E. 1985. Multilocus analysis of external pollen contamination of a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchard. In: Gregorius, H.R. (Ed.) Population genetics in Forestry. Lecture Notes in Biomathematics. 60:134-138.
- NEALE, D. B. and ADAMS, W. T. 1985. The mating system in natural and shelterwood stands of Douglas-fir. Theor. Appl. Genet., 71:201-207.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89:583-590.
- OMI, S. K. and ADAMS, W. T. 1985. Variation in seed set and proportions of outcrossed progeny with clones, crown position, and top pruning in a Douglas-fir seed orchard. Can. J. For. Res., 16:502-507.

- PAKKANEN, A. and PULKINEN, P. 1991. Pollen production and background pollination levels in scots pine seed orchards of northern Finnish origin. In: Proceedings of the Meeting of the Nordic Group for Tree Breeding 1991. Edited by D. Lindgren. Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Genetics and Plant Physiology Umeå rep.10, pp: 14-21.
- PASCUAL, L., GARCIA, F.J. and PERFECTTI, F. 1993. Inheritance of isozyme variations in seed tissues of *Abies pinsapo* Boiss. Silvae Genet., 42(6):335-340.
- RITLAND, K. 1998. MLTR: Multilocus Mating System Program, Version 1.0. Dept. Of Forst Sciences, Univ. Of British Columbia, Vancouver, Canada.
- RITLAND, K. and EL-KASSABY, Y. A. 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as shown by an efficient multilocus model. Theor. Appl. Genet., 71:375-384.
- SCHMIDTLING, R.C. and GREENWOOD, M. S. 1993. Increasing pollen production. In: D. L. Bramlett, G. R. Askew, T. D. Blush, F. E. Bridgwater and J. B. Jett (Eds). Advances in Pollen Management. UDSA, Forest Service, Agric Handb. 698, Washington D. C., pp:33-39.
- SHAW, D. V. and ALLARD, R. W. 1982. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. Theor. Appl. Genet., 62:113-120.
- SHAW, D. V., KAHLER, A. L. and ALLARD, R. W. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. Proc. Natl. Acad. Sci., 78(2):1298-1302.
- SHIELDS, C.R., ORTON, T.J., STUBER, C.W. 1983. An Outline of General Resource Needs And Procedures for the Electrophoretic Separation of Active Enzymes from Plant Tissue. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (Eds), Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. pp:443-467.
- SMITH, D.B. and ADAMS, W.T. 1983. Measuring pollen contamination in clonal seed orchards with the aid of genetic markers. In: Proceedings, 17th Southern Forest Tree Improvement Conference; 1983 June 6-9; Athens, GA:69-77.

- SNIEZKO, R.A. 1981. Genetic and economic consequences of pollen contamination in seed orchards. In: Proceedings, 16th Southern Forest Tree Improvement Conference; 1981 May 27-28: Blacksburg, VA. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute: 225-233.
- SQUILLACE, A.E.. 1967. Effectiveness of 400-foot isolation around a slash pine seed orchard. *J. For.* 65:823-829.
- SQUILLACE, A.E. and LONG E.M. 1981. Proportion of pollen from nonorchard sources. In: E.C. Franklin (Ed.), Pollen Management Handbook, pp.15-19. USDA Agric. Handb. 587. Washington, DC.
- STUBER, C.W., WENDEL, J.F., GOODMAN, M.M. and SMITH, J.S.C. 1988. Techniques Scoring Procedures For Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.). Technical Bulletin 286, North Carolina Agricultural Research Service, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. 87 pp.
- ŞİMŞEK, Y. 1993. Orman Ağaçları Islahına Giriş. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları. Muhtelif yayınlar serisi No:65. Ankara, 312 s.
- USTA, H. Z. 1991. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) ağaçlandırmalarında hasılat araştırmaları. Orm. Arş. Enst. Teknil Bülten Serisi, 219, 138 ss., Ankara.
- ÜRGENÇ, S. 1982. Orman Ağaçları Islahı. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayın No:2836/293. İstanbul, 414 s.
- WANG, X. LINDGREN, D., SZMIDT, A.E. and YAZDANI, R. 1991. Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. *Scand. J. For. Res.* 6:379-385.
- WHEELER, N. and JECH, K. 1986. Pollen contamination in a mature, Douglas-fir seed orchard. Proc. IUFRO Conf. Breeding, Theory, Progeny testing of seed orchards. Oct. 13-17, 1986. Williamsburg, VA.
- WISELOGEL, A.E. 1986. Pollen Contamination in a Superior Loblolly Pine Seed Orchard. Proc. Ninth North Amer. For. Biol. Workshop. pp:274-278. June 15-18, Stillwater, OK, USA.
- YAHYAOĞLU, Z. VE ATASOY, H. 1983. Ladinde (*Picea orientalis* L. LINK) ıslah çalışmaları. Karadeniz Üniv. Dergisi, Orman Fak. Cilt:6, Sayı:2, 416-434.

- YAZDANI, R. and LINDGREN, D. 1991. Variation of pollen contamination in a Scots pine seed orchard. Silvae Genet., 40 (5-6): 243-245.
- YAZDANI, R., LINDGREN, D., SEYEDYAZDANI, F., PASCUAL, L. and ERIKSSON, U. 1995. Flowering, phenology, empty seeds and pollen contamination in a clonal seed orchard of *Pinus sylvestris* in Northern Sweden. In: Ph, Baradat, W. T. Adams and G, Muller-Starck (Eds), *Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees*, SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp:309-319.
- ZOBEL, B.J. and McELWEE, R.L. 1964. Seed orchards for the production of generally improved seed. Silvae Genet., 13:4-11.
- ZOBEL, B.J. and TALBERT, J. 1984. *Applied Forest Tree Improvement*. John Wiley and Sons, Inc. New York, 505 p.
- ZOBEL, B.J., BARBER, J., BROWN, C.L. and PERRY, T.O. 1958. Seed orchards- Their concept and management. J. Forest., 56:815-825.

EK-1: Çameli-Göldağı Orijinli Asar Tohum Bahçesinde Klonların Yerleşim Planı

☐ Bahçede dikim yapılmayan verimsiz, taşlı, kayalık alanlar

22 - 3 Örnekleme ağaçlar (Klon No-Ramet No)

*	Kuruluş fidan noktaları
---	-------------------------

Devamı arkada

1. **Introduction**
 2. **Background**
 3. **Methodology**
 4. **Results**
 5. **Discussion**
 6. **Conclusion**
 7. **References**
 8. **Appendix**
 9. **Index**
 10. **Table of Contents**

[illegible]

EK-2: TANIMLAR

Altlık (stock): Genotipini koruyarak üretmek istediğimiz ağaç yani ortetten alınan ve yeni bir bireyi geliştirecek olan kalemin aşılandığı anaçtır.

Çiçeklenme fenolojisi : Çiçeklerin yıl içinde gelişim çağına, mevsimlere ve iklimsel değişimlere bağlı olarak gösterdikleri değişikliklerdir.

Dimerik enzim: İki polipeptit alt biriminden oluşmuş bir enzimdir. Jelde homozigot genotipler tek bant heterozigot genotipler üç bant gösterir.

Dişi kozalakçık (dişi çiçek, seed cone) : İlerde gelişerek içinde tohumları taşıyan kozalağı verecek olan ve çok sayıda dişi spor kesesi (makrosporofil) taşıyan dişi çiçektir.

Döl denemeleri : Döllerin performansını karşılaştırarak, ebeveynlerin test edilmesidir. Yetiştirme ortamının sağladığı üstünlüklerle, iyi genlerden kaynaklanan kalıtsal üstünlükleri ayırt etmek üzere çok sayıda döl, kontrollü şartlarda karşılaştırılarak daha güvenli sonuçlar elde edilir.

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

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

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

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

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

Klon: Belirli bir ortetten aşı ya da çelik yoluyla üretilen ve aynı genotipik yapıya sahip olan fertlerin ait olduğu tüm gruptur.

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

Monomerik enzim: Tek bir polipeptit alt biriminden oluşmuş bir enzimdir. Jelde homozigot genotipler tek bant heterozigot genotipler iki bant gösterir.

Monomorfik lokus: En yaygın alelin frekansının %95'den daha fazla ise o lokus monomorfiktir.

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

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

Plantasyon: Fidan dikimi yoluyla yapılan ağaçlandırmalardır.

Plus ağaç: Fenotipik seleksiyona dayanılarak seçilen üstün nitelikli ağaçlara Plus ağaç adı verilir.

Polen göçü: Bir bitki popülasyonunun erkek çiçeklerden etrafa yayılan polenlerin, rüzgar veya canlılar aracılığı ile başka yerlere taşınması.

Polen kontaminasyonu (kirliliği): Bir tohum bahçesine bahçe dışındaki bireylerden gelen yabancı polenlerin bahçedeki dişi çiçekleri döleyerek tohum oluşmasına karışmasıdır.

Polimorfik lokus: En yaygın alelin frekansı %95'den az ise o lokus polimorfiktir.

Polimorfizm: Popülasyonda bir karakterin birden fazla alternatifinin bulunması

Popülasyon: Aralarında nesilden nesile gen alışverişi olabilen, aynı türden olup aynı gen havuzunu paylaşan, belirli bir orijinde yer alan ve bir ya da birden fazla meşcereden meydana gelen fertler topluluğudur.

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

Ramet: Belli bir ortetten alınan aşı kalemi ya da çeliklerin köklendirilmesi yoluyla elde edilen bireydir.

Tetramerik enzim: Dört polipeptit alt biriminden oluşmuş bir enzimdir. Jelde homozigot genotipler tek bant heterozigot genotipler beş bant gösterir.

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

ÖZGEÇMİŞ

Nuray KARA 1970 yılında Eskişehir'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1988 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 1992 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Ekim 1993 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı ve yüksek lisans eğitimine Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda devam etti. Yüksek lisans çalışmaları sırasında UNESCO'nun Biyoteknoloji bursu ile Mart-Haziran 1995 aylarında İsrail, Agricultural Research Organization'a giderek tez konusu ile ilgili çalışmalarda bulundu. 1996 yılında Yüksek Lisansını tamamlayarak doktora eğitimine başladı. Doktora çalışmaları sırasında TÜBİTAK Yurtiçi-Yurtdışı Bütünleştirilmiş Doktora Bursu ile Mart-Eylül 2000 tarihleri arasında Oregon State Üniversitesi'ne (Oregon, USA) giderek doktora tezi ile ilgili çalışmalarda bulundu. Halen Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.