

Orman Bakanlığı Yayın No: 75
Müdürlük Yayın No: 11

ISBN: 975-8273-18-3

KAZDAĞLARI'NDAKİ DOĞAL KARAÇAM
(*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb.)Holmboe)
POPULASYONLARINDA İZOENZİM ÇEŞİTLİLİĞİ

ODC: 165.3

ISOZYME VARIATION IN NATURAL
BLACK PINE (*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb.)Holmboe)
POPULATIONS SAMPLED FROM KAZDAĞLARI

Ercan VELİOĞLU
(Orman Mühendisi)

Burcu ÇENGEL
(Yüksek Biyolog)

Prof.Dr.Zeki KAYA
(ODTÜ Biyoloji Bölümü)

Adviye Ayper TOLUN
(Yüksek Biyolog)

TEKNİK BÜLTEN NO: 4

T.C.
ORMAN BAKANLIĞI
ORMAN AĞAÇLARI VE TOHURLARI ISLAH ARAŐTIRMA
MÜDÜRLÜĞÜ

FOREST TREE SEEDS AND TREE BREEDING
RESEARCH DIRECTORATE

ANKARA-TÜRKİYE

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
1.GİRİŞ.....	6
2.LİTERATÜR ÖZETİ.....	9
3.MATERYAL VE METOD	10
3.1.Populasyonların Tanıtımı ve Örneklenmesi.....	10
3.2.Tohumların Hazırlanması ve Laboratuvar Çalışmaları.....	11
3.3.Değerlendirme	13
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	14
4.1. İzoenzim Bant Yapıları.....	14
4.2. Populasyonların Genetik Yapıları.....	16
4.3. Populasyonlarda Genetik Mesafe.....	26
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	28
ÖZET	30
SUMMARY.....	31
KAYNAKÇA	32

ÖNSÖZ

Orman genetik kaynaklarının korunması, ulusal, bölgesel ve küresel düzeyde önemli bir konudur. Populasyon içi ve arası genetik varyasyon, ağaçların hastalık, zararlı ve iklim değişikliklerinin etkilerine karşı adapte olabilmeleri için temel olduğu gibi ağaç ıslah çalışmalarında da yararlanılan önemli bir unsurdur. Günümüzde populasyonların genetik yapılarının belirlenmesinde izoenzim, RFLP, RAPD ve PCR analizleri gibi yöntemler kullanılmaktadır.

“Genetik Çeşitliliğin Yerinde Korunması Projesi” kapsamında Kazdağları’nda hedef türlerden biri olan karaçam için seçilen populasyonlarda, izoenzim analizi ile genetik yapı belirlenerek, Gen Koruma ve Yönetim Alanları (GEKYA) önerilmiştir.

Bu çalışmada kozalakların toplanması için işçi temin eden AGM ve Muğla Fidanlık Müdürlüğü’ne, ayrıca çalışmanın her aşamasında desteğini gördüğümüz eski müdür yardımcımız İsmail PEKCAN’a, laborant Özlem KÖSE’ye, yardımlarını gördüğümüz Müdürlüğümüz orman mühendisleri Turgay EZEN ve Belkıs KORKMAZ ile bu çalışmanın gerçekleşmesinde hiçbir desteği esirgemeyen başta müdürümüz Ziya ARGIMAK olmak üzere tüm Müdürlüğümüz personeline teşekkür ederiz.

Bu çalışmanın ülke ve mesleğimize yararlı olmasını dileriz.

ANKARA, 1998

Ercan VELİOĞLU
Burcu ÇENGEL
Prof. Dr. Zeki KAYA
Adviye Ayper TOLUN

ÖZ

Bu çalışmada, Kazdağları'nda belirlenen yedi karaçam (*Pinus nigra* subspecies *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) populasyonunun (Eybekli, Asar, Katrandağ, Kalkım, Gürgendağ, Kapıdağ, Mıhlidere) genetik yapısı izoenzim markörleri yardımıyla belirlenmiştir. Çalışma Dünya Bankası'nca desteklenen "Genetik Çeşitliliğin Yerinde Korunması Projesi" kapsamında gerçekleştirilmiştir. Belirlenen populasyonlardan Müdürlüğümüzce tesadüfi örnekleme yöntemiyle 45'er ağaçtan kozalak toplanmıştır. Kozalıklardan elde edilen tohumlar, nişasta jel elektroforezi yöntemiyle izoenzim analizine tabi tutulmuş, elde edilen veriler POPGENE ve BIOSYS istatistik programları kullanılarak değerlendirilmiştir.

İzoenzim analizi sonuçlarına göre; çalışılan 16 enzim sisteminde 29 lokus gözlenmiş olup bunlardan 17'si polimorfiktir. Heterozigotluk 0.122 ile 0.186 değerleri arasında değişmektedir. Polimorfik lokus yüzdesi ise Asar ve Mıhlidere'de en yüksek (58.6), Kapıdağ'da ise en düşük (51.7) değerindedir. Toplam genetik çeşitliliğin % 94'ü populasyon içinde gözlenmiştir. Nei'nin genetik mesafe değerleri de populasyonlar arası farklılaşmanın fazla olmadığını göstermiştir.

Sonuç olarak populasyonların genetik çeşitlilik ve genetik mesafe değerlerine bakılarak Asar, Mıhlidere ve Gürgendağ populasyonlarının genetik açıdan farklılaştığı belirlenmiş ve bu alanlar "Gen Koruma ve Yönetim Alanı-GEKYA" olarak önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karaçam, izoenzim, genetik çeşitlilik, GEKYA.

ABSTRACT

This study was carried out to determine the genetic structure of the seven black pine (*Pinus nigra* subspecies *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) populations (Eybekli, Asar, Katrandağ, Kalkım, Gürgendağ, Kapıdağ, Mıhlidere) sampled from Kazdağları. Kazdağları is one of the pilot sites selected for the “*In situ* Conservation of Plant Genetic Diversity in Turkey Project” which is financed by the World Bank. Cones were collected from 45 mother trees for each selected population by random sampling. Isoenzymes from female megagametophytes were analyzed by starch gel electrophoresis, and data were analyzed by POPGENE and BIOSYS softwares.

Data provided by the isozyme analysis showed that heterozygosity ranged from 0.122 in Gürgendağ to 0.186 in Asar. Percentage of polymorphic loci was the highest in Asar and Mıhlidere populations (58.6) and lowest in Kapıdağ (51.7). The ninety-four percent of total genetic variation was observed within populations. Nei’s genetic distances also showed that differentiation among populations is relatively low.

Finally, based on the genetic diversity measures and genetic distance between populations; Asar, Mıhlidere and Gürgendağ seem to be genetically differentiated from others. Thus, these populations were recommended for *in situ* conservation as Gene Management Zones (GMZ).

Key Words: *Pinus nigra*, isoenzymes, genetic diversity, GMZ.

1.GİRİŞ

Ülkemizin kuzeyinde Avrupa ve Sibirya, doğusunda İran-Turan ve batısında Akdeniz flora bölgeleri bulunmaktadır. Ülkemiz topoğrafyasının yüksek ve özellikle dağ kuşaklarımızın son derece engebeli olması; yükseklik, eğim ve bakının kısa mesafelerde sık sık değişmesine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak, dağ kuşaklarımızda lokal iklim şartlarının ortaya çıkması, vejetasyon formasyonlarının da kısa mesafelerde farklı özellik almasına yol açmıştır. Engebeli topoğrafya relik bitkilerin barınmasına, bu sahalarda izolasyonun kuvvetli olması da endemik türlerin fazla sayıda olmasına yol açmıştır (Atalay, 1994).

Yapılan çalışmalar ülkemizde tür ve alttür düzeyindeki takson sayısının 10245 ve endemik takson sayısının da 3747 olduğunu ortaya koymuştur (Gemici, 1994). Balkan Yarımadası'nda 5000, Finlandiya'da 1500 türün bulunduğu gözönüne alındığında ülkemizin bitki türü zenginliği açısından ekvatorial bölgelerden sonra geldiği söylenebilir (Atalay,1994).

Sahip olduğumuz biyolojik çeşitliliğin yanısıra kültür bitkilerinin yabani akrabalarını, geçit formlarını ve orman ağaçlarımızın genetik çeşitliliğini de korumak zorundayız.

Genetik çeşitliliği yüksek olan türler ve ırklar, zamana ve yere göre değişen çevre koşullarına daha başarılı uyum gösterme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca genetik çeşitliliği yüksek olan türler ve ırklar, bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak değişen insan isteklerini karşılamada daha etkili ve yararlı olurlar (Işık, 1996).

Gerek ıslah gerekse koruma çalışmaları açısından populasyonların genetik yapısının belirlenmesi önem taşımaktadır (Conkle, 1980). Islah çalışmaları açısından seçilen populasyonların genetik çeşitliliğinin yüksek olması tercih edilir. Çünkü genetik tabanı geniş populasyonlarla başlanan ıslah çalışmalarının başarıya ulaşma şansı daha yüksek olacaktır.

Genetik yapının bilinmesi koruma çalışmaları açısından da önemlidir. Ancak en emin koruma stratejisi tüm populasyonları korumak olsa da pratikte bu mümkün değildir. Bu yüzden populasyonların genetik yapılarının belirlenerek korumada öncelikli alanların belirlenmesi önemlidir.

Orman ağaçlarında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde geleneksel yöntem fidan karakteristikleri ve seri kontrollü çaprazlamalarla elde edilen döllerin izlenmesidir (El-Kassaby, 1991). Bu çalışmalar bir veya daha fazla ortam gerektirip, ekonomik veya biyolojik öneme sahip kantitatif ve fizyolojik karakterlere dayanır. Bu tür karakterler birden fazla gen tarafından kontrol edilir ve çevrenin etkisi altındadır. Ancak, bu çalışmalar oldukça masraflı, yorucu, uzun süreli ve pahalıdır.

Bu klasik yöntem alternatif olarak son yıllarda moleküler düzeyde çalışmalar ilgi görmektedir. Bu teknikler arasında izoenzim analizi, RAPD, RFLP vb. teknikleri sayabiliriz.

İzoenzimler aynı enzimin farklı moleküler formları olduklarından aynı substratı kullanırlar ancak elektroforetik hareketleri farklıdır. İzoenzimler, çeşitli jeller (nişasta, cellulose acetate, poliakrilamid) üzerinde elektroforeze tabi tutulup enzime özel maddelerle boyandığında gözlenebilirler. Gözlenen bant yapıları genetik analize tabi tutulursa lokus ve alel yapıları belirlenebilir. Bu teknik 1970'lerden beri kullanılmakta ve bugün de popülerliğini korumaktadır. Çünkü bu markörler diğer tekniklere oranla daha ucuz ve kısa sürede sonuç alınabilir, her türe kolayca uygulanabilir. Bu yöntemle belirlenen genetik varyasyonlar diğer yapılarıdaki varyasyonların tahmininde kullanılmaz ancak bireylerin (multi-lokus kimlikleri) ve populasyonların karakterizasyonunda oldukça başarılıdır.

“Genetik Çeşitliliğin Yerinde Korunması Projesi” 1993 yılında, Küresel Çevre Fonu (Global Environment Facility-GEF) tarafından hibe edilen kaynakla başlatılmıştır. Bu proje ile önemli orman ağacı türlerinin ve bunların yabani akrabaları ile bazı otsu bitkilerin (gen kaynağı Anadolu olan türler) gen kaynaklarının yerinde korunması hedeflenmiştir. Bu amaçla seçilen pilot bölgelerden biri de Kazdağları'dır. Seçilen pilot bölgelerde envanter çalışmaları yapılarak hedef türler belirlenmiştir. Kazdağlarında belirlenen hedef türlerden biri de karaçamdır. Seçilen yedi doğal karaçam populasyonunda genetik çeşitliliğin belirlenmesi için kozalak toplanarak, bu kozalıklardan elde edilen tohumlarla izoenzim analizleriyle genetik çeşitlilik belirlenmeye çalışılmıştır.

Genetik açıdan farklılık gösteren populasyonlar aday Gen Koruma ve Yönetim Alanı (GEKYA) olarak önerilmiştir. Bu alanlarda, karaçamın genetik

eşitliliği yerinde (*in situ*) korunarak, yalnız tür düzeyinde değil, çok tür düzeyinde ve evrimsel gelişmelere olanak verecek boyut ve bütünlükte olmasına çalışılmıştır.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

Karaçam (*Pinus nigra*) ilk olarak 1768'de tanımlanmıştır (Vidakovic, 1991). Dünyadaki dağılımı düzensiz olduğundan ve morfolojik, anatomik ve fizyolojik özellikleri önemli varyasyonlar gösterdiğinden, birçok alttürden ve varyeteden oluşan bir tür olarak kabul edilmiştir. Anadolu karaçamı da bu alt türlerden biridir.

Ülkemizin önemli ağaç türlerinden biri olan Anadolu karaçamıyla (*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) ilgili pek fazla çalışma yoktur.

Genel olarak ibreliler diğer organizmalara oranla yüksek genetik çeşitliliğe sahiptirler (Hamrick ve ark.,1981). Bu türler arasında da karaçam genetik çeşitliliği en yüksek türlerden biridir. *P. nigra*'nın izoenzim çeşitliliğine yönelik yapılan ilk çalışmada Bonnet-Masimbert ve Bikay-Bikay (1978) GOT enzim sisteminde 4 lokus belirlemiş ve alt türleri de içeren 40 orjinin allel frekanslarını karşılaştırmıştır.

Bir diğer çalışmada, Nicolic ve Tucic (1983) 28 doğal karaçam populasyonunda genetik çeşitliliği izoenzim tekniğiyle incelemiştir. Bu çalışma da, populasyon içinde yüksek, populasyonlar arasında ise orta derece de genetik çeşitlilik ve %66 polimorfizm tesbit edilmiştir.

1984 yılında Fineschi, SKDH enzim sistemi yardımıyla 11 doğal karaçam populasyonunda iki alt türün (subsp. *laricio* ve subsp. *nigricans*) varyasyonlarını incelemiştir.

Silin ve Goncharenko (1996) yaptıkları çalışmada karaçamda ortalama genetik mesafeyi 0.012, Scaltsoyianes ve ark. (1994) ise 0.035 olarak bulmuşlardır. Aguinagalde ve ark. (1997) karaçamın 5 alttüründe yaptıkları çalışmada toplam genetik çeşitliliği %31.7, populasyonlar arası genetik çeşitliliği de %9.8 olarak tesbit etmişlerdir.

Son olarak Doğan ve ark. (1998) Kazdağları'ndan örneklenen karaçam populasyonlarında allellerin bağlılık ve kalıtımlarını incelemiş ve 41 lokus çiftinin 3 adedinde önemli ($p<0.05$) ortak segregasyon gözlemlemişlerdir.

3.MATERYAL VE METOD

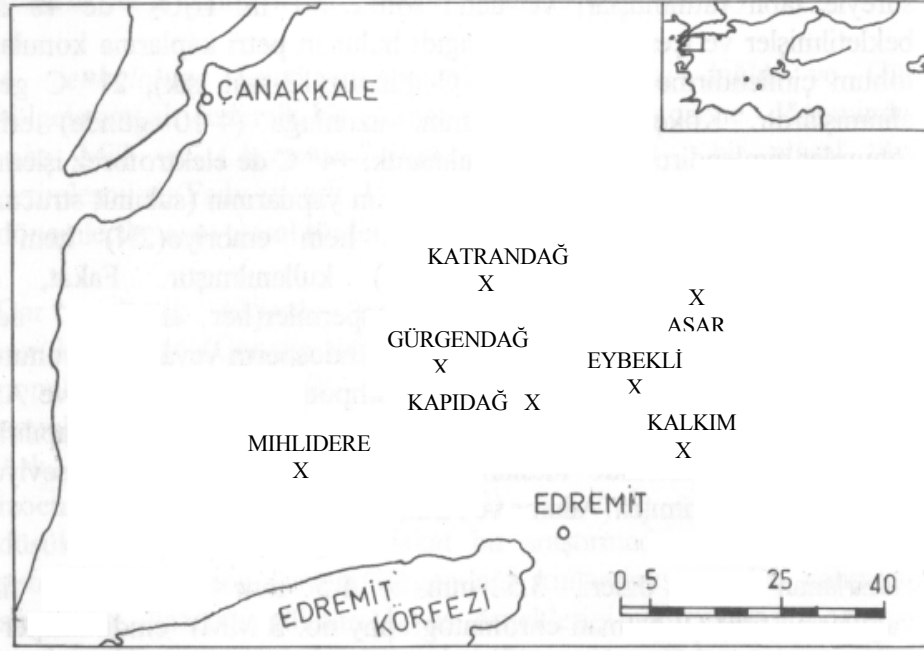
3.1.Populasyonların Tanıtımı ve Örneklenmesi:

Bu çalışmada, Kazdağındaki 7 doğal karaçam populasyonunda 315 aileden toplanan açık tozlaşma ürünü tohumlar kullanılmıştır. Örneklenen populasyonların konumları (Şekil.1) ve coğrafik özellikleri (Tablo.1) aşağıda verilmiştir. Her populasyonda aşağıdaki ilkelere uygun şekilde 45'er ağaç seçilerek kozalak toplanmıştır:

1. Aileler arasında en az 100 m mesafe olmalıdır.
2. Aileler arasında 300 m'den fazla yükseklik farkı olmamalıdır.
3. Aileler yaklaşık aynı yaşta olmalıdır.

Şekil 1. Çalışılan populasyonların konumları.

Figure 1. Locations of the studied populations.



Her ağaç numaralandırılmış ve toplanan kozalaklar her ağaç için ayrı bir torbaya yerleştirilmiştir. Kozalaklar Kızılcahamam tohum çıkarma evinde işlemlerden geçirilerek tohumlar elde edilmiştir.

Tablo 1. Çalışılan populasyonların coğrafik özellikleri

Table 1. Description of the studied populations.

Populasyon Population	Enlem Latitude	Boylam Longitude	Rakım Elevation	Bakı Aspect
Eybekli	39° 42'	27° 31'	1000	Batı
Asar	39° 49'	27° 08'	300	Güney
Katrandağ	39° 52'	27° 06'	950	Batı
Kalkım	39° 32'	27° 19'	750	Batı
Gürgendağ	39° 43'	26° 54'	1280	Karışık
Kapıdağ	39° 41'	26° 52'	1450	Kuzey-Doğu
Mihlidere	39° 40'	26° 42'	680	Kuzey

3.2. Tohumların Hazırlanması ve Laboratuvar Çalışmaları:

Tohumlar çalışma zamanına kadar +4 °C'de Müdürlüğümüz'ün soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir. Her aileden 10-15 adet tohum çalışma öncesi (enzim aktivitesinin başlaması için) çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumların kökcükleri 2-4 mm'ye ulaşıncaya özütleme işlemine kadar +4°C'de saklanmıştır. Tohumların endospermeleri embriyolarından ayrılarak özütleme tamponu ile buz banyosu içerisinde özütlendi. Tamamen ezilen endospermeler 15x3.5 mm boyutlarında hazırlanan filtre kağıtlarına (Whatman Chromatography Paper, No:3MM) emdirildi.

Bu çalışmada uygulanan laboratuvar teknikleri bazı değişikliklerle Conkle ve ark.(1982)'nin laboratuvar föyünden alınmıştır.

Bu çalışmada 16 enzim sistemini kapsayan 4 farklı jel sistemi kullanılmıştır. Tablo.2'de çalışılan enzim sistemlerine uygulanan akım

miktarları, enzimlerin kısaltmaları ve Enzim Komisyonu tarafından verilen numaraları verilmiştir.

Tablo 2. Çalışılan enzim sistemleri

Table.2. Studied enzyme systems

Tampon Sistem Buffer Systems	Enzim Sistemi Enzyme Systems	Kısaltması Abbreviations	E.C. No
A (65 mA)	Phosphoglucomutase	PGM	2.7.5.1
	Phosphoglucose isomerase	PGI	5.3.1.9
	Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1
	Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1
B (60 mA)	Mannose phosphate isomerase	PMI	5.3.1.8
	Superoxide dismutase	SOD	1.15.1.1
	Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.2
	Glutamate oxaloacetate transaminase	GOT	2.6.1.1
C (60 mA)	Acid phosphatase	ACP	3.1.3.2
	Aconitase hydratase	ACO	4.2.1.3
	Shikimate dehydrogenase	SKDH	1.1.1.25
	Menadione reductase	MNR	1.6.99.2
D (60 mA)	Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.41
	Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37
	Diaphorase	DIA	1.6.4.3
	6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-PGD	1.1.1.44

Elektroforez işlemi nişasta jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nişasta jel proteinlerin ayrılması için uygun ortam sağlar. Zehirli olmayıp, boşlukları proteinlere yakın büyüklükte olduğundan elek görevi yapar.

Bu çalışmada %11'lik nişasta jel çözeltisi kullanılmıştır. Fazla sayıda jelle çalışıldığından bir gün öncesinden hazırlanan jeller soğutulup, buzdolabında saklanmıştır. Jeller çalışılacak enzim sayısına göre ince veya kalın çerçeveler kullanılarak hazırlanmıştır.

Özütlenmiş örneklerin emdirildiği fitiller jelin bir tarafı boylamasına 3 cm uzaklıktan kesilerek, ayrılan yüze yerleştirildi. Ayrıca enzimlerin katettiği mesafeleri tahmin edebilmek için jelin her iki yanına boyalı fitiller yerleştirildi.

Yüklenen jeller tanklara yerleştirilip sünger tamponları ve uygun tampon çözeltileri eklendikten sonra yürütme (akım verme) işlemine geçilmiştir. Bu işlem buzdolabında jellere 4-5 saat süresince sabit akım (katotdan anota doğru) uygulanarak gerçekleştirildi.

Akım uygulanmaya başladıktan 15 dk. sonra akım kesilerek fitiller toplandı, daha sonra tekrar akım verilerek işleme devam edildi. Yürütme işlemine, yeniden akım verildikten sonra 4-5 saat daha devam edildi. Boyalı fitilin oluşturduğu görünür (renkli) bant A ve B sistemleri için 8 cm. ve C-D sistemleri için de yaklaşık 6 cm ilerlediğinde akım kesildi. Jeller çalışılacak enzim sayısına göre dilimlenerek, her dilim enzimlere ait özel boyaarla boyandı. Uygun boya karışımları jellere uygulandıktan sonra jeller 37°C'de inkübe edildi. Böylece elde edilen bant yapıları yorumlanarak kaydedildi.

3.3.Değerlendirme:

Yorumlama aşamasında bantların jel üzerinde gözleendiği yerler ve mesafeleri gözönüne alınarak lokus numaraları verilmiştir. Lokusların numaraları belirlendikten sonra (en ilerideki Lokus-1), aktif zonlar içindeki bant yapıları dikkate alınarak en ilerideki allel Allel-1, bir sonraki de Allel-2 olarak adlandırılmış ve bu şekilde bütün bantlar numaralandırılmıştır. Yorumlanarak kaydedilen lokus ve alleller çalışma sonunda son şekli verilerek veri tabanına girilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde POPGENE (Yeh ve ark, 1997) ve BIOSYS-1 (Swofford ve ark, 1989) istatistik programları kullanılmıştır. Veriler değerlendirilerek aşağıdaki değişkenler hesaplanmış ve sonuçları yorumlanmıştır:

- Allel frekansları
- Polimorfik lokus yüzdesi
- Beklenen ve Gözlenen Heterozigotluk
- Nei'nin Genetik Mesafe Değerleri
- Wright'ın F-İstatistik Değerleri.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA:

4.1.İzoenzim Bant Yapıları

Çalışılan 16 enzim sisteminde 29 lokus (aktif zon) ve 53 allel gözlenmiştir. Bu lokuslardan 17'si polimorfik, 12'si ise monomorfiktir. Bant yapıları ve allellerin orjinden uzaklıkları Şekil 2.'de verilmiştir. Enzim sistemlerinin açılma verilerine ait değerler Tablo 3.'de verilmiştir.

ACO: Tek lokus tarafından kontrol edilen bu enzim monomorfiktir. Gözlenen bant yapısı diğer *Pinus* türlerinden elde edilenlere benzerdir (Guries ve Ledig 1978, Adams ve Joly 1980b, Strauss ve Conkle 1986). Bu enzim sisteminin ilk karaçam örneklerindedir.

ACP: İki lokus tarafından kontrol edilen bu enzim sisteminde 3 allel gözlenmiştir. ACP-1 monomorfik olup her ailede gözlenememiştir, ACP-2 ise polimorfiktir. Ancak Doğan ve ark. (1998) ve Scaltsoyannes ve ark. (1994) karaçamda tek lokus gözlemlemişlerdir. Diğer çam türlerinde 1-4 lokus gözlenmiştir (Adams ve Joly 1980a, Strauss ve Conkle 1986).

ADH: Bu enzim sisteminde iki lokus gözlenmesine rağmen ADH-2 tüm örneklerde gözlenemediğinden analize dahil edilmemiştir. ADH-1'de iki allel gözlenmiştir. Bu enzim sistemi daha önce karaçamda çalışılmamıştır.

DIA: İki lokus tarafından kontrol edilen bu enzimde DIA-1'de 2 ve DIA-2'de ise tek allel elde edildi. Ancak DIA-2 analize dahil edilmedi. Sonuçlar diğer *Pinus* türlerinden elde edilenlere benzerdir (Parker ve Hamrick 1996, Conkle 1979). Her zon tek lokus kontrolü altındadır.

GDH: Bu enzim sisteminde monomorfik tek bant gözlenmiştir. Sonuçlar diğer koniferlerle benzerdir (Millar 1985, Adams ve Joly 1980a, Neale ve Adams 1981, Suyama *et al.*1992) ancak Scaltsoyannes ve ark.(1994) 3 allel gözlemlemiştir.

GOT: Üç lokus tarafından kontrol edilen bu enzim sisteminde GOT-1'de tek GOT-2 ve GOT-3'de ise 2 allel gözlendi. GOT-3'ün ikinci allelinin bir bantı katot yönünde gözlenmiştir. Sonuçlar Doğan ve ark.(1998) ve Scaltsoyannes ve ark. (1994)'in elde ettiği sonuçlara uygundur.

IDH: Bu enzim sisteminde 2 lokus ve her lokusta 2 allel gözlendi. İbrelilerde nadir olarak polimorfik olduğu bildirilmektedir. King ve Dancik (1983) *Picea*

glauca'da bir lokusta üç allele bazende katod tarafında ikinci lokus gözlemlenmiştir. Strauss ve Conkle (1986)'da *Pinus attenuata* içinde buna benzer sonuçlar bulunmuşlardır. Her bir zonun, Mendel açılım yasalarına göre, tek bir lokusun kontrolü altında olduğu bulunmuştur.

LAP: 2 aktif zonda toplam 3 allel gözlemlendi. LAP-1'de tek LAP-2'de ise 2 allel elde edildi. Beklenen 1:1 oranından sapma olmasına rağmen sonuçlar Doğan ve ark. (1998)'nın sonuçlarıyla paraleldir.

MDH: Bu enzim sisteminde 4 lokus tesbit edildi. MDH-1 ve MDH-3'de iki allel, MDH-4'de üç allel ve MDH-2'de ise çift bantlı tek allel elde edildi. Elde edilen sonuçlar Doğan ve ark. (1998)'in çalışmasıyla ve diğer koniferlerde yapılan çalışmalarla (Millar 1985, Strauss ve Conkle 1986, Adams ve ark. 1990) paraleldir. MDH-3 lokusu 1:1 oranından sapma göstermiştir. Açılımda görülen sapmalar muhtemelen tesadüfi örneklemeden ileri gelmektedir.

MNR: Bu enzim sisteminde ikişer allelli 2 lokus gözlenmiştir. Karaçamla ilgili veri bulunmamakla beraber diğer ibrelilerde (Kim ve ark.1997, Fallour 1997) benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her bir zonun Mendel açılımı yasalarına göre tek bir lokusun kontrolü altında olduğu bulunmuştur.

PGI: İki lokusa ait 4 allel (PGI-1'de 1, PGI-2'de 3) gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Doğan ve ark.(1998)'nin çalışmasıyla aynı olup diğer ibrelilerde elde edilen sonuçlarla (Strauss ve Conkle 1986, King and Dancik 1983, Cheliak ve Pitel 1985, Adams ve ark. 1990) benzerdir. Her bir zonun Mendel açılımı yasalarına göre tek bir lokusun kontrolü altında olduğu bulunmuştur.

PGM: Bu enzim sisteminde 2 lokus elde edilmesine rağmen ikinci lokus analize dahil edilmemiştir. PGM-1'de 2 allel gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Doğan (1998)'in çalışmasıyla ve diğer koniferlerde yapılan çalışmalarla (Guries ve Ledig 1978, Adams ve Joly 1980a, Yeh ve El-Kassaby 1980, Adams ve ark. 1990) benzerdir. Her bir zon tek lokus kontrolü altında bulunmaktadır.

PMI: Bu enzim sisteminde tek lokus ve tek allel gözlenmiştir. Karaçama ait başka çalışma yoktur ancak Millar (1985) iki monomorfik zon tesbit etmiştir. Ayrıca Strauss ve Conkle (1986) 2 polimorfik zon belirlemiştir.

SKDH: Gözlenen 2 lokusta 3 allel tesbit edilmiştir. SKDH-1 monomorfik ancak SKDH-2 polimorfiktir. Elde edilen sonuçlar diğer çalışma sonuçlarıyla (Doğan ve ark. 1998; Fineschi, 1984) aynıdır.

6PGD: Bu enzim sisteminde 2 lokus ve 5 allel gözlenmiştir. Birinci lokusta 2 ve ikinci lokusta da 3 allel elde edilmiştir. Sonuçlar Doğan ve ark.(1998) ve Scaltsoyiannes ve ark. (1983)'nin sonuçlarıyla aynıdır. Her bir zonun Mendel açılımı yasalarına göre tek bir lokusun kontrolü altında olduğu bulunmuştur.

SOD: Gözlenen iki lokusta da tek allel tesbit edilmiştir. Sonuçlar Doğan ve ark. (1998)'nin sonuçlarıyla aynıdır. Bu enzim sisteminde yapılan ikinci çalışmadır.

4.2.Populasyonların Genetik Yapıları

Çalışılan 16 enzim sisteminde toplam 29 lokus ve 53 allel gözlenmiştir. Bu lokuslardan 17'si polimorfik 12'si ise monomorfiktir (LAP-1, PGI-1, GOT-1, GOT-2, PMI, SOD-1, SOD-2, GDH, ACP-1, ACO, SKDH-1,MDH-2). Gözlenen allel frekansları Tablo 3.'de verilmiştir.

Bazı alleller her populasyonda gözlenmemiş veya bir populasyonda sık gözlenen bir allel diğer bir populasyonda nadiren gözlenmiştir. Örneğin PGM'in ikinci alleli Kalkım populasyonunda gözlenmemiştir, diğer populasyonlardaki frekansı çok düşüktür. IDH'nin ikinci alleli Katrandağ ve Kapıdağ dışında tüm populasyonlarda gözlenmiştir.

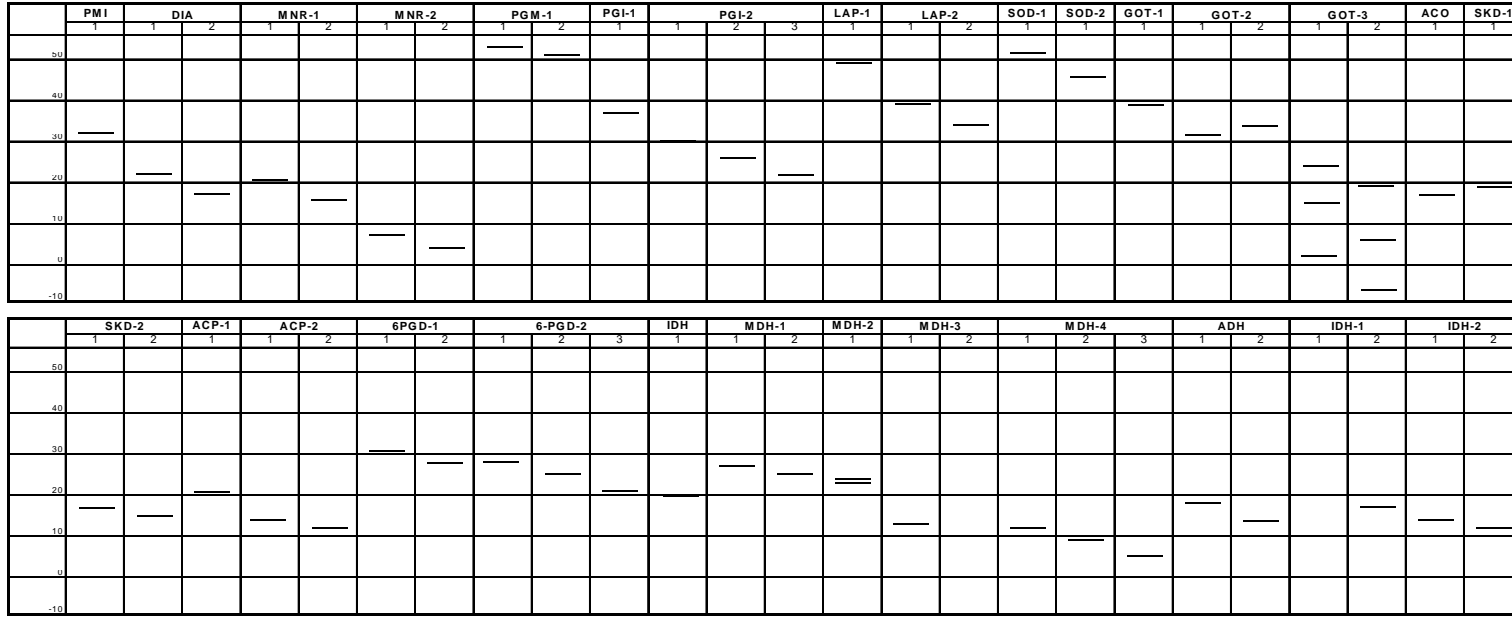
Populasyonların genetik çeşitliliğini belirlemede polimorfik lokus yüzdesi, lokus başına düşen ortalama allel sayısı (allel zenginlik) ve ortalama heterozigotluk gibi kriterler kullanılmıştır. Bulunan değerler Tablo 4.'de verilmiştir.

□ **Polimorfik Lokus Yüzdesi:** 0.99 kriterinde hesaplanan polimorfik yüzdesi %55.17 ile %58.62 arasında değişmiştir. Asar, Gürgendağ ve Mıhlıdere populasyonlarının polimorfik lokus yüzdesi 58.62 diğer populasyonları ise 55.17'dir. Ortalama polimorfik yüzdesi ise %56.65 (± 0.007) olarak hesaplanmıştır. İbreliler için polimorfik lokus oranı %53.4 olarak bildirilmiştir (Hamrick ve ark. 1992). Gözlenen polimorfik lokus oranı bu değerle uyumludur.

Tablo 3. Heterozigot bireylerde endosperm açılımları ve 1:1 uygunluk (X^2) testi.

Table 3: Segregation of megagametophytes in heterozygous individuals and goodness-of-fit to the expected 1:1 ratio (X^2).

Lokus Locus	Allelik Kombinasyonlar Allelic Combinations		Gözlenme Sayısı Number.of Observations		Sapmalar Deviation	
	F	S	F	T	$X^2(I)$	Olasılık Probability
PGM	1	2	64	128	0.008	>0.05
IDH-1	2	3	130	248	0.488	>0.05
IDH-2	1	2	32	64	0.016	>0.05
DIA	1	2	214	440	0,275	>0.05
LAP-2	1	2	296	512	12.18	<0.001
MNR-1	1	2	350	688	0.17	>0.05
MNR-2	1	2	271	552	0.14	>0.05
ACP-2	1	2	295	624	1.74	0.1-0.25
GOT	1	2	391	769	0.187	>0.05
ADH	1	2	383	704	5.28	0.01-0.025
SKDH-2	1	2	377	744	0.19	>0.05
6PGD-1	1	3	370	728	0.166	>0.05
MDH-1	1	2	386	792	0.456	>0.05
MDH-3	1	2	296	512	12.18	<0.001
6PGD-2	1	2	231	472	0.17	>0.05
6PGD-2	2	3	200	384	0.58	0.25-0.5
MDH-4	1	2	104	221	0.652	0.25-0.5
MDH-4	2	3	134	272	0.033	>0.05
MDH-4	1	3	29	64	0.391	>0.05
PGI-2	1	2	422	833	0.12	>0.05
PGI-2	2	3	388	752	0.7	0.25-0.5
PGI-2	1	3	63	128	0.008	>0.05



Şekil 2. İzoenzim bant yapıları
 Figure 2. Allozyme banding patterns.

□ **Ortalama Allel Sayısı:** Lokus başına allel sayısı 1.65 ile 1.69 arasında değişmiş olup ortalaması 1.67 (± 0.1)'dir. Ortalama allel sayısı Eybekli, Kalkım ve Kapıdağ'da 1.65, Katrandağ'da 1.66, Asar, Gürgendağ ve Mıhlidere'de 1.69 olarak hesaplanmıştır. İbreliler için bu değer 1.83 olarak verilmiştir (Hamrick ve ark. 1992). Bulunan ortalama allel sayısı bu değere uyumludur.

□ **Ortalama Heterozigotluk:** Gözlenen heterozigotluk 0.122 (Gürgendağ) ile 0.186 (Asar) arasında değişmiş olup ortalaması 0.151'dir. Diğer taraftan beklenen heterozigotluk ise 0.248 (Katrandağ) ile 0.283 (Asar) arasında olup ortalama 0.262'dir. Beklenen heterozigotluk tüm ibreliler için ortalama olarak 0.151 ve çamlar için 0.136 verilmiştir (Hamrick ve ark. 1992). Bizim bulduğumuz sonuçlar belirtilen ortalama değerlerle paraleldir.

Beklenen ve gözlenen heterozigotluklar karşılaştırıldığında gözlenen heterozigotluğun beklenenden fazla olduğu görülmüştür. Bu fark popülasyonlarda heterozigotluğu azaltır yönde bazı etkenler olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. Çalışılan Popülasyonlarda Gözlenen Allel Frekansları

Table 4. Allele Frequencies Observed for the Studied Populations

Lokus Locus	Allel Allele	EYB	ASR	KAT	KAL	GÜR	KAP	MIH
LAP-1	1	1	1	1	1	1	1	1
LAP-2	1	0.522	0.611	0.744	0.622	0.733	0.756	0.411
	2	0.478	0.389	0.256	0.378	0.267	0.244	0.589
PGI-1	1	1	1	1	1	1	1	1
PGI-2	1	0.119	0.156	0.167	0.179	0.36	0.578	0.344
	2	0.393	0.433	0.489	0.56	0.43	0.389	0.44
	3	0.488	0.411	0.344	0.262	0.209	0.033	0.211
PGM	1	0.878	0.778	0.889	1	0.956	0.976	0.744
	2	0.122	0.222	0.111	0	0.044	0.024	0.256
GOT-1	1	1	1	1	1	1	1	1
GOT-2	1	1	1	1	1	1	1	1
GOT-3	1	0.389	0.356	0.603	0.3	0.456	0.3	0.256
	2	0.611	0.644	0.397	0.7	0.544	0.7	0.744
PMI	1	1	1	1	1	1	1	1
SOD-1	1	1	1	1	1	1	1	1

SOD-2	1	1	1	1	1	1	1	1
GDH	1	1	1	1	1	1	1	1
ADH	1	1	0.804	0.756	0.538	0.714	0.663	0.553
	2	0	0.196	0.244	0.463	0.286	0.338	0.447
ACP-1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACP-2	1	0.378	0.467	0.533	0.5	0.756	0.644	0.489
	2	0.622	0.533	0.467	0.5	0.244	0.356	0.511
ACO	1	1	1	1	1	1	1	1
MNR-1	1	0.556	0.711	0.689	0.593	0.411	0.578	0.722
	2	0.444	0.289	0.311	0.407	0.589	0.422	0.278
MNR-2	1	0.733	0.556	0.578	0.558	0.6	0.622	0.6
	2	0.267	0.444	0.422	0.442	0.4	0.378	0.4
SKDH-1	1	1	1	1	1	1	1	1
SKDH-2	1	0.567	0.511	0.578	0.7	0.622	0.5	0.711
	2	0.433	0.489	0.422	0.3	0.378	0.5	0.289
6PGD-1	1	0.567	0.568	0.789	0.489	0.622	0.511	0.511
	2	0.433	0.432	0.211	0.511	0.378	0.489	0.489
6PGD-2	1	0.444	0.273	0.167	0.389	0.256	0.156	0.244
	2	0.467	0.625	0.489	0.5	0.7	0.622	0.622
	3	0.089	0.102	0.344	0.111	0.044	0.222	0.133
DIA	1	0.533	0.65	0.611	0.837	0.844	0.722	0.467
	2	0.467	0.35	0.389	0.163	0.156	0.278	0.533
IDH-1	1	0.644	0.613	0.744	0.678	0.722	0.7	0.933
	2	0.356	0.388	0.256	0.322	0.278	0.3	0.067
IDH-2	1	0.5	0.557	1	0.5	0.5	1	0.875
	2	0.5	0.429	0	0.5	0.5	0	0.125
MDH-1	1	0.478	0.557	0.644	0.556	0.544	0.611	0.611
	2	0.522	0.443	0.356	0.444	0.456	0.389	0.389
MDH-2	1	1	1	1	1	1	1	1
MDH-3	1	0.578	0.682	0.411	0.5	0.589	0.6	0.5
	2	0.422	0.318	0.589	0.5	0.411	0.4	0.5
MDH-4	1	0.489	0.205	0.022	0.189	0.476	0.3	0.044
	2	0.356	0.455	0.714	0.733	0.478	0.456	0.744
	3	0.156	0.341	0.264	0.078	0.056	0.244	0.211

Tablo 5. Çalışılan Populasyonların Genetik Çeşitlilik Değişkenleri
Table 5. Genetic Variability Parameters for Studied Populations

Populasyon Population	Ortalama Allel Sayısı Mean Number of Alleles	Polimorfik Lokus Yüzdesi Proportion of Polymorphic Loci	Ortalama Heterozigotluk	
			Gözlenen Mean Heterozygosity Observed	Beklenen Expected
EYBEKLİ	1.65	55.17	0.138	0.270
ASAR	1.69	58.62	0.186	0.283
KATRANDAĞ	1.66	55.17	0.166	0.248
KALKIM	1.65	55.17	0.138	0.265
GÜRGENDAĞ	1.69	58.62	0.122	0.260
KAPIDAĞ	1.65	55.17	0.16	0.25
MIHLIDERE	1.69	58.62	0.148	0.259
Ortalama (Mean)	1.67	56.65	0.151	0.262
St. Hata (s.e.)	0.1	0.007	0.036	0.045

Ayrıca populasyonların genetik çeşitliliğin belirlenmesinde Nei'nin G-İstatistiği (Nei, 1973) ve Wright'ın F-İstatistiği (Nei, 1987) kullanılmıştır. Tüm populasyonlar için (polimorfik lokuslar için) hesaplanan genetik çeşitlilik değerleri Tablo 5.'de, Wrightın F-İstatistiği sonuçları da Tablo 6'da verilmiştir.

Örneklenen 7 populasyonda genetik çeşitlilik oldukça yüksektir ancak %94 oranında populasyonlar içinde yoğunlaşmıştır, populasyonlar arasında belirgin farklılıklar yoktur. Populasyonlar arası genetik çeşitliliğin toplam genetik çeşitliliğe oranı (G_{ST}) ortalama 0.06 olarak bulunmuştur. Bu sonuç karaçam ıslah programında populasyon içi seleksiyone önem verilmesi gerektiğini ve GEKYA seçiminde çok sayıda küçük populasyonun ayrılması yerine, genetik çeşitliliği fazla olan bir kaç populasyonun seçilmesinin uygun olacağını gösterir (Kara, 1996).

İbreliler genelde yüksek genetik çeşitliliğe sahiptirler. İzoenzim analizleri de özellikle orman ağaçlarının genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Hamrick ve Godt, 1989). Bu yüksek varyasyon geniş coğrafik dağılım ve bazı hayat karakteristikleriyle açıklanmaktadır. Bunlar; generasyon uzunluğu, populasyon yapısı, polinasyon mekanizması ve gen akışıdır (El Kasaby, 1991). Karaçamın yüksek genetik çeşitliliği de mikro çevrelere adapte olabilmeye mekanizmalarına bağlanmıştır (Kaya ve Temerit, 1994).

Tohum ve polenin % 90'lık kısmını yaklaşık 100 m yarıçapına yayabilen orman ağaçlarında doğal olarak populasyon içi genetik çeşitlilik yüksek olmaktadır. İzoenzimler çevresel faktörlerden etkilenmemelerine rağmen, evrimsel güçler (doğal seçim, gen akımı veya göç, mutasyon) enzimleri kodlayan genlerin yapısını ve allel frekansları değiştirebilir. Her bir populasyonda yerel seleksiyon farklılıklarından dolayı farklı alleller bulunabilir veya bütün populasyonlar aynı allele sahip olsalar bile, bu allelin her bir populasyondaki frekansı farklı olabilir. Kısacası, orman ağaçlarının tür içi genetik zenginliği de yerel koşullara uyum yapmış alt populasyonlardan oluşur (Kaya,1996). Ayrıca populasyon içi genetik çeşitliliğin fazla olması, karaçamın ıslah çalışmalarında üstün genetik kazanç vereceğininde işaretidir.

Wright'ın F-İstatistiği ile genetik çeşitliliğin populasyonlar arasındaki dağılımı ve Hardy-Weinberg dengesinden sapmalar bulunmuştur. F_{IS} değeri her bir populasyon içindeki, F_{IT} ise tüm populasyonlarda Hardy-Weinberg dengesinde beklenen heterozigotluk düzeyindeki sapma derecesini vermektedir. F_{ST} değeri ise her bir lokusun populasyonlar arasındaki farklılaşmasını göstermektedir. F_{IS} değeri sadece PGI-2 lokusunda negatif bulunmuş olup ortalama olarak 0.4159'dir. F_{IS} değerinin 0.4159 olması çalışılan populasyonlarda homozigotluğun beklenenden yaklaşık %42 fazla olduğuna işaretir. Populasyonların tümü düşünüldüğünde ortalama sapma yaklaşık %45 olarak belirlenmiştir. Homozigotluktaki aşırılık dışarıdan döllen türlerde genel olarak bulunmaktadır. Wahlund etkisi, benzer genotipler arasındaki eşleşme gibi nedenlerden dolayı homozigotların aşırılığı gözlenebilir. Ayrıca F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} değerlerinin bütün lokuslarda farklı değerlerde olması her populasyondaki her bir lokusun çevresel faktörlerdeki değişimlerden bağımsız olarak etkilendiğini gösterir.

Tablo 6. Çalışılan Populasyonların Genetik Çeşitlilik Parametreleri
Table 6. Genetic Diversity Parameters Observed for Studied Populations

LOCUS	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
6-PGD-1	0.488	0.471	0.017	0.035
6-PGD-2	0.571	0.546	0.025	0.044
ACP-2	0.666	0.608	0.057	0.086
ADH	0.405	0.361	0.043	0.107
DIA	0.442	0.409	0.034	0.077
GOT-3	0.471	0.446	0.025	0.053
IDH-1	0.404	0.385	0.019	0.046
IDH-2	0.415	0.316	0.099	0.239
LAP-2	0.467	0.439	0.028	0.061
MDH-1	0.49	0.485	0.005	0.011
MDH-3	0.494	0.481	0.013	0.026
MDH-4	0.583	0.522	0.061	0.105
MNR-1	0.476	0.456	0.21	0.044
MNR-2	0.476	0.468	0.008	0.018
PGI-2	0.651	0.614	0.037	0.057
PGM	0.198	0.181	0.017	0.084
SKDH-2	0.481	0.47	0.011	0.024
Mean	0.288	0.269	0.025	0.060
s.e.	0.048	0.043	0.0058	0.010

H_S : Populasyon içi genetik çeşitlilik (expected heterozygosity in subpopulations)

H_T : Toplam genetik çeşitlilik (total genetic diversity)

D_{ST} : Populasyonlar arası genetik çeşitlilik (average diversity between populations)

G_{ST} : Genetik farklılaşma katsayısı (relative magnitude of genetic differentiation)

F değerlerindeki sapmalara rağmen populasyon içi genetik çeşitliliğin yüksek olması populasyonlarda genetik çeşitliliğin homojen olarak dağılmadığını gösterir. F_{ST} değeri 0.063 olan $F_{ST}-G_{ST}$ eşitliğine ve amlar için ortalama olarak verilen 0.065'e (Hamrick ve ark. 1992) uygundur. Populasyonların genetik çeşitliliğini belirleyen faktörlerden biri olan gen akışı $Nm=3.719$ 'dur. Bu rakam ortalama gen akışı olan 4.750'e (Hamrick ve ark. 1992) paraleldir.

Tüm populasyonlarda beklenen heterozigotluğun (H_T) 0.198 (PGM) ile 0.666 (ACP-2) arasında değiştiği tesbit edildi. H_S yani alt populasyonlarda beklenen heterozigotluk ise 0.181 (PGM) ile 0.614 (PGI-2) değerleri arasındadır. Beklenen ortalama genetik çeşitlilik ise $H_S=0.269$ olarak belirlendi ki bu da genetik çeşitliliğin büyük oranda populasyonlar içinde yoğunlaştığını göstermiştir. Populasyonlar arası ortalama heterozigotluğun $D_{ST}=0.025$ olarak bulunduğu görülür. Bu da populasyonlar arası farklılaşmanın çok düşük olduğunu göstermiştir. G_{ST} 'de 0.06 olarak hesaplanmış olup toplam genetik çeşitliliğin yalnızca %6'sının alt-populasyonlar arasında, %94'ünün ise populasyonlar içinde olduğunu göstermiştir.

Tablo 7. 17 Polimorfik Lokuslar için Wright'ın F-İstatistiği Sonuçları
 Table 7. Summary of F-Statistics for 17 Polymorphic Loci

Locus	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	N _m
6PGD-1	0.3877	0.4105	0.0372	6.4625
6PGD-2	0.3742	0.4021	0.0446	5.3547
ACP-2	0.4669	0.4955	0.0536	4.4121
ADH	0.0917	0.1887	0.1069	2.0896
DIA	0.5626	0.5977	0.0803	2.8643
GOT-3	0.2971	0.3331	0.0513	4.6228
IDH-1	0.7414	0.7534	0.0464	5.1404
IDH-2	0.8857	0.913	0.239	0.7959
LAP-2	0.5305	0.559	0.0609	3.8575
MDH-1	0.3348	0.3419	0.0108	22.9832
MDH-3	0.4308	0.4461	0.0268	9.0719
MDH-4	0.5886	0.6312	0.1035	2.1657
MNR-1	0.3896	0.4163	0.0437	5.4707
MNR-2	0.5544	0.5603	0.0133	18.5789
PGI-2	-0.1583	-0.0764	0.0707	3.2861
PGM	0.7084	0.7327	0.0833	2.7494
SKDH-2	0.3699	0.3857	0.0252	9.6855
Mean	0.4159	0.4522	0.063	3.719

F_{IS} : Populasyon içi fiksasyon indeksi (Fixation index for subpopulations)

F_{IT} : Tüm populasyonlar için fiksasyon indeksi (Total fixation index)

F_{ST} : Populasyonlar arası genetik çeşitlilik (Average diversity between populations)

N_m : Gen akış katsayısı (Gene flow)

4.3. Populasyonlarda Genetik Mesafe

Nei'nin genetik benzerlik-mesafe ölçütlerinde populasyonların genetik olarak uzaklıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çalışılan populasyon çiftleri için Nei'nin (1972) Standart Genetik Benzerliği (I) ve Standart Genetik Mesafesi (D) örnek sayısından bağımsız olarak (Nei, 1978) hesaplanarak Tablo 6.'da verilmiştir.

Populasyonlar arasındaki genetik mesafe 0.0099 ila 0.0396 arasında değişmiştir. Genetik benzerlik ise 0.9610 ile 0.9902 arasında değişen değerlerdedir. Çalışılan populasyonlardan Eybekli-Asar en yakın, Eybekli-Kapıdağ ise en uzak populasyonlar olarak belirlenmiştir. Ortalama genetik mesafe 0.0253 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç Scaltsoyiannes ve ark.(1994)'nın sonuçlarıyla paraleldir. Bu sonuçlara göre Kazdağlarındaki Karaçam populasyonları arasında genetik mesafenin fazla olmadığını söyleyebiliriz.

Tablo 8. Populasyonların genetik mesafe ve benzerlik değerleri

Table 8. Genetic identities and distances of the populations

	EYB	ASR	KAT	KAL	GÜR	KAP	MIH
EYB		0.9902	0.9623	0.9746	0.9762	0.9610	0.9621
ASR	0.0099		0.9775	0.9851	0.9818	0.9775	0.9776
KAT	0.0384	0.0228		0.9699	0.9663	0.9793	0.9773
KAL	0.0257	0.0151	0.0306		0.9869	0.9774	0.9772
GÜR	0.0241	0.0183	0.0343	0.0132		0.9809	0.9612
KAP	0.0389	0.0228	0.0209	0.0259	0.0193		0.9767
MIH	0.0386	0.0227	0.0230	0.0231	0.0396	0.0236	

Ayrıca populasyonlar arası farklılaşmanın belirlenmesi için Nei'nin genetik benzerlik değerleri (Nei 1978) ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) metodu kullanılarak bir dendogram oluşturulmuştur (Şekil 2.). Dendogramın oluşumunda populasyonun coğrafik

konumları belirleyici olmuştur. Dendograma göre çalışılan populasyonlar 2 ana kola ayrılmıştır. Her iki kol da kendi arasında iki gruba ayrılmıştır. Birinci kolun birinci gurubunda Eybekli ve Asar, ikinci gurubunda ise Kalkım ve Gürgendağ populasyonları görülmektedir. İkinci kolda Katrandağ ve Kapıdağ bir gurup oluşturmuştur, Mıhlidere ise tek başına ayrı grup oluşturmuştur.

Birinci kola ayrılan populasyonlar; tablo 6'dan görüleceği gibi genetik olarak birbirine yakın olan popasyonlardır (Asar-Eybekli,Kalkım-Asar, Gürgendağı-Asar).

Asar 300 m.'lik rakımıyla karaçamın ekstrem populasyonlarından biridir. Populasyonların bakıları ve karaçamın kuzey bakıları tercih etmediği gözönüne alındığında Kapıdağ (kuzey-doğu) ve Mıhlidere (kuzey) populasyonlarının farklı olduğu görülür. Alt grupların oluşumunda ortalama allel sayısı ve polimorfik lokus yüzdesi belirleyici olmuştur.

```
***** EYBEKLI
*****
* ***** ASAR
*****
* * ***** KALKIM
* *****
* ***** GURGENDAG
*
* ***** KATRANDAĞ
* ***
***** KAPIDAG
*
***** MIHLIDERE
```

Şekil 2. Populasyonların farklılaşmasını gösteren dendogram.

Figure 2. Dendogram constructed for population's differentiation

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Dünya Bankası'nca desteklenen "Genetik Çeşitliliğin Yerinde Korunması Projesi" kapsamında pilot bölge olarak seçilen Kazdağları'nda hedef türlerden karaçamın izoenzim çeşitliliği üzerine çalışılmıştır.

Yapılan analizler ve istatistiki değerlendirmeler karaçamın genetik yapısı hakkında önemli bilgiler vermiştir.

Çalışılan 16 enzim sisteminde, 17'si polimorfik 29 lokus gözlenmiştir. Gözlenen genel fenotipler diğer ibreli türlerle benzerlik gösterdi. En yaygın allelin frekansının 0.99 veya daha fazla ($p < 0.01$) olduğu durumlarda polimorfizm %55.17 ile %58.62 arasında değişmiştir. Ortalama allel sayısı 1.67 ve beklenen heterozigotluk %26 olarak belirlenmiştir. Gözlenen heterozigotluklar açısından Eybekli ve Asar en yüksek heterozigotluğa sahiptir.

Beklenen ve gözlenen heterozigotluklar karşılaştırıldığında gözlenen heterozigotluğun beklenenden fazla olduğu görülmüştür. Bu fark popülasyonlarda heterozigotluğu azaltır yönde bazı etkenler olduğunu göstermiştir.

Örneklenen popülasyonların genetik çeşitliliği oldukça yüksektir fakat çeşitlilik %94 oranında popülasyonlar içinde yoğunlaşmıştır, popülasyonlar arası belirgin farklılıklar yoktur. Popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin toplam genetik çeşitliliğe oranı (G_{ST}) ortalama 0.06 olarak bulunmuştur.

İbreliler genelde yüksek genetik çeşitliliğe sahiptirler. İzoenzim analizleri de özellikle orman ağaçlarının genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Hamrick ve Godt, 1989). Bu yüksek varyasyon geniş coğrafik dağılım ve bazı hayat karakteristikleriyle açıklanmaktadır, bunlar jenerasyon uzunluğu, popülasyon yapısı, polinasyon mekanizması ve gen akışıdır. Karaçamın yüksek genetik çeşitliliği de mikro çevrelere adapte olabilme mekanizmalarına bağlanmıştır (Kaya ve Temerit, 1994).

Nei'nin genetik benzerlik-mesafe ölçütleri de popülasyonların genetik uzaklıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışılan popülasyonlardan Eybekli ve Asar en yakın, Eybekli ve Kapıdağ ise en uzak popülasyonlar olarak belirlenmiştir.

UPGMA kullanılarak oluşturulan dendogramda populasyonlar 2 ana kola ayrılarak, 4 grup oluşturmaktadırlar. Rakım ve coğrafik mesafe guruplaşmada etkili faktörler olarak göze çarpmaktadır.

Koruma stratejileri açısından düşünüldüğünde, tüm doğal populasyonların korunması mümkün olmadığı gibi bu populasyonların genetik yapıları insan etkisiyle değişmektedir (Ledig, 1998). Bu yüzden genetik yapının belirlenmesi ve korunacak alanlar arasında bu yönde seçim yapılması daha uygundur. Ancak bu da yeterli değildir, korunacak alanların mutlaka aynı yapıda yedekleri de korunmalıdır.

Polimorfik lokus, ortalama allel sayısı ve ortalama heterozigotluğu yüksek olan Asar populasyonunun GEKYA olarak seçilmesi uygun olacaktır. Genetik mesafe olarak diğer populasyonlardan ayrılan Mıhlidere 2. GEKYA olarak önerilmiştir. Karaçamın optimal yayılış alanındaki Gürgendağ populasyonunun polimorfik lokus ve ortalama allel sayısının yüksek olması nedeniyle 3. GEKYA olarak seçilmesi uygun olacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada Kazdağları'ndan örneklenen 7 doğal Anadolu karaçamı (*Pinus nigra* subsp. *pallasiana*) populasyonunun genetik çeşitliliği izoenzim markörleri yardımıyla belirlendi. 16 enzim sisteminden izoenzimler, tohumun dışı gametofitik dokusundan özütlendi ve nişasta jel elektroforez tekniğiyle ayrıldı.

Çalışılan 16 enzim sisteminden 17'si polimorfik, 29 lokus elde edildi. Polimorfizm Asar ve Mıhlidere'de en yüksek (%58.6), Kapıdağ'da ise en düşük (%51.7) değerindeydi. Lokus başına düşen allel sayısı 1.67 ve beklenen heterozigotluk ise yaklaşık olarak %27 olarak belirlendi. Hiçbir populasyonda nadir allel gözlenmedi. Toplam genetik çeşitliliğin %94'ünün populasyonlar içinde ve kalan %6'sının da populasyonlar arasında olduğu tesbit edildi. Ayrıca Nei'nin genetik mesafe değerleri 0.0099 (Eybekli-Asar) ile 0.0389 (Eybekli-Kapıdağ) arasında gözlemlendi, ortalama ise 0.0253 olarak belirlendi. Bu değer de populasyonlar arası farklılaşmanın fazla olmadığını gösterdi. Bu değerlere oluşturulan dendogramda ise Mıhlidere'nin diğer 6 populasyondan farklılaştığı gözlemlendi.

Sonuç olarak tüm kriterler dikkate alınarak Asar, Mıhlidere ve Gürgendağ populasyonlarının Kazdağları'nda Gen Koruma ve Yönetim Alanı-GEKYA olarak ayrılması önerildi.

SUMMARY

In this study, the genetic diversity of 7 natural Anatolian black pine populations sampled from Kazdağları was determined by isoenzyme markers. Isoenzymes from 16 enzyme systems were investigated from haploid female megagametophytes by starch gel electrophoresis.

Data provided by isoenzyme analysis revealed 17 polymorphic and 12 monomorphic loci, a total of 29 loci. Polimorphism was highest in Asar and Mıhlidere (%58.6), lowest in Kapıdağ (%51.7). Number of alleles per loci was determined as 1.67 and expected heterozygosity as %27. 94 percent of total genetic variation was observed within populations. Moreover, Nei's genetic distance measures showed that Eybekli and Asar (0.0099) are the most related and Eybekli and Kapıdağ (0.0389) are the most distant populations. Furthermore, the average genetic distance between populations was 0.0253, indicating that populations were not much differentiated, they were almost identical. A dendrogram was constructed by using UPGMA method also showed that Mıhlidere is differentiated from other 6 populations.

As a result of the study; Asar, Mıhlidere and Gürgendağ populations were recommended for the *in situ* conservation of Anatolian black pine as Gene Management Zones, in Kazdağı.

KAYNAKÇA

- ADAMS, W. T., JOLY, R. J. 1980a: Genetics of allozyme variants in loblolly pine. *The Journal of Heredity* 71:33-40.
- ADAMS, W. T., JOLY, R. J. 1980b: Linkage relationships among twelve allozyme loci in loblolly pine. *The Journal of Heredity* 71:199-202.
- ADAMS, W. T., NEALE, D. B., DOERKSEN, A. H., SMITH, D. B. 1990: Inheritance and linkage of isozyme variants from seed and vegetative bud tissues in coastal Douglas-fir. *Silvae Genet.* 39:153-167.
- AGUINAGALDE, I., LLORENTE, F., BENITO, C. 1997: Relationship among five populations of European Black pine (*Pinus nigra* Arn.) using morphometric and isozyme markers. *Silvae Genetica* 46: 1-5.
- ATALAY, İ. 1994: Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova İzmir.
- BONNET-MASIMBERT, M., BIKAY-BIKAY, V. 1978: Variabilité intraspécifique des isozymes de la glutamate-oxaloacatate-transaminase chez *P. nigra* Arnold intérêt pour la taxonomie des sous espèces. *Silvae Genetica* 27: 71-79.
- CHELIAK, W. M., PITEL, J. A. 1985: Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. *Silvae Genetica* 34: 142-148.
- CONKLE, M. T. 1979: Isozyme variation and linkage in six conifer species. Presented at the symposium "Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects, California.
- CONKLE, M. T. 1980: Amount and Distribution of Isozyme Variation in Various Conifer Species. In: Proceedings of the 7th Meeting. Canadian For. Ser. pp109-117.
- DOĞAN, B., ÖZER, A. S., GÜLBABA, G., VELİOĞLU, E., DOERKSEN, A. H., ADAMS, W. T. 1998: Inheritance and linkage of allozymes in black pine from Turkey. In: Zencirci *et al.* (Eds.) The Proceedings of International Symposium on *in situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. 249-256. CRIFC, Turkey.
- EL-KASSABY, Y. A. 1991: Genetic Variation Within and Among Conifer Populations: Review and Evaluation of Methods. In: Fineschi S., Malvotti

- M.E., Cannata F. ve Hattemer H.H. (Eds.) Biochemical Markers in the Population genetics of Forest Trees.
- FALLOUR, D., FADY, B., LEFEVRE, F. 1997: Study on isozyme variation in *P. pinea* L.: Evidence for low polymorphism. *Silvae Genetica* 46: 201-207.
- FINESCHI, S. 1984: Determination of the origin of an isolated group of trees of *Pinus nigra* through enzyme gene markers. *Silvae Genetica* 33:169-172.
- GEMICI, Y. 1994: Bolkar Dağlarında flora ve vejetasyon üzerine genel bililer. *Türk Botanik Dergisi*, Cilt 18 sayı 2.
- GURIES, R.P. VE LEDIG F.T. 1978: Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine. *Heredity* 40:27-32.
- HAMRICK, J. L., MITTON, J. B., LINHART, Y. B. 1981: Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. In: *Isozymes of north-american forest tress and forest insects*, edited by Conkle, M. T., Pacific SW For. Range Expt. Sta. Tech. Report #48: 35-41.
- HAMRICK, J.L. VE GODT M.W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D. *et al.* (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Press. Sunderland, Mass.
- IŞIK, K. 1996: *Biyolojik Çeşitlilik ve Orman Gen Kaynaklarımız*. Orman Bakanlığı Yayın No: 013.
- KARA, N. 1996: Kızılçamın (*Pinus brutia* Ten.) doğal populasyonlarında izoenzim çeşitliliğinin araştırılması. M.S. Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- KAYA, Z., KÜN E., GÜNER, A. 1997: National plan for *in-situ* conservation of plant genetic diversity in Turkey. Milli Eğitim Basımevi, İstanbul.
- KAYA, Z., TEMERIT, A. 1994: Genetic structure of marginally located *Pinus nigra* var *pallasiana* populations in central Turkey. *Silvae Genetica* 43: 272-276.
- KIM, Z. S., LEE, S. W., HWANG, J. W. 1997: Genetic diversity and structure of natural populations of *Pinus thunbergii* in Korea. *Silvae Genetica* 46:120-124.
- KING, N.J. ve DANCİK, P.B. 1983: Inheritance and linkage isozymes in white spruce. *Can.J.Genet.Cytol.* 25:430-436.

- LEDIG, F.T. 1998: Genetic diversity in tree species: with special reference to conservation in Turkey and the eastern Mediterranean. In: Zencirci *et al.* (Eds.) The Proceedings of International Symposium on *in situ* Conservation of Plant Genetic Diversity. 249-256. CRIFC, Turkey.
- MILLAR, C. I. 1985: Inheritance of allozyme variants in Bishop Pine (*Pinus muricata* D.Don). Biochemical genetics, Vol.23, Nos.11/12.
- NEALE, D.B. VE ADAMS W.T. 1981: Inheritance of isozyme variants in seed tissues of balsam fir. Can.J.Bot.59: 1285-1291.
- NEI, M. 1972: Genetic distance between populations. Amer. Natur. 106: 83-292.
- NEI, M. 1973: Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70:3321-3323.
- NEI, M. 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- NEI, M. 1987: Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- NIČOLIĆ, D., TUCIĆ N. 1983: Isoenzyme variation within and among populations of European black pine. Silvae Genetica 32, 3-4:80-89.
- PARKER, K.C. VE HAMRICK J.L. 1996: Genetic variation in sand pine (*Pinus clausa*). Can.J.For.Res.26: 244-254.
- SCALTSOYIANNES, A., ROHR, R., PANETSOS, K. P., AND TSAKTSIRA, M. 1994: Allozyme frequency distribution in five European populations of Black Pine (*Pinus nigra* Arnold). Silvae Genetica 43:20-30.
- SILIN A.E. VE GONCHARENKO G. 1996: Allozyme variation in natural populations of Eurasian pines: IV. Population structure and genetic variation in geographically related and isolated populations of *Pinus nigra* Arnold populations of on the Crimean Peninsula Silvae Genetica 45: 67-75 .
- STRAUSS, S. H., CONKLE, M. T. 1986: Segregation, linkage, and diversity of allozymes in knobcone pine. Theor. Appl. Genet. 72: 483-493.
- SUYAMA Y., TSUMARA Y. VE OHBA K. 1992: Inheritance of isozyme variants and allozyme diversity of *Abies mariesii* in three isolated natural forests. Journal of Jap.For.Soc. 7: 65-73.

SWOFFORD D.L. VE SELANDER R.B. 1989: BIOSYS-1 A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Population Genetics and Biochemical Systematics. Release 1.7.

VIDAKOVIĆ, M. 1991: Conifers Morphology and Variation, Graficki Zavod Hrvatske.

YEH, F. C., RONGCAI, Y., BOYLE T. 1997: POPGENE Version 1.20. Windows-Based Software for Population Genetics Analysis.