

**KESTANELERDE (*Castanea sativa* Mill.) KURAKLIK İLİŞKİLİ SSR VE
EST-SSR BELİRTEÇLERLE TOLERANSLILIK DEĞERLENDİRME VE
İPBS BELİRTEÇLERLE GENETİK VARYASYON ANALİZİ**

Didem KARA

**Danışman: Prof. Dr. Emine ORHAN
Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
2022**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİTKİSEL BİYOTEKNOLOJİ BİLİM DALI

**KESTANELERDE (*Castanea sativa* Mill.) KURAKLIK İLİŞKİLİ SSR VE EST-SSR
BELİRTEÇLERLE TOLERANSLILIK DEĞERLENDİRME VE iPBS
BELİRTEÇLERLE GENETİK VARYASYON ANALİZİ**

(An Evaluation of Tolerance with Drought-Associated SSR and EST-SSR Markers in
Chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) and Analysis of Genetic Variation with iPBS Markers)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Didem KARA

Danışman: Prof. Dr. Emine ORHAN

ERZURUM

Aralık, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

KESTANELERDE KURAKLIK İLİŞKİLİ SSR VE EST-SSR BELİRTEÇLERLE TOLERANSLILIK DEĞERLENDİRME VE İPBS BELİRTEÇLERLE GENETİK VARYASYON ANALİZİ

Prof. Dr. Emine ORHAN danışmanlığında, Didem KARA tarafından hazırlanan bu çalışma, 22/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. M. Sinan TAŞPINAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Emine ORHAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Emre İLHAN <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP, FYL-2022-10448

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Emine ORHAN danışmanlığında sunulan “*KESTANELERDE KURAKLIK İLİŞKİLİ SSR VE EST-SSR BELİRTEÇLERLE TOLERANSLILIK DEĞERLENDİRME VE iPBS BELİRTEÇLERLE GENETİK VARYASYON ANALİZİ*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	21	30
Kuramsal Temeller	15	30
Materyal ve Metot	19	35
Araştırma Bulguları	3	20
Sonuç ve Tartışma	2	20
Tezin Geneli	7	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Didem KARA	Prof. Dr. Emine ORHAN
22.12.2022	22.12.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarında yürütülmüştür. Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından FYL-2022-10448 nolu proje olarak desteklenmiştir. Finansal desteklerinden dolayı BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Bu çalışmanın planlanmasından yazılmasına kadar geçen süreç içerisinde desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimi ile devamlı yönlendiren, eğitimim boyunca her türlü desteği sağlayan, beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donatan tez danışmanım değerli Hocam Prof. Dr. Emine ORHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen ve istatistik analiz programı kullanımında yardımcı olan değerli Hocam Prof. Dr. Murat AYDIN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında bana her zaman yardımcı olan ve desteklerini gördüğüm değerli Hocalarım Arş. Gör. Esmâ YİĞİDER ve Dr. Öğr. Üyesi Esra ARSLAN YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda DNA izolasyon metodu konusunda bilgilerini ve yardımını esirgemeyen Doktora öğrencisi sevgili arkadaşım Sümeyra UÇAR'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve her türlü destek sağlayan Doktora öğrencisi sevgili arkadaşım Esra YAPRAK, Yüksek Lisans öğrencisi sevgili arkadaşlarım Betül BAYRAKTAR, Ebru YILMAZ, Yunus Emre DURMUŞ, Stajyer öğrenci Ilgın Asena SİBİRLİOĞLU'na teşekkür ederim.

Tüm eğitim dönemimde benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyip her koşulda yanımda olan aileme gönülden sonsuz teşekkür ederim.

Didem KARA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KESTANELERDE (*Castanea sativa* Mill.) KURAKLIK İLİŞKİLİ SSR VE EST-SSR BELİRTEÇLERLE TOLERANSLILIK DEĞERLENDİRME VE İPBS BELİRTEÇLERLE GENETİK VARYASYON ANALİZİ

Didem KARA

Danışman: Prof. Dr. Emine ORHAN

Amaç: Bu çalışmada, kuraklık ilişkili genomik SSR belirteçler ile genik EST-SSR belirteçler kullanılarak ülkemiz için önemli bazı kestane çeşitleri arasındaki kuraklığa toleranslılık/duyarlılık değerlendirmesinin yapılması ve genetik ilişki analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. İlave olarak, ülkemizde yetiştirilen kestane çeşitleri için ilk olmak üzere, retrotranspozon esaslı iPBS belirteçler kullanılarak alternatif bir moleküler analiz değerlendirmesinin yapılması dahil edilmiştir.

Yöntem: Çalışmada, Türkiye’de en fazla tanınan ticari kestane çeşitleri arasında yer alan Hacıömer, Osmanoğlu, Sariaşlama, Erfelek, Kemer, Işıklar, Şekerci, Siyah Bursa, Bouche De Betizac, Marigoule ve Tülü çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada; kuraklık ilişkili geliştirilmiş olan 5 adet SSR ve 8 adet EST-SSR belirteçlerine ilave olarak genetik ilişki tespiti için 19 adet iPBS belirteç kullanılmıştır.

Bulgular: Kuraklık ilişkili belirteçler ile elde edilen kapiller elektroforez görüntüleri yardımıyla kestane çeşitleri arasında bir toleranslılık/duyarlılık değerlendirmesi yapılmıştır. Kuraklığa duyarlı olarak bilinen Marigoule çeşidi üzerinden diğer kestane çeşitlerinin kuraklığa toleranslılık durumları değerlendirilmiştir. SSR, EST-SSR ve iPBS belirteçler ile yapılan PCR işlemlerinden elde edilen bant profilleri değerlendirilmiştir ve bu primerlere ait allel boyutu, toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm oranı, gözlenen heterozigotluk, polimorfizm bilgi içeriği, markır indeksi ve ayırt etme gücü gibi değerler belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm mikrosatellit ve retrotranspozon belirteçler, kestane çeşitleri arasında %100 polimorfiklik göstermiştir. SSR, EST-SSR belirteçler ile elde edilen toplam bant sayısı sırasıyla 507 (ort. 101,4) ve 728 (ort. 91,0) olarak kaydedilmiştir. SSR primerler için gözlenen heterozigotluk (H_{avp}), 0,351 (CsCAT6)-0,464 (CsCAT1) arasında belirlenirken (ort. 0,395), EST-SSR primerler için heterozigotluk (H_{avp}) 0,240 (FIR08)-0,377 (FIR059) olarak kaydedilmiştir (ort. 0,309). Ayrıca, iPBS belirteçler ile elde edilen toplam bant sayısı 2887 (ort. 151,95) olarak kaydedilmiş olup heterozigotluk (H_{avp}) değerleri 0,184 (iPBS 2295)-0,275 (iPBS 2256) arasında tespit edilmiştir (ort. 0,204). Hem SSR hem de EST-SSR belirteçlerle elde edilen UPGMA dendogramlarda Erfelek ve Hacıömer kestane çeşitleri birbirine en benzer çeşitler olarak belirlenmiştir. iPBS belirteçlerle elde edilen UPGMA dendogramda ise Hacıömer ve Şekerci kestane çeşitleri 0,924 benzerlik katsayısı değeri ile birbirine en benzer çeşitler olarak belirlenmiş olup bu iki çeşitle yakın benzerlik ilişkisi gösteren Osmanoğlu ve Erfelek kestane çeşitleri ile birlikte bir alt grup oluşturmuştur.

Sonuç: Çalışma sonucunda, genetik akrabalık ilişkisinin belirlenmesi amacıyla kestane ıslahında yardımcı olacak yüksek doğrulukla moleküler analizler gerçekleştirilmiştir ve kullanılan mikrosatellit ve retrotranspozon esaslı belirteçlerin markır destekli seleksiyon çalışmaları için yararlı olacağı bilgisi ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: kestane, SSR, EST-SSR, kuraklık toleranslılık, iPBS, genetik ilişki

Aralık 2022, 81 sayfa

ABSTRACT

Master Thesis

AN EVALUATION OF TOLERANCE WITH DROUGHT-ASSOCIATED SSR AND EST-SSR MARKERS IN CHESTNUTS (*Castanea sativa* Mill.) AND ANALYSIS OF GENETIC VARIATION WITH iPBS MARKERS

Didem KARA

Supervisor: Professor Doctor Emine ORHAN

Aim: In this study, it was aimed to evaluate drought tolerance/susceptibility and genetic relationship analyzes between some important chestnut cultivars for our country by using drought-related genomic SSR markers and genic EST-SSR markers. In addition, an alternative molecular analysis evaluation using retrotransposon-based iPBS markers was included, the first for chestnut cultivars grown in our country.

Method: In the study, Hacıömer, Osmanoğlu, Sariaşlama, Erfelek, Kemer, Işıklar, Şekerci, Siyah Bursa, Bouche De Betizac, Marigoule and Tülü varieties, which are among the most well-known commercial chestnut varieties in Turkey, were used. In the study, in addition to 5 SSR and 8 EST-SSR microsatellite markers, 19 iPBS markers were used for genetic association detection.

Results: A tolerance/susceptibility assessment was made among chestnut cultivars with the help of capillary electrophoresis images obtained with drought-related markers. Drought tolerance status of other chestnut cultivars were evaluated on Marigoule cultivar, which is known to be drought sensitive. Band profiles obtained from PCR processes with SSR, EST-SSR and iPBS markers were evaluated and values such as allele size, total number of bands, number of polymorphic bands, polymorphism ratio, observed heterozygosity, polymorphism information content, marker index and discrimination power of these primers were determined. All microsatellite and retrotransposon markers used in the study showed 100% polymorphism among chestnut cultivars. The total number of bands obtained with SSR, EST-SSR markers were recorded as 507 (avg.101,4) and 728 (avg.91,0), respectively. Observed average heterozygosity (H_{avp}) for SSR primers was determined in the range of 0,351 (CsCAT6)-0,464 (CsCAT1) (avg.0,395), while heterozygosity (H_{avp}) for EST-SSR primers was recorded as 0,240 (FIR08)-0,377 (FIR059) (avg.0,309). In addition, the total number of bands obtained with iPBS markers was recorded as 2887 (avg.151,95), and the heterozygosity (H_{avp}) values were found in the range of 0,184 (2295)-0,275 (2256) (avg. 0,204). In UPGMA dendograms obtained with both SSR and EST-SSR markers, Erfelek and Hacıömer chestnut cultivars were determined as the most similar cultivars. In the UPGMA dendogram obtained with iPBS markers, Hacıömer and Şekerci chestnut cultivars were determined as the most similar cultivars with a similarity coefficient value of 0.924, and they formed a subgroup together with Osmanoğlu and Erfelek chestnut cultivars, which showed close similarity with these two cultivars.

Conclusion: As a result, high-accuracy molecular analyzes were carried out to help in chestnut breeding in order to determine the genetic relationship, and it was revealed that the microsatellite and retrotransposon-based markers used would be useful for marker-assisted selection studies.

Keywords: Chestnut, SSR, EST-SSR, drought tolerance, iPBS, genetic association

December 2022, 81 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	iii
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	ix
GİRİŞ	1
KURAMSAL TEMELLER.....	8
Kestane Meyve Türünde Kuraklıkla İlişkili Moleküler Çalışma Örnekleri	8
Kestane Meyve Türünde Genetik Varyasyona Yönelik Moleküler Çalışma Örnekleri	9
MATERYAL VE YÖNTEM	16
Materyal.....	16
Bitki materyali temini	16
Kullanılan aletler ve cihazlar	16
Kullanılan çözeltiler ve solüsyonlar	17
Yöntem	19
Genomik DNA izolasyonu	19
DNA miktarının kantitatif ve kalitatif tayini	19
SSR ve EST-SSR analizleri	20
iPBS analizleri	21
ARAŞTIRMA BULGULARI	25
DNA İzolasyon İşlemlerine ait Bulgular	25
SSR ve EST-SSR Analizlerine ait Bulgular	26
SSR verilerine dayalı kümeleme analizi.....	32

SSR verilerine dayalı benzerlik analizi	32
SSR verilerine dayalı temel bileşen analizi	33
EST-SSR verilerine dayalı kümeleme analizi	33
EST-SSR verilerine dayalı benzerlik analizi	34
EST-SSR verilerine dayalı temel bileşen analizi.....	34
iPBS Analizlerine ait Bulgular	35
iPBS verilerine dayalı kümeleme analizi.....	40
İPBS verilerine dayalı benzerlik analizi	40
iPBS verilerine dayalı temel bileşen analizi	41
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
Kuraklık İlişkili SSR ve EST-SSR Belirteçlerine Göre Kestane Çeşitlerinde Kuraklığa Toleranslılık/Duyarlılık Değerlendirmesi;	42
SSR Analizlerinin Genetik Varyasyon Değerlendirmesi;	47
EST-SSR Analizlerinin Genetik Varyasyon Değerlendirmesi;.....	49
iPBS Analizlerinin Genetik Varyasyon Değerlendirmesi;	50
KAYNAKLAR.....	54
Ek-1. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri arasından Sariaşlama kestane çeşidine ait ismine doğruluk kanıtı sertifika örneği	61
Ek-2. Kestane Çeşitlerinde 5 adet SSR Belirteci ile Elde Edilen Amplifikasyon Ürünü Bant Sayıları	62
Ek-3. Kestane Çeşitlerinde 8 adet Genik EST-SSR Belirteci ile Elde Edilen Amplifikasyon Ürünü Bant Sayıları.....	63
Ek-4. Kestane Çeşitlerinde 19 adet iPBS Belirteci ile Elde Edilen Amplifikasyon Ürünleri ..	64
Ek-5. Kuraklık İlişkili SSR ve EST-SSR Lokusların Beklenen Bant Büyüklükleri ve Çalışmada Elde Edilen Alleler	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Araştırmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	16
Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar	17
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kestane Çeşitlerinin Bazı Özellikleri	18
Tablo 4. SSR ve EST-SSR Lokusların Motif, Primer Dizi Bilgisi ve Beklenen Bant Büyüklükleri.....	20
Tablo 5. EST-SSR ve SSR Analizlerinde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri için Komponentler ve Kullanım Miktarları.....	21
Tablo 6. EST-SSR ve SSR Analizlerinde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri Reaksiyon Adımları	21
Tablo 7. iPBS Belirteçlerin Primer Dizi Bilgisi ve Literatür Kaynaklı Bağlanma Sıcaklık Değerleri (Ta, °C) (Kalendar et al. 2010; Coutinho et al. 2018).....	22
Tablo 8. iPBS Analizlerde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri için Komponentler ve Miktarları (Gleku, 2020)	22
Tablo 9. iPBS Analizlerde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri Reaksiyon Adımları	23
Tablo 10. iMEC Tarafından Hesaplanan Polimorfizm Göstergeleri	24
Tablo 11. Kestane Çeşitlerinden İzole Edilen DNA'ların Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları	25
Tablo 12. SSR ve EST-SSR Primerlerin Gradient PCR ile Belirlenen Bağlanma Sıcaklıkları	26
Tablo 13. SSR Primerlerine ait Bant Sayısı, Polimorfiklik, Heterozigotluk, Polimorfizm Bilgi İçeriği, Markır İndeksi ve Ayırt Etme Gücü Değerleri	30
Tablo 14. EST-SSR Primerlerine ait Bant Sayısı, Polimorfiklik, Heterozigotluk, Polimorfizm Bilgi İçeriği, Markır İndeksi ve Ayırt Etme Gücü Değerleri	31
Tablo 15. SSR belirteçler ile elde edilen Benzerlik Matrisi	32
Tablo 16. EST-SSR belirteçler ile elde edilen Benzerlik Matrisi.....	34
Tablo 17. iPBS Belirteçlerin Gradient PCR İle Belirlenen Primer Bağlanma Sıcaklıkları.....	35
Tablo 18. iPBS Primerlerine ait Bant Sayısı, Polimorfiklik, Heterozigotluk, Polimorfizm Bilgi İçeriği, Markır İndeksi ve Ayırt Etme Gücü Değerleri	39
Tablo 19. iPBS belirteçler ile elde edilen Benzerlik Matrisi	40
Tablo 20. EST-SSR Belirteçlerin İşlevleri (Alcaide et al. 2019; Castellana et al. 2021).....	43

Tablo 21. Alcaide et al. (2019)'da Kestane Ağaçlarında Kuraklık Toleranslılıkla İlişkili Olarak Tespit Edilen Spesifik Alleller	44
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Castanea sativa kestane türünün Avrupa kıtası ve Türkiye’de dağılım haritası (EUFORGEN, 2021.) (Yeşil renk dağılımı ve yeşil X: Muhtemel doğal dağılım alanı ve izole popülasyonlar. Turuncu renk dağılımı ve turuncu X: Neolitik’ten beri tanıtılan ve doğallaştırılan alan ve izole popülasyonlar).	1
Şekil 2. TUIK 2019 yılı verilerine göre hazırlanmış olduğu belirtilen Türkiye’de Kestane üretim haritası.	2
Şekil 3. Castanea sativa Mill. türüne ait sırasıyla a) yaprak, b) çiçek, c) olgunlaşmamış açılmamış meyve, d) olgunlaşmış meyve görüntüleri (EUFORGEN, 2021).	3
Şekil 4. İzole edilen DNA’ların elektroforez jel görüntüsü.	25
Şekil 5. SSR primerlerine ait kapiller elektroforez görüntüleri.....	27
Şekil 6. EST-SSR primerlerine ait kapiller elektroforez görüntüleri.	28
Şekil 7. Erfelek kestane çeşidine ait SSR CsCAT3 primerine ait elektroferogram görüntüsü.	29
Şekil 8. Tülü kestane çeşidine ait EST-SSR VIT057 primerine ait elektroferogram görüntüsü.	29
Şekil 9. SSR markörleri ile oluşturulan UPGMA dendrogram.	32
Şekil 10. 11 adet kestane çeşidinde SSR belirteçlere ait PCoA analizi.	33
Şekil 11. EST-SSR markörleri ile oluşturulan UPGMA dendrogram.	33
Şekil 12. 11 adet kestane çeşidinde EST-SSR belirteçlere ait PCoA analizi.....	34
Şekil 13. 6 adet iPBS primerine ait kapiller elektroforez jel görüntüsü (M: DNA size).....	36
Şekil 14. Marigolule kestane çeşidine ait iPBS 2222 primerine ait elektroferogram görüntüsü.	37
Şekil 15. Osmanoğlu kestane çeşidine ait iPBS 2251 primerine ait elektroferogram görüntüsü.	37
Şekil 16. iPBS markörleri ile oluşturulan UPGMA dendrogram.	40
Şekil 17. 11 adet kestane çeşidinde iPBS belirteçlere ait PCoA analizi.	41
Şekil 18. Kestane çeşitlerinde GOT045 ve GOT021 belirteçlerinde belirlenen bazı allellerin gösterimi (M:DNA size, 1:Erfelek, 2:Hacıömer, 3:Siyah Bursa, 4:Marigoule, 5:Osmanoğlu, 6:Şekerci, 7:Betizac, 8:Tülü, 9:Sarıaşlama, 10:Kemer, 11:Işıklar)	46

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

FAO	:Gıda ve Tarım Örgütü
TUİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
TAGEM	:Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
SSR	:Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarları)
EST-SSR	:Genik Mikrosatelitler
İPBS	:İnter Primer Binding Sequences (Primer Bağlanma Alanları Arası İlişki)
PBS	:Primer Bağlanma Alanı
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	:Complemantary Deoxyribo Nucleic Acid (Komplementer DNA)
mRNA	:Messenger Ribonükleik Asit (Mesajcı RNA)
RNA	:Ribonükleik Asit
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
LTR	:Long Terminal Repeat (Uzun Tandem Tekrarları)
EST	:Eksprese Edilmiş Dizi Etiketleri
UPGMA	:Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Ağırlıksız Çift Grup Yöntemi ve Aritmetik Ortalama)
RAPD	:Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi)
AFLP	:Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)
ISSR	:İnter Simple Sequence Repeat (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizmi)
SNP	:Single-nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
cpSSR	:Kloroplast Basit Dizi Tekrarları
cpDNA	:Kloroplast DNA'sı

Ho	:Heterozigotluk
AMOVA	:Moleküler Varyant Analizi
FST	:Genetik mesafe
HRM	:Yüksek çözünürlüklü eritme
Na	:Lokus başına allel sayısı
PIC	:Polimorfik bilgi içeriği
GEKYA	:Gen Koruma ve Yönetim Alanları
CTAB	:Cetyl Trimethyl Amonium Bromide
NaCl	:Sodyum klorür
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Tris-HCL	:Tris Hidroklorür
PVP	:Polivinilpirolidon
pH	:Hidrojen İyonlarının (-) Logaritması
dH2O	:Distile su
Na	:Sodyum
ND	:Nanodrop
°C	:Santigrat Derece
ha	:Hektar
%	:Yüzde
g	:Gram
kg	:Kilogram
mm	:Milimetre
m	:Rakım
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
rpm	:Revolutions per minute (Dakika Döngü Sayısı)
mM	:Milimolar

M	:Molar
dk	:Dakika
QTL	:Kantitatif Karakter Lokus
μM	:Mikromolar
μl	:Mikrolitre
vd	:Ve diğlerleri
ng/μl	:Nanogram/Mikrolitre
v/v	:Hacim/Hacim
pmol	:Pikomol
TE	:Tris-EDTA tamponu
TBE	:Tris-Borik asit- EDTA
bp	:Base pair
kb	:Kilo base
UV	:Ultraviolet
NTSYS	:Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System
K	:Popölasyondaki grup sayısı

GİRİŞ

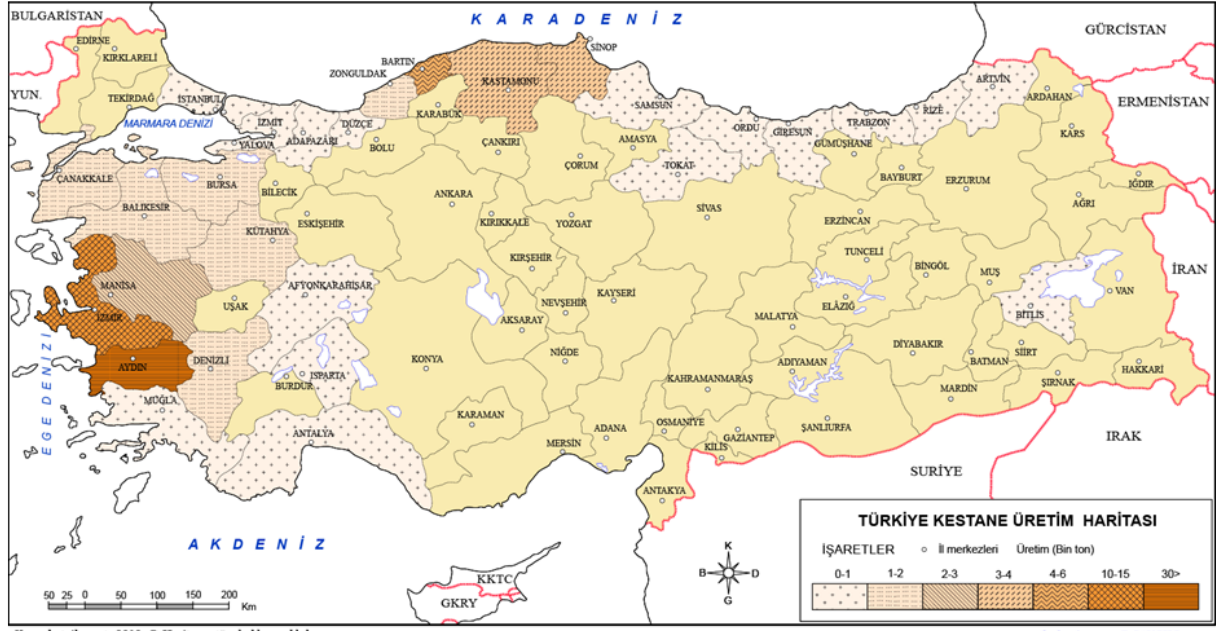
Kestane meyve türü, meşe türleri (*Quercus* sp.) ve kayın türleri (*Fagus* sp.) ile birlikte *Fagaceae* (Kayıngiller) familyasından *Quercoideae* alt familyası üyesi olup *Castanea* cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu cins içerisinde Asya (*Castanea alnifolia*, *Castanea crenata*, *Castanea henryi*, *Castanea mollissima*, *Castanea ozarkensis*, *Castanea segunii*), Avrupa (*Castanea sativa*) ve Amerikan (*Castanea dentata*, *Castanea pumila*) orjinli olan önemli dokuz kestane türü tanımlanmıştır. Avrupa kestanesi olarak bilinen *Castanea sativa* Mill. ilk defa 1768 yılında Miller tarafından isimlendirilmiştir (Davis, 1982). ‘Tatlı kestane’ olarak ifade edilen bu tür, hem Avrupa’da çok geniş yetiştirme alanına sahiptir hem de Türkiye’de doğal olarak yetiştirme alanları bulunmaktadır (Şekil 1) (EUFORGEN 2021).



Şekil 1. *Castanea sativa* kestane türünün Avrupa kıtası ve Türkiye’de dağılım haritası (EUFORGEN, 2021.) (Yeşil renk dağılımı ve yeşil X: Muhtemel doğal dağılım alanı ve izole popülasyonlar. Turuncu renk dağılımı ve turuncu X: Neolitik’ten beri tanıtılan ve doğallaştırılan alan ve izole popülasyonlar).

FAO 2020 yılı verilerine göre, Dünya genelinde toplam 2.321.780 ton’luk kestane (İngilizce bilinen ismiyle “chestnut”) üretim miktarı kaydedilmiştir. Bu üretim miktarının büyük kısmını Çin (1.743.354 ton) karşılamaktadır. Bu ülkeyi İspanya (188.690 ton), Bolivya (80.882 ton) ve Türkiye (76.045 ton) takip etmektedir (FAOSTAT-data 2022).

TÜİK 2021 yılı verilerine göre Türkiye’de yaklaşık 78.000 ton’luk kestane üretimi mevcuttur. En fazla kestane üretimi yapılan illerimiz Aydın (23.673 ton), İzmir (21.721 ton), Bartın (5.203 ton), Sinop (3.773 ton), Zonguldak (3.414 ton), Bursa (3.398 ton) ve Kastamonu (3.132 ton)’dur (TÜİK, 2022). Türkiye’de kestane üretimi ile ilgili olarak TÜİK 2019 yılı verilerine göre hazırlanmış olan kestane üretim haritası ise Şekil 2’de verilmiştir (Coğrafya Harita 2021).



Şekil 2. TÜİK 2019 yılı verilerine göre hazırlanmış olduğu belirtilen Türkiye’de Kestane üretim haritası.

Türkiye’de kestane yetişen alanlar esas olarak Karadeniz, Marmara ve Ege Bölgelerinde bulunmaktadır. Kestanenin verimliliği için ekoloji, bahçe büyüklüğü, topoğrafya, tür, çeşit ve kültürel uygulamaların çok önemli olduğu ifade edilmektedir. Ülkemizdeki kestane yetişen alanlar daha çok orman alanlarında (% 81,9) doğal yetiştirme alanları şeklinde olsa da kültüre alınan kapama kestane bahçeleri de (%11,8) mevcuttur. Ege ve Marmara Bölgelerinde tüm yetiştiriciler aşıllı kestane ağaçlarına sahiptir (%100). Bu oran, Orta ve Batı Karadeniz Bölgesinde sadece %24,6 ve Doğu Karadeniz Bölgesinde ise %2,1’dir (Serdar vd. 2018).

Karadeniz Bölgesinde yıllık yağış toplamının yüksek olması nedeniyle kestanelerde sulama yapılmamaktadır. Marmara ve Ege Bölgelerinde kestanelerde sulama yapan yetiştirici oranı sırasıyla %42.1 ve % 29.2 olarak ifade edilmektedir. Yetiştiriciler genellikle salma sulama (%61,6) yapmakta olup yağmurlama (%10,2) ve damla sulama (%28,2) da tercih edilmektedir. ‘Marigoule’ kestane çeşidi; kestane yanıklığına, kuraklığa ve erken olgunlaşmaya karşı daha toleranslı olduğu için Marmara Bölgesinde en fazla tercih edilen çeşit olmuştur. Ege Bölgesinde en yaygın çeşit olarak tüketim ve pazarlama şekline uygunluk nedeniyle (közde pişirme ve şekerleme) 'Işıklar' (Şekerci) çeşidi tercih edilmektedir. Karadeniz bölgesinde genellikle çöğürden gelişen kestane ağaçları tercih edilmekte olup Orta Karadeniz bölgesinde yöresel

olarak genellikle seleksiyon çeşidi ‘Salıpazarı’ çeşidi önemli olmuştur. Ancak, kestane yanıklığı etmenine hassas olması nedeniyle Avrupa kestane çeşitleri kullanılır olmuştur. ‘Erfelek’ çeşidi Batı Karadeniz’in Sinop ilinde yetişmektedir. Günümüzde ıslah çalışmaları sonucu elde edilen Anadolu kestane çeşitleri Serdar, Erfelek ve Ünal bu bölgede önerilerek yayılım göstermektedir (Serdar vd. 2018). Diğer taraftan, Marigoule kestane çeşidinin 2000 yılından beri bu bölgede test edilerek genç bitki üretiminde sertifika amaçlı tescil edildiği (TTSM 2016) ve çok yaygın kullanıldığı bilgisi mevcuttur (Serdar vd. 2018).

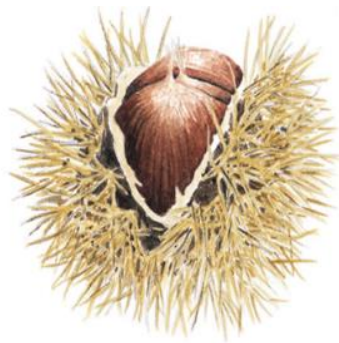
Kestane ağaçları genellikle; sarı renkli çiçekleriyle dikkat çeken, iri yaprakları olan güzel görünüşlü ağaçlardır. Dalları genç iken kıvrık kahverengi renkte olup genç sürgünleri köşeli, koyu kırmızımsı-kahverengidir (Kendir vd. 2016). Soylu vd. (2006)’ya göre; kestane türleri arasında ağaç, yaprak ve meyve özellikleri bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca, aynı tür içerisinde yer alan çeşitler arasında da farklılıklar bulunmaktadır. Dik büyüyen ve uzun ağaçları olan kestane türünün bodur formları da mevcuttur. Avrupa kestanelerinin yaprak kenarları testere dişlidir ve alt yüzeyleri tüylüdür. Yaşlı dalları kuvvetli büyüme gösterir. Tomurcukları diğer türlerden daha iridir ve koyu kırmızı renkte olup yuvarlak veya oval şekillidir (Kumru 2019).



a)



b)



c)



d)

Şekil 3. *Castanea sativa* Mill. türüne ait sırasıyla a) yaprak, b) çiçek, c) olgunlaşmamış açılmamış meyve, d) olgunlaşmış meyve görünüşleri (EUFORGEN, 2021).

Kestane meyveleri, işlenmeden taze olarak (sofralık şeklinde) ve işlendikten sonra olmak üzere (şekerleme, konserve, kestane hamuru, jöle vb.) iki farklı tüketim şekline sahiptir. Ülkemizde genel olarak sofralık ve şekerleme halinde tüketim daha yaygındır. Ayrıca, kestane ağacı kereste olarak kullanıldığı gibi meyve kabuklarının tanen üretiminde, yaprak ve çiçeklerinin ise ilaç ve kozmetik sanayinde kullanıldığı bilinmektedir (Özkarakaş 2001). Kestane meyvelerinin enerji değeri yüksektir. Gluten içermediği için besin değeri nedeniyle özellikle pediatrik gastroenteritte ve ayrıca glütensiz beslenmenin önemli olduğu çölyak hastalarının diyetinde kullanılabilir. Yüksek miktarda doymamış yağ asitleri ile birlikte düşük miktarda yağ oranına sahip olduğu belirtilen kestane meyvelerinin; kalp-damar yanında ileri yaşa sahip olanlarda ve obezite sorunu olanlarda faydalı bir gıda olduğundan bahsedilmektedir. Diğer taraftan, kestane bitkisinin farklı kısımları üzerinde yapılan kimyasal çalışmalar sonucunda alkoloid, fenolik bileşikler, organik asit ve lipid yapısındaki sekonder metabolitler belirlenmiştir. Bitkinin antioksidan, sitotoksik, antibakteriyel ve antifungal etkilere sahip olduğu görülmüştür (Borges *et al.* 2007; Yurdakul 2008; De Vasconcelos *et al.* 2010; Kendir *et al.* 2016).

Soylu ve Ufuk, (1994)'e göre; Anadolu'da çok eski zamanlardan beri kültürü yapılan kestane, meyve kalitesi ve ağaç özellikleri yönünden zenginlik gösteren bir meyve türüdür (Ertan *vd.* 2005). Günümüzde pazarda satılan kestanelerin renk, tat, irilik, soyulabilirlik açısından farklılıklar göstermesi de bunun en belirgin kanıtıdır. Anadolu topraklarında 2,5 milyon ciyarında olan kestane ağacı varlığı içerisinde çok fazla varyabilite vardır. Bu zengin kaynak içinde küçük meyveli, verimsiz ve düşük kaliteli tipler ile birlikte verimli olan renkleri çekici ve parlak bir şekilde olan iri tiplerin de bulunduğu bilinmektedir. Doğada farklı nitelikte binlerce tipin bulunması, ıslah çalışmaları açısından istenen bir durumdur. Çünkü melezlemesi doğal olarak yapılmış olan ve farklı topraklara ve iklimlere adapte olmuş olan hazır bir materyaldir. Bunların içerisinde ise üstün nitelikli olanları seçip vejetatif olarak çoğaltmak ıslahçıların görevidir. Bitki ıslahçıları doğal populasyondaki kestaneler üzerinde seleksiyon çalışmaları yapmışlardır ve bugün yaygın olarak kullanılan bazı standart çeşitleri elde etmişlerdir.

Türkiye'de kestane yetiştiriciliği ve ıslahı ile ilgilenen TAGEM'e bağlı Tarımsal Araştırma Enstitülerinden birisi olan Yalova'da bulunan Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde Hacıbiş, Osmanoğlu, Hacıömer ve Vakit isimleriyle adlandırılan kestane çeşitlerinin ıslah çalışmalarıyla kültüre alındığı bilgisi mevcuttur. Ayrıca, hem Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde (Samsun) hem de Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde (İzmir-Menemen) kestane germplasm kaynakları ile ilgili olarak genetik

muhafaza ve karakterizasyon çalışmalarının sürdürüldüğüne dair bilgiler bulunmaktadır (TAGEM 2021).

Kestanelerde çeşitlerin niteliklerini koruyarak çoğaltımları vejetatif yollar kullanılarak yapılabilmektedir. Vejetatif çoğaltımda, çelikle ve daldırma ile çoğaltma kullanılmaktadır. Fakat, en çok uygulanan güvenilir yöntem aşılama ile çoğaltmadır. Kestane yetiştiriciliğinde anaç kullanımı zorunlu olduğundan, aşılama olayı da bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır (Örneğin; *Phytophthora sp.*'ye dayanıklılık) (MEB, 2013).

Büber (2021)'de bildirilen bilgilere göre: Kestane, yedi ay gibi bir vejetasyon zamanına ihtiyaç duymaktadır ve düşük sıcaklardan olumsuz etkilenmektedir. Potasyum bakımından zengin toprakları tercih eder. Kestane bitkisi, genel olarak orta asitli (pH değeri 5-6.5), geçirimli ve derince topraklarda iyi büyüme göstermektedir. İlkbahar erken don riskine karşı hassas olarak bilinmektedir. Çiçek açması için ortalama olarak 15-18 °C sıcaklık isteği bulunmaktadır. Meyve olgunlaşması için ılık bir sonbahar gereklidir. Ortalama yağışın 600-1600 mm olduğu yerlerde optimum olarak yetiştirme gösteren kestane ağaçları, çiçeklenme döneminde fazla ve sürekli olan yağışlardan ve ayrıca yazın fazla bulutlu olan hava şartlarından olumsuz ölçüde etkilenmektedir. Verim için ortalama yıllık yağış 600 mm altına düşmemelidir. Kurak geçen mevsimin iki aylık süreyi geçmemesi gerekmektedir (Erdem 1951).

Bitkilerin büyüme ve gelişimlerini maksimum düzeyde etkileyen abiyotik stres faktörlerinden birisi kuraklıktır. Son yıllarda, nüfus artışı ile birlikte küresel ısınmanın da etkisiyle daha da önemli bir meteorolojik olay haline gelmektedir (Ekşioğlu, 2016). Jaleel *et al.* (2007)'ye göre; kuraklık stresi, toprakta mevcut su miktarının azlığında ve atmosferik koşullar, buharlaşma/terleme yoluyla sürekli su kaybına neden olduğun durumlarda ortaya çıkmaktadır. Oluşması oldukça yavaş gerçekleşirken etkinliği uzun süre devam edicidir. Kuraklık stresi çok boyutlu bir stres olarak ifade edilmektedir ve tüm bitkilerde gözlenmektedir. Bitki stresine yönelik cevaplar bitki türünden türüne değiştiği gibi tür içinde bireyler arasında da değişiklik göstermektedir (Morgil 2019).

Kuraklık stresinden etkilenmeleri bakımından bitki türleri ve çeşitleri arasında ve diğer taraftan bitki organları arasında fizyolojik ve morfolojik değişimlerde önemli farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Genotipe bağlı olarak farklı şiddetlerde ortaya çıkan kuraklıktan etkilenme derecesi o genotipin stres altında geliştirdiği metabolik değişimlere (fizyolojik, biyokimyasal) tepkilere bağlıdır (Örs ve Ekinci 2015).

Ülkemiz açısından ekonomik öneme sahip meyve türlerinden olan kestane, özellikle kurak koşullardan oldukça fazla etkilenen hassas bir tür olarak görülmektedir. Kestaneler doğal ekolojilerinde genel olarak sulama yapılmadan yetiştirilebilmektedir. Ancak, toprak neminin azlığı veya kuraklık kestane ağaçlarını çeşitli yönlerden etkilemektedir. Özellikle verim ve

meyve kalitesinde (meyve iriliği gibi) azalmalar ve kestane mürekkep hastalığı etkisinde artış şeklinde gözlenmektedir. Yağış rejimi, kestanenin yayılışında önemli bir etken olarak ifade edilmektedir ve bu durum kurak geçen yaz mevsimi aylarında önem kazanmaktadır (Ertan vd. 2016).

Bitki türlerinde genetik çeşitlilik; genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik düzeylerde incelenmektedir. Varyasyonun yüksek olduğu kestanelerde varyasyonun belirlenmesi ve korunması için moleküler belirteçlerin (markırların) kullanılması önem teşkil etmektedir ve bugüne kadar Kestane genomu için özellikle RAPD, AFLP, ISSR, SSR, EST-SSR, cpSSR gibi moleküler belirteçlerin kullanıldığı çok sayıda başarılı çalışma mevcuttur.

SSR markırlar (Mikrosatellitler, Basit Dizi Tekrarları), ökaryotik genomlar boyunca dağılmış ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşurlar. SSR'lar yüksek oranda polimorfik oldukları için bitkilerde oldukça fazla bilgi vermektedir. Ayrıca, kodominant (eşbaskın) markır vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması da fazla tercih edilme sebepleri arasındadır (Yorgancılar vd. 2015). SSR'lar, tekrar dizileri esaslı moleküler markır teknikleri arasında yer alırlar ve bitki genomlarında geniş bir dağılım gösterir. Tekrarlara dayalı bilgiler türe özgü korunmuş alanlara sahip olduğundan bütün genomu daha doğru temsil etmektedir. Tekrarlanan bölgelere özgü bilgi verici nitelikte spesifik primerler geliştirilmektedir ve bu primerler yardımıyla PCR işlemi yapılmaktadır (Ganopoulos *et al.* 2011; Orhan 2020). Genomun transkripte olan gen bölgeleri, genik nitelikte mikrosatellitler (EST-SSR) olarak isimlendirilen çeşitli mikrosatellitleri içerir. Eksprese edilmiş dizi etiketleri (EST'ler) kısa transkripte olan kısımlardır ve çeşitli metabolik fonksiyonlarda yer alırlar (Li *et al.* 2014). EST'ler, cDNA klonlarının rasgele dizi analizi olarak bilinir. cDNA'lar ve mRNA'lardan elde edilirler. Belirli koşullarda ya da gelişimin farklı aşamalarında ifade edilen genlerin incelenmesine olanak sağlarlar (Orhan 2020).

Sınıf-I Transpozonlar olarak bilinen retrotranspozonlar, genomda bir RNA ara ürünü aracılığıyla kendilerini kopyalayarak hareket edebilen, genomun başka bir konumuna yerleşerek genomun fiziksel boyutunda artışlara yol açabilen hareketli genetik elamanlardır. Mutasyonlara ve genomda DNA miktarının değişmesine ve genetik çeşitliliğin artmasına neden olurlar. Bir türde retrotranspozon markır sistemi geliştirebilmek için o türün en azından retrotranspozon bölgelerine komşu bölgelerinin dizi bilgisi gerekmektedir. Bu kısıtlayıcı faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla Kalendar *et al.* (2010), bitkilerde ve hayvanlarda başarıyla kullanılabilecek olan iPBS isminde yeni evrensel nitelikte bir retrotranspozon markır sistemi geliştirmişlerdir. Retrotranspozon esaslı markır teknikleri arasında yer alan Primer Bağlanma Alanları Arası İlişki (iPBS) markır tekniğinde ise; retrotranspozonların içerisinde bulundukları konumları ile iç içe geçmiş, ters dönmüş veya kesilmiş durumda bulunabilme özelliklerinden

faýdalanılır. Böyle bir yapıda, mevcut i kısımlar ile birlikte uzun tandem tekrar (LTR) dizileri sıklıkla bir diğ er retrotranspozonun yanına yerleşmiştir ve bu dizide primer bağlanma alanı (PBS) dizileri sıklıkla diğ er iPBS'nin yanında yer almaktadır. Genom yapısında retrotranspozon varlığının fazla olduğu bölgelerde, diğ er retrotranspozon yapılarıyla birlikte bulunma ihtimaliden dolayı iPBS dizileri kullanımı mümkündür (Kuras *et al.* 2013; Orhan 2020). iPBS belirteçlerinin kullanımı artışta olup bitkilerde akrabalık ilişkilerinin değerlendirilmesi, genetik eşitliliğ in karakterize edilerek tanımlanmasında önemlidirler. Evrensel ölçütte bir yöntem olarak ifade edilirler (Kalendar *et al.* 2010; Kalendar *et al.* 2011; Nadeem *et al.* 2018).

Amaç:

DNA esaslı moleküler belirteçler arasında yer alan mikrosatellit (SSR) belirteçlerin kestane türlerinde kullanıldığı dünya genelinde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, kuraklık ilişkili SSR belirteçler (genomik) ile EST-SSR belirteçlerin (genik) kullanımı tercih edilmiş olup bu belirteçler yardımıyla kestane eşitleri arasındaki kuraklığa toleranslılık/duyarlılık tespiti ve değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. İlave olarak, ülkemizdeki bazı önemli kestane eşitleri arasındaki genetik ilişkinin moleküler karakterizasyon analizleri ile belirlenmesi düşünülmüştür. Diğ er taraftan, ülkemizde önemli olan kestane eşitleri için ilk olmak üzere, yine DNA esaslı moleküler belirteçlerden olan retrotranspozon esaslı iPBS belirteçler kullanılarak, alternatif bir moleküler analiz değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Dolayısıyla, kuraklığa toleranslılık değerlendirme ile birlikte genetik varyasyon tespiti ve genetik akrabalık ilişkisinin belirlenmesi amacıyla kestane ışlahı için yardımcı olacak yüksek doğrulukla moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Kestane Meyve Türünde Kuraklıkla İlişkili Moleküler Çalışma Örnekleri

Eksprese (ifade) edilmiş dizi etiketlerinden (EST) türetilen basit dizi tekrarı (SSR) belirteçleri (işaretleri), genetik varyasyonu değerlendirmek ve ağaç formu genotiplerin daha etkili korunmasına olanak sağlamada giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bilinen fonksiyonlara sahip genomun eksprese edilen bölgelerinden geliştirilirler. Pek çok bitki türü için çok sayıda eksprese edilmiş dizi etiketi (EST) mevcuttur ve EST-SSR belirteçleri kapsarlar (Scott *et al.* 2000; Krutovskii and Neale, 2001; Kalia *et al.* 2011; Alcaide *et al.* 2019). Genomik SSR'lardan daha az polimorfik oldukları bildirilmiş olmasına rağmen, EST-SSR belirteçler, adaptif varyasyon ve türler arası transfer edilebilirlik ile ilgili olarak fonksiyonel çeşitlilik açısından üstün olarak ifade edilmektedir (Varshney *et al.* 2005; Yatabe *et al.* 2007; Alcaide *et al.* 2019).

Kuraklık toleransını değerlendirmenin kolay olmadığı, genetik olarak kuraklığın poligenik nitelikte olduğu, dehidrasyonla indüklenabilir genlerin karmaşık bir ekspresyon modeli ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Kuraklık toleransının, farklı mekânsal ve zamansal ölçeklerde çalışan mekanizmaları içerdiği de ifade edilmektedir (Tardieu *et al.* 2018).

Akdeniz tipi ekosistemlerde, iklim değişikliğinin daha uzun yaz kuraklık dönemlerine neden olacağı ve kuraklık olaylarının sıklığını ve şiddetini artıracığı tahmin edilmektedir. FIR059 belirtecinin *Castanea sativa* ağaçlarında kuraklık toleransını tahmin etmek için markır destekli seleksiyonda kullanılabileceği gösterilmiştir (Alcaide *et al.* 2019). Castellana *et al.* (2021), Avrupa'da Kestane yetişen alanlarda görülen iklimsel değişikliklerin kestanelerde hassasiyete neden olduğu (Camisón *et al.* 2020) bilgisi üzerinden ve bu tür ile ilgili doğal yetiştirme alanlarında uyum sağlama özelliğinden faydalanılarak mikrosatellit (SSR) belirteçleri kullandıkları bir genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Diğer taraftan, Meşe (*Quercus* spp.) (Sullivan *et al.* 2013; Lind and Gailing 2013), kestane (Martín *et al.* 2010; Alcaide *et al.* 2019) ve ceviz (Torokeldiev *et al.* 2019) türlerinde kuraklık stresiyle ilişkili EST-SSR'ler rapor edilmiştir.

Alcaide *et al.* (2019), meşe türlerinde (*Quercus* spp.) geliştirilen kuraklık stresi ile ilişkili EST-SSR belirteçlerini seçerek kestane türünde (*C. sativa*) kullanılabilişliğini araştırmışlardır. *C. sativa*'nın dört yabani popülasyonunun kuraklık toleransı ile ilgili

adaptasyon potansiyelini incelemek için 8 EST-SSR belirteci kullanılmıştır. Çalışılan kestane fidanları su stresine tabi tutulmuş ve kuraklığa dayanıklılıkları değerlendirilmiştir. Kullanılan markırlar arasından FIR059 belirtecini kuraklığa duyarlı bireyler için üç özel alel ve kuraklığa toleranslı bireyler için iki özel alel gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu belirtecin kestane türlerinde kuraklık toleransını tahmin etmek için aday bir belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Yerel adaptasyon süreçlerini tanımlamayı amaçlayan bir peyzaj genomu yaklaşımı kullanarak Kestane (*C. sativa*) doğal popülasyonlarında genetik değişkenlik ve iklim değişkenleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışmada, 5 adet genomik SSR ve 8 adet fonksiyonel/genik EST-SSR markırı kullanılarak, farklı iklim bölgelerinde dağılım gösteren 10 farklı doğal Avrupa kestane türü popülasyonuna ait 268 genotip kullanılmıştır. Allelik varyasyon ve iklim değişkenleri arasındaki ilişkiler de değerlendirilmiştir. Yağışlı ve kurak alanlar arasında genetik varyasyonun farklı mekânsal kalıpları elde edilmiştir. %9'u FIR059 lokusuyla ilişkili 22 farklı alel arasında toplam 202 ilişki tespit edilmiştir. Bulgular, iklim ve genetik değişkenlik arasındaki yakın ilişkinin altını çizmiştir ve bu yaklaşımın hızla değişen bir çevrede orman türlerinin yönetimi için nasıl değerli bilgiler sağlayabileceğini göstermiştir (Castellana *et al.* 2021).

Kestane Meyve Türünde Genetik Varyasyona Yönelik Moleküler Çalışma Örnekleri

Marinoni *et al.* (2003), kestane türü için mikrosatellit markırları geliştirmek amaçlı bir çalışma yapmışlardır. Garrone Nero çeşidinden 33 adet SSR markırı geliştirilerek *Castanea sativa* türü için karakterize edilmiştir. SSR lokuslarının tanımlanması için, tekrar bölgesini çevreleyen her iki taraftan primerler tasarlanarak 5 adet kestane örneğinde test edilmiştir. 24 lokus polimorfik bulunmuş ve lokus başına tespit edilen alel sayısı 2-7 arasında bulunmuştur. ABI-PRISM-377 kullanılarak Kuzey İtalya'da yetiştirilen 20 çeşidin analizi için 14 lokus seçilmiştir. Toplam 90 markır içeren yüksek düzeyde genetik polimorfizm belirlenirken alel sayısı lokus başına 4-10 arasında seviyesinde (ortalama 6,4) tespit edilmiştir. Ortalama beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri sırasıyla 0,724 (0,649-0,835) ve 0,793 (0,350-0,950) olarak elde edilmiştir.

Boccacci *et al.* (2004), 5 kestane çeşidinde SSR belirteçlerini kullandıkları çalışmada, iki meşe türünde (*Quercus robur* L. ve *Quercus petraea* (Matt.) Lieb.) geliştirilen 52 primer çiftini denemişlerdir. Bunlardan 28 tanesi amplifikasyon göstermiştir. 12 polimorfik lokus seçilmiş ve kuzeybatı İtalya'nın Piedmont bölgesinde yetiştirilen 12 Avrupa kestanesi çeşidinin (*Castanea sativa* Mill.) parmak izi çalışması için kullanılmıştır. Lokus başına alel sayısı 3-8 arasında tespit edilmiştir. Ortalama beklenen heterozigotluk 0,592 (0,288-0,868) ve

gözlemlenen ortalama heterozigotluk 0,667 (0,333-1,000) olarak belirlenmiştir. *Quercus* için çalışılan bazı SSR markırların kestane çeşitlerinin parmak izi ve genetik haritalaması amacıyla kullanışlılığı ortaya konulmuştur.

İsviçre’de 26.000 hektarlık alanda 120 farklı varyeteden fazla kestane varlığından bahsedilen bir çalışmada (Gobbin *et al.* 2007), İsviçre’nin güneyinde Marroni, Avrupa-Japon ve Fransa kaynaklı 47 varyete için 8 mikrosatellit markır (4 SSR markır çalışmada geliştirilmiş) kullanılmasıyla moleküler düzeyde başarıyla sonuçlanan bir karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. 98 genotipin tanımlaması, 10 klon kestane grubu, 4 sinonim grup ve 12 homonim grup kestane yetişen kompleks etnocoğrafik yapı olarak ifade edilen bir yansıma şeklinde ilişkilendirilmiştir.

Avrupa genelinde tatlı kestanenin (*Castanea sativa* Mill.) genetik yapısı, beş Avrupa ülkesindeki (İtalya, Fransa, İspanya, Yunanistan ve Birleşik Krallık) 29 bölgede dağılım gösteren toplam 1.768 kestane bitki materyalinin kullanıldığı bir çalışmada, genetik varyasyonu tespit etmek amacıyla 73 adet ISSR belirteci kullanılmıştır. Üçü Yunanistan’da, 1’i İber yarımadasının kuzeybatı kıyısında ve 1’i Akdeniz havzasında olmak üzere toplam 5 farklı büyük gen havuzunun varlığı ortaya çıkmıştır. Çalışma sonuçlarının etkileri, Avrupa’da kestane genetik kaynakları için koruma stratejilerinin geliştirilmesi ile ilgili olarak değerlendirilebilmiştir (Mattioni *et al.* 2008).

Pereira-Lorenzo *et al.* (2010), İber Yarımadası ve Kanarya Adaları’nda bulunan aşılınmış ağaçlardan ve hibritlerden alınan bitki materyallerinde basit dizi tekrarları (SSR) lokuslarını kullanarak geniş çaplı bir araştırma yapmışlardır. Avrupa kestanesinin (*Castanea sativa*) klonal olarak çoğaltılmış çeşitlerinden 574 bitki materyali ve hibritlerden 71 bitki materyalinde toplam 10 SSR lokus kullanılarak genetik varyasyon düzeyinin tespiti amaçlanmıştır. Atlantik bölgesinde bulunan egzotik kestane türlerinin temsili bir örneği, *Castanea crena*’nın 47’si, *Castanea mollissima*’nın 37’si ve *Castanea henryi* kullanılmış olup faktöriyel uygunluk analizi ve moleküler varyans analizleri yapılmıştır. Kestane türleri, melezleri ve yabancı introgresyonları ayırt edilebilmiştir. Avrupa’da yetiştirilen kestaneler arasındaki farklılığın iki temel orjini olarak İber Yarımadasının (Kuzey ve Merkez) olduğu sonucu paylaşılmıştır.

Kestanelerde (*Castanea sativa* Mill.) genetik çeşitliliğin genomik (SSR’ler) ve genik (EST-SSR’ler) mikrosatellit belirteçler aracılığıyla değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır (Martin *et al.* 2010). Akdeniz havzasından zıt iklim koşullarından temsili olarak 9 adet doğal Avrupa kestanesi popülasyonu kullanılmış olup genotiplendirme yapılmıştır. Genomik SSR’ler yardımıyla; markırların sayısı, etkili markırların sayısı, beklenen heterozigotluk ve polimorfizm düzeyi açısından ele alınmış olu önemli ölçüde yüksek çeşitlilik değerleri elde edilmiştir.

UPGMA analizi, genomik SSR'lar için coğrafi mesafelere göre gruplandırma ve EST SSR'lar için popülasyonların kuzey-güney dağılımına dayalı iki farklı grup olmak üzere, popülasyonlar arasında farklı kümelenme paterni ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, *Castanea* ve *Quercus* türleri arasında EST-SSR'ların aktarılabirliği belirtilmiştir. Sonuçta, genomik SSR'lar ve EST-SSR'ların birlikte kullanımının, kestanelerde genetik ve adaptif çeşitliliğin belirlenmesinde tamamlayıcı bilgi vermek için yararlı bir araç olduğunu doğrulamıştır.

Kazdağları kestane (*Castanea sativa* Mill.) gen koruma ve yönetim alanlarındaki (GEKYA) beş kestane popülasyonunun (Mıhlidere, Sivrikatran, Sarıot, Ayıgediği, Gicikdere) genetik çeşitliliğini tespit etmek amacıyla Küçük (2010) tarafından bir çalışma yapılmıştır. Bu beş popülasyonun genetik çeşitliliği mikrosatellit (SSR) markırları ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada 81 kestane genotipi, 25 SSR primeri ile karakterize edilmiştir ve toplam 102 markır tespit edilmiştir. Her lokus için ortalama markır sayısı 2-6 arasında değişim göstermiştir (ortalama=4,1). Analiz edilen genotipleri gruplandırmak için Dice benzerlik katsayısına göre kümeleme analizi ve genotipler arasındaki korelasyon katsayılarına göre de ana bileşen analizi yapılmıştır. Tüm verilerin analizi sonucunda genotipler arasında 0,55-0,87 arasında benzerlik katsayısı tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Kazdağları'nda bulunan beş kestane popülasyonunun genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Fernandez-Cruz and Fernandez-Lopez (2012), Lourizán Orman Araştırma Merkezi'nin klon koleksiyonundan, kökeni bilinmeyen birkaç doğal *Castanea* popülasyonu ve melezlerinin referans örneklerle genetik yapısını araştırmışlardır (toplamda 337 bitki materyali). İspanya'nın kuzeybatısında yer alan dört *Castanea sativa* meşceresinden (ağaç türü kombinasyonu) örneklenen toplam 115 birey, 61 *Castanea crenata* bireyi ve 27 *Castanea mollissima* bireyi dört morfolojik özellik bakımından sınıflandırılmış ve 21 referans bireyi tanımlamak için 11 mikrosatellit (SSR) lokusu kullanılmıştır. STRUCTURE programı ile yapılan analiz sonucuna göre iki Asya türü ve iki *Castanea sativa* türünde olmak üzere dört küme belirlenmiştir. *Castanea sativa* için tespit edilen iki küme, daha önce tanımlanan farklı adaptif özelliklere sahip gen havuzlarına karşılık gelmiş ve her iki *Castanea sativa* gen havuzunun saf ve karışık popülasyonları olarak tanımlanmıştır.

Orman ağaçlarının genetik çeşitliliğine ilişkin büyük ölçekli çalışmalar, genetik kaynakların envanteri, korunması ve yönetimi ile ilgili olup türlerin coğrafi kökenleri hakkında fikir vermektedir. Bu yaklaşımla, büyük ekonomik öneme sahip bir ağaç olan ve *Castanea* cinsinden Avrupa'daki tek tür olan *Castanea sativa* tercih edilerek bir çalışma planlanmıştır. *C. sativa*'nın tarihi, fosil polen verilerinden çıkarılmış olsa da bu türün büyük ölçekli genetik yapısının aydınlatılması gerekliliği vurgulanmıştır. Bu bilgiler kapsamında Mattioni *et al.* (2013), Türkiye, Yunanistan ve Batı Avrupa'dan gelen popülasyonlar arasında önceden

açıklığa kavuşturulmamış genetik ilişkileri tanımlamak için *C. sativa*'nın genetik çeşitliliğini değerlendirmişlerdir. Yabani kestane ağaçlarından, 31 Avrupa bölgesinden olmak üzere toplam 779 örnekte SSR markırlar kullanılmıştır. Popülasyonların her birisinin kendi içinde ve popülasyonlar arasında olmak üzere genetik istatistikler yapılmıştır. Popülasyon yapısı Bayes yaklaşımı kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, doğu (Yunan ve Türk) ve batı (İtalyan ve İspanyol) popülasyonları arasında genetik bir farklılık olduğunu göstermiştir. Türkiye'de iki gen havuzu ve bir gen introgresyon bölgesi belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada 13 adet polimorfik SSR lokusu *Castanea sativa* Mill. türünden izole edilmiştir. Bunlardan 6 adet lokus dinükleotit tekrarı, 6 adet lokus trinükleotit tekrarı ve 1 adet lokus ise bir trinükleotit ve bir tetranükleotit tekrarı karışımından oluşmaktadır. Lokuslar, Birleşik Krallık'taki üç kestane popülasyonu ve ebeveynlerinden ve bir Türk harita popülasyonundan altı fide kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen allel sayısı lokus başına 2-14 (ortalama=5,15) arasında değişmiştir. Haritalama ailesinde sekiz lokusun kullanışlı olduğu tespit edilmiştir (Buck *et al.* 2013).

Abdelhamid *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, *Castanea* türleri arasındaki ve tür içindeki genetik değişkenliği tespit etmek ve genetik çeşitliliği tahmin etmede her bir sistemin etkinliğini karşılaştırmak için 4 farklı DNA markır yöntemi kullanmışlardır. 106 RAPD, 228 AFLP, 42 ISSR ve 36 SSR polimorfik markır kullanarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Etkatif multipleks oranı, polimorfizm bilgi içeriği ve markır indeksi ile ilgili bulgular, AFLP'nin bu çalışmada kullanılan en etkili moleküler markır sistemi olduğunu ortaya çıkarmıştır. RAPD yöntemi ile tür ilişkileri açısından kısmi bir tespit sağlanmış olsa da her bir markır sistemi, araştırılan türleri açık fakat tam olarak ayrılmamış kümeler halinde sınıflandırmıştır. RAPD belirteç verilerinin korelasyon katsayısı, diğer belirteçlerden daha yüksek bir korelasyon göstermiştir [AFLP ($r=0.69$, $P<0.01$), ISSR ($r=0.77$, $P<0.01$) ve SSR ($r=0.47$, $P<0.01$)]. Varyans gruplar arasında ve gruplar içinde, AFLP (%94,62) gruplar içinde daha fazla çeşitlilik göstermiş ve ters RAPD (%67,87) gruplar arasında daha az çeşitlilik sağlamıştır. Genel olarak, sonuçlar AFLP'nin kestane genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi için etkili bir moleküler markır sistemini temsil ettiğini ve dolayısıyla bu değerli ağaç türlerini korumak için etkili koruma stratejilerinin geliştirilmesini temsil ettiğini ortaya çıkarmıştır.

Fernandez-Cruz and Fernandez-Lopez (2016), İspanya'nın kuzeybatısında bulunan Galiçya'da 15 yabani *Castanea sativa* popülasyonunun genetik yapısını araştırmak amacıyla 9 nSSR markır kullanarak 10 İspanyol, 2 İtalyan ve 2 Yunan popülasyonu ile karşılaştırmaları yapmışlardır. Bu popülasyonlara ilave olarak, yabani Asya germplazmı ve aşılı çeşitlerin varlığını tespit etmek için 41 *Castanea crenata*, 19 *Castanea mollissima* ve 54 çeşit kullanılmıştır. Sonuçta, Avrupa tatlı kestane popülasyonlarından iki ana küme tespit edilmiştir.

Bunlardan Kuzey İber Yarımadası kümesi, kuzey ve kuzeybatı İspanyol popülasyonlarını içermekte ve Akdeniz kümesi ise, orta ve güney İspanyol, İtalyan ve Yunan popülasyonlarını içermektedir. Ayrıca, alt kümeler de tespit edilmiştir. Kuzey İber Yarımadası kümesi Kantabria ve Atlantik kümelerine, Akdeniz kümesi ise batı ve doğu Akdeniz kümeleri olarak belirlenmiştir.

Janfaza *et al.* (2017), İran'da, ülkenin kuzeyindeki küçük parçalı popülasyonlarla temsil edildiği Hyrcanian ormanından *Castanea sativa* (Mill.) genetik çeşitliliğini ve popülasyon yapısını değerlendirmek amacıyla 18 basit dizi tekrarı (SSR) lokusu (10 nSSR ve 8 cpSSR) kullanmışlardır. nSSR için, lokus başına tespit edilen allel sayısı 1-5 arasında ve gözlenen heterozigotluk (H_o) değeri 0.125-1.000 arasında belirlenmiştir. Moleküler varyans analizi (AMOVA), popülasyonlar arasında yüksek düzeyde (%84) ve popülasyonlar arasında düşük düzeyde (%16) bir varyasyon olduğunu göstermiştir. İncelenen dört popülasyonda, genetik mesafe $F_{st}=0.3$ olan iki ana kümeye ayrılmıştır. 'Shafaroud' popülasyonu birinci kümeye ayrılmış, 'Siyahmazgi', 'Qalehroud Khan' ve 'Veysroud' ikinci kümeye yer almıştır. UPGMA analizi, 'Shafaroud' popülasyonunu diğerlerinden ayıran Structure analizinin sonuçlarını doğrular bulunmuştur. Popülasyonları taramak için kullanılan 8 kloroplast SSR lokusu polimorfizm göstermemiştir. Genel olarak, düşük nükleer genetik çeşitlilik, cpDNA'da polimorfizm olmaması ve kısa coğrafi mesafedeki popülasyonlar arasında önemli genetik farklılaşma sonuçları değerlendirildiğinde Hyrcanian ormanındaki *C. sativa* için ciddi bir genetik erozyon tehdidini temsil edici bir sonuç ortaya çıkmıştır. Genetik çeşitlilikteki önemli düşüş nedeniyle, İran'da kestane türü için dört popülasyonunun hepsinin dağılım alanları üzerinde koruma sağlanması hususu ortaya çıkmıştır.

Castanea, *Fagus* ve *Quercus* cinslerinden 25 türün moleküler karakterizasyonu için retrotranspozon esaslı belirteçlerden birisi olan iPBS yöntemi kullanılmıştır. Toplam 150 iPBS markırı üretilmiştir. Her taksonda birkaç monomorfik iPBS markırı da amplifiye olmuştur. Türler arasındaki genetik benzerlik %27 olarak belirlenmiştir. Küresel olarak, iPBS belirteçleri, *Fagaceae* familyasında DNA parmak izi, filogenilerin belirlenmesi ve taksonomik ayırım için uygunluk göstermiş ve germplazm karakterizasyonu ve koruma stratejilerinin ve ormancılık yönetiminin tanımlanması için yararlı ve alternatif bir araç olarak belirlenmiştir (Coutinho *et al.* 2018).

Bouffartigue *et al.* (2020), Fransa'da yabani ve kültürü yapılan kestanelerde genetik çeşitliliği, özellikle örneklenen bölgelerle ilişkili olarak genetik yapıyı ve kestane örnekleri arasındaki ilişkileri değerlendirmek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada, 16 örnekleme bölgesinden toplam 693 kestane bireyi için 24 SSR belirteci ve 17 örnekleme bölgesinden 1401 kestane bireyi için 13 SSR belirteci ile bir genotiplendirme çalışması

yapılmışlardır. Çoğu örnekleme bölgesinde orta düzeyde genetik çeşitlilik sonucu tespit edilmiştir. Yabani ve kültürü yapılan kestaneler arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Genetik yapı analizine göre 18 SSR belirteci kullanımı ile iki küme tanımlanmıştır. Bir küme, güneydoğu Fransa ve Korsika'dan (RPP1) ağaçları içerirken, diğer küme diğer tüm örneklenmiş bölgelerden (RPP2) ağaçları içermiştir. Diğer taraftan, 10 SSR belirteci sonucuna göre, hem RPP1 hem de RPP2 içinde farklılık tespit edilmiştir. RPP1, güneydoğu Fransa ve Korsika arasında ayrılırken; RPP2 ise kuzeybatı Fransa, Aveyron, Pireneler ve diğer birkaç bölgeden bireyleri bir araya getiren son bir küme olarak ayrılmıştır. Örnekleme bölgelerinin içindeki ve arasındaki genetik yapı analizi sonuçları değerlendirilmiş olup tespit edilen farklılıkların sebepleri arasında; muhtemelen doğal olayların (son buzullaşmanın ardından yeniden kolonileşme) ve insan faaliyetlerinin (göç ve değişim) etkili olduğu çıkarımı yapılmıştır.

İtalya'nın Emilia Romagna bölgesinden 134 adet kestane (*Castanea sativa*) genotipinde genetik çeşitliliği tespit etmek amacıyla SSR belirteçler tercih edilmiştir. Toskana-Emilian Apennines bölgesinden üç toplama alanından (Granaglione, Zocca ve Paloneta) örnekler temin edilmiştir. 16 mikrosatellit (SSR) belirteci ile başarılı bir analiz yapılarak söz konusu alanlarda yetişen kestaneler karakterize edilebilmiştir (Alessandri *et al.* 2020).

Nunziata *et al.* (2020), Avrupa kestanelerinde çeşit tanımlaması için yeni bir moleküler araç geliştirmek amaçlı bir çalışma yapmışlardır. Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) markırları kullanılarak genetik çeşitlilik çalışılmıştır. Genetik mesafeler, test edilen genotipler arasında yeterince geniş bir değişkenlik aralığı göstermiş ve çalışma amacına uygun oldukları doğrulanmıştır. Yüksek çözünürlüklü eritme (HRM) yöntemi ile tüm bağlantı gruplarını kapsayan 64 eksprese edilmiş dizi etiketi (EST) içinde SNP'ler belirlenmiş ve dizileme ile doğrulanmıştır. Toplam 56 adet SNP izlenmiştir. 37 SNP'den oluşan bir alt küme, çeşit ayrımı için kompetitif allel spesifik PCR (KASP) primerlerine dönüştürülmüştür. Test edilen çeşitler arasında ayrım yapmada üç primerin (C1083, G0115 ve A5096) gerekli ve yeterli olduğu ortaya çıkmıştır. Geliştirilen bu belirteç primerlerin, Avrupa kestane genetik kaynaklarının taranmasında paydaşlar tarafından etkin bir şekilde kullanılabileceği nitelikte olduğu ifade edilmiştir.

Çin kestanelerinde (*Castanea mollissima* Blume) yapılan bir çalışmada (Nie *et al.* 2021), 146 kestane genotipinden üretilen 18 floresan etiketli SSR markırı kullanarak genetik ilişki ve parmak izi analizi yapılmıştır. Locus başına allel sayısı (Na) 8.100 ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) 0,622 olarak belirlenmiştir. 7 SSR belirteç seçilmiş ve beş çeşit grubu arasındaki genetik akrabalık değerlendirilmiştir. Çin kestane genotiplerinin üç bölgesel tip grubuna ayrılmıştır; grup I [Kuzey Çin (NC) ve Kuzeybatı Çin (NWC) çeşit grupları], grup II [Yangtze Nehrinin (MLY) orta ve daha aşağı kısımları] ve grup III [Güneydoğu Çin (SEC) ve Güneybatı

Çin (SWC) alt grupları]. Sonuç olarak, Çin kestanesi genetik çeşitliliğini temsil eden 45 çekirdek koleksiyon üyesi belirlenmiştir.

1940'larda mürekkebe dayanıklı *Castanea crenata* ve *Castanea mollissima* çöğür fidanlarının dikildiği bir ormanda 13 SSR belirteci kullanılarak toplam 34 yetişkin ağaç ve 42 fidan için bir genotiplendirme çalışması yapılmıştır. Kullanılan 13 adet SSR lokusu oldukça polimorfik bulunmuş ve örneklenen bireyler için 115 farklı alel tespit edilmiştir. Bayes kümelemesine göre, *Castanea sativa* için iki grup, *Castanea mollissima* ve *Castanea crenata* türleri için ise birer grup tanımlanmıştır. Orman içinde, yetişkin ağaçların %70,6'sı ve genç ağaçların %28,6'sı saf *Castanea sativa* olarak sınıflandırılmıştır. Genç ağaçların %40'ının *Castanea sativa* x *Castanea crenata* ve %10'unun *Castanea crenata* × *Castanea mollissima* melezler olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, *Castanea crenata*'ya özel altı yeni alel rapor edilmiştir. Bu çalışma dahilinde Avrupa'da ilk kez, Asya germplazmının doğal bir *Castanea sativa* ormanına dahil oluşunu değerlendirmiştir. Aynı zamanda, genç bireylerin introgresyonun derecesini de incileyerek *Castanea sativa* ormanlarındaki egzotik germplazmı saptamak için bir yöntem sağlayıcı olarak değerlendirilmiştir (Alcaide *et al.* 2022).

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bitki materyali temini

Çalışmada, Türkiye’de en fazla tanınan ticari kestane çeşitleri arasında yer alan Hacıömer, Osmanoğlu, Sariaşlama, Erfelek, Kemer, Işıklar, Şekerci, Siyah Bursa, Bouche De Betizac, Marigoule ve Tülü çeşitleri kullanılmıştır. Kestane çeşitlerine ait her bir bitki materyali fidan, vejetatif olarak çoğaltım yapan fidan üreticileri (Bursa Tarım-Bursa ve Ali Botanik-İzmir) ile doğrudan irtibatla olunarak temin edilmiştir. Bu fidanların “ismine doğru” olarak ifade edilen sertifikalı üretim ürünü bitki materyalleri olmasına dikkat edilmiştir (Ek-1). Çalışma kapsamında kullanılan bu kestane çeşitlerinin bazı özellikleri derlenerek Tablo 3’de sunulmuştur.

İlkbahar döneminde temin edilen kestane fidanlarından kalem kısmından ilk çıkış gösteren genç yaprak örnekleri alınmıştır ve soğuk zincirde Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarına ulaştırılarak ve moleküler analizler için (-) 80°C’de buzdolabında muhafaza altına alınmıştır.

Kullanılan aletler ve cihazlar

Tablo 1. Araştırmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Malzeme	Marka
Buzdolabı (2-8°C)	Arçelik 2395 CNMY
Destile Su Cihazı	Milipore
Derin Dondurucu (-20°C)	Uğur
Derin Dondurucu (-80°C)	NUAIRE
Elektroforez Tankı (Yatay)	Thermo
Elektroforez Akım Sağlayıcı	Thermo
Hassas Terazı	Electronic Balance BL-320H
Jel Görüntüleme Sistemi	PopBio Vü-F Floresans
Kar Üretme Makinesi	Scotsman, AF-80
Mikrodalga Fırın	Arçelik, MD 891 I
Mikropipet Takımı	Eppendorf G15519D
NanoDrop Spektrofotometre	Thermo Multiskan Go
Otoklav	WiseClave WAC47
PCR	Thermo Scientific 5020
Steril Kabin	Hedlab X ProEN 14175
Su Banyosu	Memmert WB14
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X 30R
QIAxcel Advanced	QIAGEN

Kullanılan çözeltiler ve solüsyonlar

Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar

DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler	Elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler
CTAB (w/v)	1X SB buffer
Tris-HCL(1000ml)	10X TBE tamponu
EDTA	0.5X TBE tamponu
NaCl (500ml)	%0.8'lik agaroz
Na ₂ S ₂ O ₃	%1.5'luk agaroz
2-merkaptoetanol	6X loading buffer
PVP	Bromfenol Blue Çözeltisi
Kloroform-izoamil alkol (24:1)	Etidyum Bromür Çözeltisi
Amonyum Asetat	1 Kb'lik DNA ladder
Sodyum asetat	
10XTE Buffer	
1XTE Buffer	
2-propanol (isopropanol)	
Proteinaz K	
Ribonükleaz (RNaz)	
%70'lik Etil Alkol	

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kestane Çeşitlerinin Bazı Özellikleri

No	Çeşit	Tür	Orjin	Habitüs	Verim	Hasat	Meyve iriliği	Tüketim/Değerlendirme	Referanslar
1	Erfelek	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye, Sinop	Orta-Dik	Verimli	Ekim	Orta	Sofralık,	<i>Müftüoğlu (2017); Eser (2019); Kumru (2019); Altın (2022)</i>
2	Hacıömer	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye, Yalova	Orta Yayvan	Verimli	Eylül-Ekim	Orta	Sofralık, Kestane Unu, Kestane şekeri	<i>Soylu (2004); MEB (2013); Uylaser (2009); GEKA (2009); Eser (2019); Kumru (2019); NZOB (2022)</i>
3	Osmanoğlu	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye	Orta-Dik	Verimli	Eylül-Ekim	Küçük/Orta	Kestane şekeri	<i>Uylaser (2009); GEKA (2009); MEB (2013); NZOB (2022)</i>
4	Siyah Bursa	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye	Orta-Dik	Çok Verimli	Ekim	Orta	Sofralık	<i>MEB (2013); NZOB (2022)</i>
5	Şekerci	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye	Dik	Çok Verimli	Ekim-Kasım	Küçük	Sofralık	<i>MEB (2013); NZOB (2022)</i>
6	Sarıaşılama	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye, Bursa	Orta- Dik	Çok Verimli	Ekim	Orta/Büyük	Sofralık, Kestane Unu, Kestane şekeri	<i>MEB (2013); NZOB (2022); Soylu (2004); Eser (2019); Kumru (2019)</i>
7	Kemer	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye	Dik	Verimli	Eylül-Ekim	Orta	Sofralık	<i>MEB (2013); NZOB (2022)</i>
8	Işıklar	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye	Dik-İri	Çok Verimli	Ekim	Orta/Büyük	Sofralık	<i>MEB (2013); NZOB (2022)</i>
9	Tülü	<i>Castanea sativa</i>	Türkiye	Dik	Verimli	Ekim-Kasım	Büyük	Sofralık	<i>Eser (2019); Altın (2022)</i>
10	Marigoule	<i>C. sativa x C. crenata</i>	Fransa	Orta-Dik	Verimli	Eylül	Büyük	Sofralık	<i>Müftüoğlu (2017); Kumru (2019); Altın (2022); Emreköy (2022)</i>
11	Bouche De Betizac	<i>C. sativa x C. crenata</i>	Fransa	Dik	Verimli	Eylül	Çok büyük	Sofralık	<i>Kumru (2019); Emreköy (2022)</i>

Yöntem

Genomik DNA izolasyonu

Çalışmada, Li ve Quiros (2001)'dan modifiye edilen DNA izolasyon protokolü esas alınmış olup aşağıda sıralanan işlemlerle DNA'lar elde edilmiştir.

Bitki materyali genç yapraklar, sıvı azot yardımıyla porselen havanda parçalanmıştır. DNA ekstraksiyon tamponu çalışma anında hazırlanarak 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda bekletilmiştir. Öğütülmüş haldeki bu örneklerden 0,3 gr tartılarak, 2 ml'lik ependorf tüplerine alınmıştır. Tüplerdeki örnekler üzerine 1 ml önceden ısıtılmış ekstraksiyon tamponu [%2 CTAB (w/v); 1,42 M NaCl; 200 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; %1 Na₂S₂O₃] eklenmiştir. Bitki materyaline ilave edilmeden önce ekstraksiyon tamponuna %0.2 (v/v) oranında β -merkaptoetanol ve 0,2 g PVP ilave edilmiştir. Tüpler yavaşça alt-üst edilerek 65°C'lik su banyosuna yerleştirilmiş ve her 10 dk'da bir alt üst edilerek 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir ve ardından 10 dk süre ile 4°C'de 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu işleminden sonra üst fazdan yaklaşık 750 μ l alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerine kloroform-izoamil alkol (24:1)'den 750 μ l eklenerek 1 dk süre ile yavaşça alt-üst edilmiştir. Tüpler 4°C 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üst fazdan 600 μ l alınarak yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 600 μ l kloroform-izoamil-alkol (24:1) eklenmiştir. Üst faza 2,5 μ l RNaz ve 8 μ l proteinaz-K eklenmiş ve 45 dk 37°C'de bekletilmiştir. Tüpler tekrar 4°C 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Buz içerisinde olan yeni tüplere üst fazdan 500 μ l aktarılmış, DNA'yı çöktürmek için üzerine 100 μ l amonyum asetat (10 M), 100 μ l sodyum asetat (3 M pH:5,5) ve 500 μ l (-20°C'de önceden soğutulmuş) izopropanol ilave edilmiştir. Tüpler 4°C 14000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir ve üst faz dökülerek uzaklaştırılmıştır. Böylece DNA pelletinin görülmesi sağlanmıştır. DNA'nın bulunduğu her tüpe 200 μ l %70'lik etanol eklenerek yıkanması sağlanmıştır. Tüpler 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz dökülmüştür. DNA'lar oda koşullarında bekletilerek kurutulması sağlanmıştır. Kurutulan DNA örnekleri üzerine 150 μ l 1X TE buffer eklenerek çözündürülmüş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA miktarının kantitatif ve kalitatif tayini

DNA örneklerinin kantitatif tayini için, NanoDrop-spektrofotometre (ND-1000-NanoDropTechnologies, USA) kullanılmıştır. Her bir örnekten 2 μ l alınarak ölçümler yapılmış olup elde edilen 260/280 oranıyla protein kontaminasyonu belirlenmiştir. Aynı zamanda DNA konsantrasyon ölçüm sonuçları dikkate alınarak tüm örneklerle ait DNA'ların konsantrasyonları eşitlenmiştir. DNA konsantrasyonu 50 ng/ μ l olacak şekilde PCR analizleri öncesinde

hazırlanmıştır ve (-) 20°C’de muhafaza altına alınarak laboratuvar işlemleri sürdürülmüştür. DNA örneklerinin kalitatif tayini için 1X TBE buffer ile hazırlanan %1’lik agaroz jelde 5 µl DNA örneği, 5 µl ultra saf su ve 3 µl 6X loading buffer ile birlikte kuyucuklara yükleme yapılmıştır. 60 Volt akım ile 30 dk kadar elektroforez işlemi sonunda UV-görüntüleme (BIORAD Gel Doc 2000) ile DNA bantları görüntülenmiştir.

SSR ve EST-SSR analizleri

Bu çalışmada, kestanelerde kuraklık ilişkili olarak toleranslılık tespitinde kullanılmış olan SSR lokusları (Tablo 4, Castallana *et al.* 2021) ve genik EST-SSR lokusları tercih edilmiştir (Tablo 4, Alcaide *et al.* 2019; Castallana *et al.* 2021). SSR ve EST-SSR analizleri için Gradient PCR işlemi bileşenleri ve her bir örnek için kullanım miktarı Tablo 5’de belirtilmiş olup Gradient PCR reaksiyon adımları ise Tablo 6’da verilmiştir (Castallana *et al.* 2021; Alcaide *et al.* 2019).

Tablo 4. SSR ve EST-SSR Lokusların Motif, Primer Dizi Bilgisi ve Beklenen Bant Büyüklükleri

Lokus ismi	Lokus Motifi	Forward (ileri) ve Reverse (geri) primer dizi bilgisi (5’→3’)	Beklenen bant büyüklüğü (bp)
SSR belirteçler			
CsCAT1	(TG)	F: GAGAATGCCCACTTTTGCA R: GCTCCCTTATGGTCTCG	220
CsCAT3	AG	F: CACTATTTTATCATGGACGG R: CGATTGAGAGTTCATACTC	224
CsCAT6	(AC)AT(AC)	F: AGTGCTCGTGGTCAGTGAG R: CAACTCTGCATGAATAAC	180
CsCAT16	TC	F: CTCCTTGACTTTGAAGTTGC R: CTGATCGAGAGTAATAAAG	143
EMCs38	AG	F: TTTCCCTATTTCTAGTTTGTGATG R: ATGGCGCTTTGGATGAAC	228-270
EST-SSR belirteçler			
FIR080	ACC	F: ACCATACCTGGCTTCGATGA R: AAGGTGAGTTGGTGGTGGAG	207
GOT004	TG	F: GGGCATATTGATCGCTTAGG R: TGAGCATTCATACATTCCATGAT	290
GOT021	AT	F: AGAAAGTTCCAGGGAAAGCA R: CTCGTCCTCCAGTTGAATGT	113
VIT057	AACTCG	F: TCAGCAAAATCCCAACTTTGT R: AACTTCGCTGTTCTCGAT	168
FIR059	GA	F: GGTGGTTTCCGTGAGCATAG R: TTGCCACACCTTCTCGTTAG	157-169
FIR094	CT	F: CAAAAGCCTCTCACTCTTGAGC R: TCAAACCCAAACAAAACGAA	199-215
GOT045	CT complex	F: TCAACAAAACCCATTAAACCAA R: GGATCGGAGTGAAATGGAGA	141
VIT033	CTT)(CCT)CTT	F: CATGAAGAACACACACGATGC R: TTCGGTGAACCTGAACTAGGC	111

Gradient PCR ürünlerinin elektroforez işlemleri 1X TBE buffer ile hazırlanan %1,5’luk agaroz jelde yapılmıştır ve UV görüntüleri (BIORAD Gel Doc 2000) kaydedilmiştir. Jeldeki

her sıranın ilk ve son kuyucuğuna 3 µL 1 Kb'lik DNA ladder yüklenmiştir. Tüm görüntüler değerlendirilerek optimize edilen bağlanma sıcaklık değerleri belirlenmiştir ve araştırma bulguları bölümünde sonuçlara yer verilmiştir.

Gradient PCR ve tüm SSR ve EST-SSR primerleri için PCR işlemleri, Thermo Scientific-5020 cihazında yapılmıştır. Primerlerin çalışıldığı PCR ürünlerinin elektroforez işlemleri, **QX alignment marker ve QX DNA size marker eşliğinde, Qiagen Kapiller analiz sisteminde (Beckman Coulter, Fullerton, CA) QIAxcel DNA Kiti** kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 5. EST-SSR ve SSR Analizlerinde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri için Komponentler ve Kullanım Miktarları

PCR komponentleri	Miktar (µl)
2x Type-it Multiplex Microsatellite PCR Master Mix (Qiagen)	6,25
10x Primer Mix (2µM of each primer)	1.25
RNase-free water	1
DNA (20ng/µl)	4
Toplam hacim	12,5

Tablo 6. EST-SSR ve SSR Analizlerinde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri Reaksiyon Adımları

95 °C	3 dk	
94 °C	3 sn	
57 °C	1 dk	35 döngü
72 °C	1 dk	
72 °C	30dk	
4 °C	∞	

iPBS analizleri

Kalendar *et al.* (2010)'nın tasarlayarak geliştirmiş oldukları 19 adet retrotranspozon esaslı iPBS belirteci çalışmada kullanılmıştır (Tablo 7). iPBS primerlerin bağlanma sıcaklıkları değişebilmektedir. Bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için, primer bağlanma sıcaklığı 50-60°C arasında olacak şekilde Gradient PCR işlemi yapılmıştır. iPBS analizleri için Gradient PCR işlemi bileşenleri ve her bir örnek için kullanım miktarı Tablo 7'de belirtilmiştir (Gleku 2020). iPBS markör yöntemi için kullanılacak Gradient PCR reaksiyon adımları ise Tablo 9'da verilmiştir.

Gradient PCR işlemleri Thermo Scientific-5020 cihazında yapılmıştır. Gradient PCR ürünlerinin elektroforez işlemleri 1X TBE buffer ile hazırlanan %1,5'lik agaroz jelde yapılmıştır ve UV görüntüleri (BIORAD Gel Doc 2000) kaydedilmiştir. Jeldeki her sıranın ilk

ve son kuyucuğuna 3 µL 1 Kb’lik DNA ladder yüklenmiştir. Tüm görüntüler değerlendirilerek optimize edilen bağlanma sıcaklık değerleri araştırma bulguları bölümünde Tablo 17’de paylaşılmıştır.

Çalışmada tercih edilen tüm iPBS primerler için PCR işlemleri **Thermo Scientific-5020** cihazında yapılmıştır. PCR ürünlerinin elektroforez işlemleri, **QX alignment marker ve QX DNA size marker** eşliğinde, **Qiagen Kapiller analiz sisteminde (Beckman Coulter, Fullerton, CA) QIAxcel DNA Kiti** kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 7. iPBS Belirteçlerin Primer Dizi Bilgisi ve Literatür Kaynaklı Bağlanma Sıcaklık Değerleri (Ta, °C) (Kalendar *et al.* 2010; Coutinho *et al.* 2018)

No	iPBS Belirteçler	Primer dizi bilgisi (5’→3’)	Ta (°C)
1	2222	ACTTGATGCCGATACCA	53,0
2	2224	ATCCTGGCAATGGAACCA	55,4
3	2229	CGACCTGTTCTGATACCA	52,5
4	2230	TCTAGGCGTCTGATACCA	52,9
5	2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	55,4
6	2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	55,0
7	2238	ACCTAGCTCATGATGCCA	56,0
8	2239	ACCTAGGCTCGGATGCCA	55,0
9	2242	GCCCCATGGTGGGCGCCA	57,0
10	2249	AACCGACCTCTGATACCA	51,0
11	2251	GAACAGGCGATGATACCA	53,2
12	2252	TCATGGCTCATGATACCA	51,6
13	2253	TCGAGGCTCTAGATACCA	51,0
14	2256	GACCTAGCTCTAATACCA	51,0
15	2257	CTCTCAATGAAAGCACCA	50,0
16	2295	AGAACGGCTCTGATACCA	60,0
17	2298	AGAAGAGCTCTGATACCA	60,0
18	2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	52,8
19	2400	CCCCTCCTTCTAGCGCCA	51,0

Tablo 8. iPBS Analizlerde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri için Komponentler ve Miktarları (Gleku, 2020)

PCR komponentleri (Kit içeriğine ilave)	Miktar (µl)
Primer (10 pmol)	1
Taq DNA Polimerase	8
Ultra saf su	5
DNA (5ng/ul)	1
Toplam hacim	15

Tablo 9. iPBS Analizlerde Gradient PCR ve Primerlerin Çalışıldığı PCR İşlemleri Reaksiyon Adımları

Ön denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	1 dk	
Bağlanma	50-60 °C	1dk 5sn	40 döngü
Uzama	72 °C	1dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	
Bekleme	4 °C	∞	

SSR, EST-SSR ve iPBS belirteçler için skrolama ve veri analizleri

DNA esaslı belirteçlerin kullanıldığı moleküler düzeydeki analizlerin sonuçları, farklı istatistiksel programlar ve yöntemler kullanılarak değerlendirilebilmektedir.

Veri analizlerinde kullanılan istatistiksel programlardan birisi olan ve sayısal numaralandırma sistemi olarak ifade edilen NTSYSpc-2.2 (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System), çok değişkenli veriler için kullanılabilmektedir. Değişkenlerde karakterlerin varlığı için “1” ve yokluğu için ise “0” kullanılarak matris oluşturulmaktadır. Programda, dendrogram oluşturma ve temel bileşen analizleri (2D ve 3D) yapılabilmektedir. Dendrogramlar, çeşitli düzeyde iç içe bölümlere ayrılmış verilerin oluşturduğu gösterim şekli olup dikey çizgiler bir araya gelmiş kümeleri temsil etmektedir. Dendrogramlar üzerindeki çizgilerin pozisyonu, kümeler bir araya geldiğindeki uzaklıkları gösterir. Küme analizi ile her bir birey için çok sayıda değişkenin gözlenen değerlerine dayanarak benzer gözlemleri bir dizi küme halinde gruplandırmak mümkündür. Temel Komponent Analizi (PCA=Principle Component Analysis) yöntemi, muhtemel ilişkili değişkenler setini, temel bileşenler olarak adlandırılan doğrusal olarak ilişkilendirilmemiş değişkenler setine dönüştüren ortogonal (dikey) bir dönüşümdür (Ekinci 2020). Temel Koordinat Analizi (PCoA= Principal Coordinate Analysis) ise verilerin benzerliklerini veya farklılıklarını keşfetmek ve görselleştirmek için kullanılan çok boyutlu bir ölçekleme yöntemidir. PCoA, PCA'nın bir genellemesidir ve değişkenler arasındaki benzerliğin ölçülmesini içerir. Bir benzerlik matrisi veya benzemezlik matrisi (mesafe matrisi) ile başlar ve her öge için bir 3D grafik olarak düşük boyutlu bir uzayda bir konum atar (Karımızadeh *et al.* 2019).

Çalışmada, kapiller elektroforez işlemi sonucunda elde edilen görüntüler; **SSR, EST-SSR ve iPBS** primerlerin göstermiş olduğu polimorfik bantlar açısından ayrı ayrı skorlanmıştır.

Bireyler arasındaki genetik benzerlik değerleri, NTSYS paket programı kullanılarak analiz edilmiştir (Rohlf, 2000). UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic

Average) kümeleme analizi yardımıyla Jaccard (1908) benzerlik katsayısı (Nei, 1972) kullanılarak bireyler arasındaki benzerlik indeksleri hesaplanmıştır (değerin 0'a yaklaşması az benzerlik ve değer 1'e yaklaşması çok yakın benzerlik). Dendrogramlar oluşturularak bireyler arasındaki ilişkiler ve gruplar belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan belirteç primerlerin polimorfizm oranları, *Polimorfizm Oranı (%) = (Polimorfik bant sayısı/Toplam bant sayısı) x100* formülü ile hesaplanmıştır.

İlave olarak, çoğaltılan her bir primer için iMEC online aracı (Çevrimiçi Markır Verimliliği Hesaplayıcı) (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) kullanılarak bazı polimorfizm göstergelerinin tespiti yapılmıştır. Belirlenen iMEC göstergeleri (indeksler) arasında; H değeri (expected Heterozygosity), PIC değeri (Polymorphism Information Content), E değeri (Effective multiplex ratio), MI değeri (Marker index), D değeri (Discriminating power) ve R değeri (Resolving power) bulunmaktadır. Bu göstergeler, dominant ve kodominant DNA parmak izi belirteçlerine dayalıdır ve belirli bir veri seti için en uygun genetik belirteçlerin karşılaştırılmasına ve seçilmesine olanak tanır (Tablo 10) (Amiryousefi *et al.* 2018).

Tablo 10. iMEC Tarafından Hesaplanan Polimorfizm Göstergeleri

Gösterge	Formül	Özellik
Beklenen heterozigotluk	$H = 1 - \sum p_i^2$	Bir bireyin heterozigot olma olasılığı
Polimorfizm bilgi içeriği	$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum p_i^2 p_j^2$	Genetik bir belirteçin bilgi düzeyini ölçmek için kullanılır. PIC, heterozigotluktan farklı olup allellerin sayısına ve sıklıklarının dağılımına bağlı olarak, polimorfizmi saptamak için bir belirteçin değerini ifade etmektedir.
Etkili multipleks oranı	$E = n \beta$	Polimorfik lokusların deney fraksiyonu başına analiz edilen ilgili germplazm setindeki polimorfik lokusların sayısı
Aritmetik ortalama heterozigotluk	$H_{avp} = \sum H_n / n_p$	Polimorfik belirteçler için hesaplanan ortalama heterozigotluk. (arithmetic mean heterozygosity) Gözlenen heterozigotluk
Markır indeksi	$MI = E H_{avp}$	Polimorfik belirteçler için etkili multipleks oranı ve ortalama beklenen heterozigotluğun ürünü
Ayırt etme gücü	$D = 1 - C$	Genotiplerin tanımlanmasında primerlerin etkinliğini değerlendirir
Çözme gücü	$R = \sum I_b$	Örneklenen bireylerde allellerin dağılımına dayanır. Analiz edilen örnekler arasında ayırım yapma yeteneği ile güçlü bir şekilde ilişkilidir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

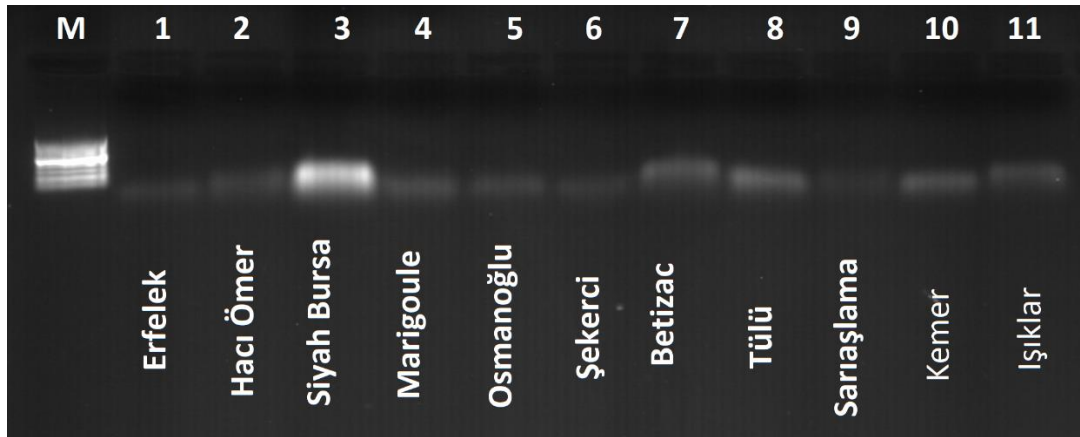
DNA İzolasyon İşlemlerine ait Bulgular

Nanodrop analizi sonuçları değerlendirilmiştir ve kestane bitki materyallerinden izole edilen DNA'ların hem miktar hem de kalite açısından SSR, EST-SSR ve iPBS belirteçlerle moleküler analiz çalışmalarında kullanılabilir oldukları belirlenmiştir. Kestane çeşitlerine ait DNA'ların saflık değerleri ve konsantrasyon miktarları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kestane Çeşitlerinden İzole Edilen DNA'ların Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

Örnek No	Çeşit ismi	Saflık Değeri (OD260/OD280)	DNA Miktarı (ng/µl)
1	Erfelek	1,57	400
2	Hacı Ömer	1,49	580
3	Siyah Bursa	1,47	1717
4	Marigoule	1,78	127
5	Osmanoğlu	1,60	226
6	Şekerci	1,58	131
7	Betizac	1,63	127
8	Tülü	1,59	381
9	Sarıaşlama	1,48	449
10	Kemer	1,60	572
11	Işıklar	1,62	1320

Bu bulgulara ilave olarak, kestane çeşitlerine ait DNA'ların %1'lik agaroz jelde elde edilen görüntüsü Şekil 4'de sunulmuştur.



Şekil 4. İzole edilen DNA'ların elektroforez jel görüntüsü.

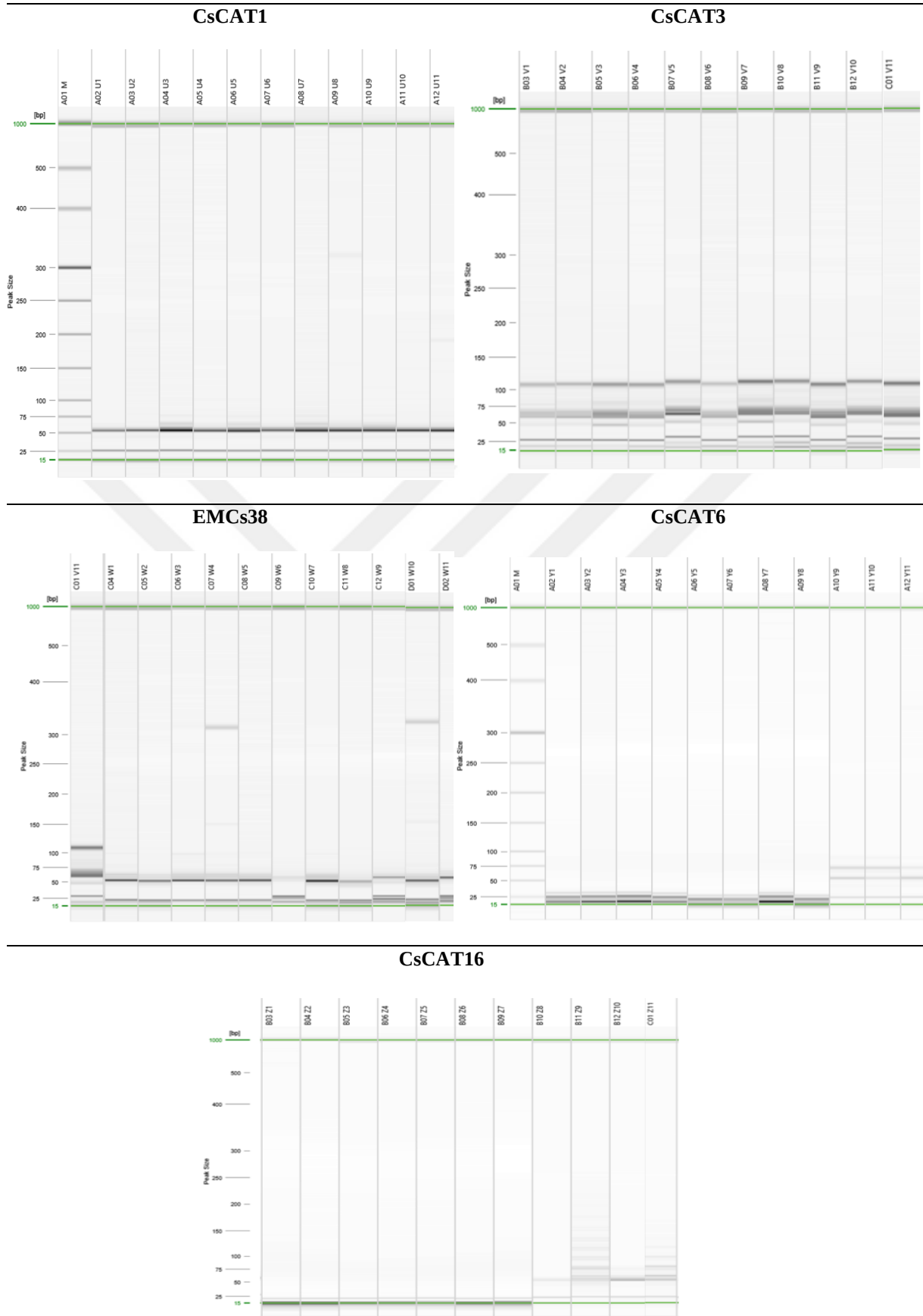
SSR ve EST-SSR Analizlerine ait Bulgular

Çalışmada kullanılan 5 adet SSR ve 8 adet EST-SSR primeri için gradient PCR ile belirlenen primer bağlanma sıcaklık değerleri (Ta, °C) Tablo 12’de verilmiştir.

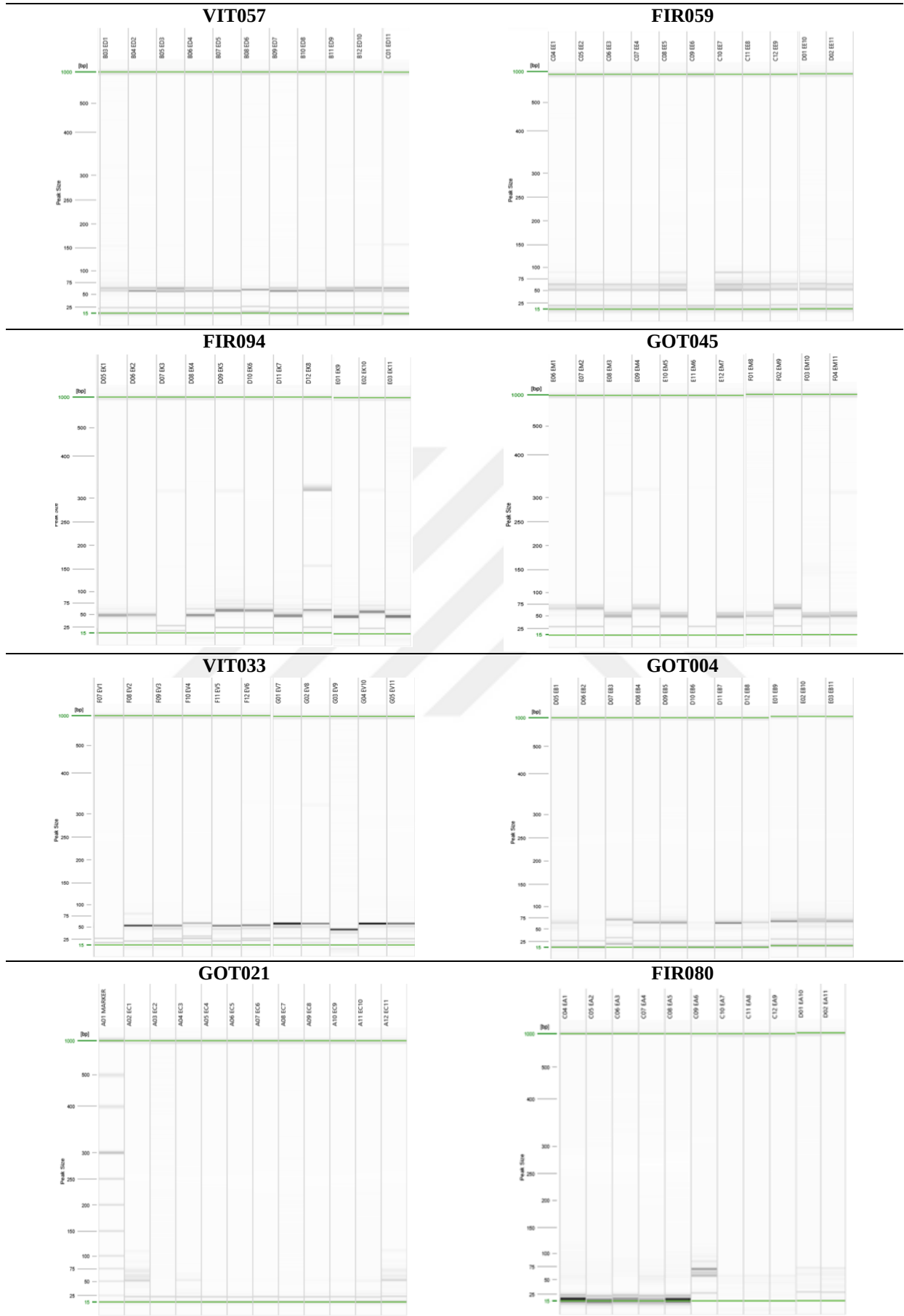
Tablo 12. SSR ve EST-SSR Primerlerin Gradient PCR ile Belirlenen Bağlanma Sıcaklıkları

Lokus ismi	Primer bağlanma sıcaklıkları (°C)
SSR Primerler	
CsCAT1	50,0
CsCAT3	51,5
CsCAT6	58,3
CsCAT16	58,3
EMCs38	60,0
EST-SSR Primerler	
FIR080	52,6
GOT004	60,0
GOT021	57,2
VIT057	54,0
FIR059	57,2
FIR094	60,0
GOT045	54,0
VIT033	54,0

11 adet kestane çeşidi için yapılan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) işlemlerinden elde edilen SSR primerlerine ait kapiller elektroforez görüntüsü Şekil 5’de ve EST-SSR primerlerine ait kapiller elektroforez görüntüleri ise Şekil 6’da sunulmuştur.

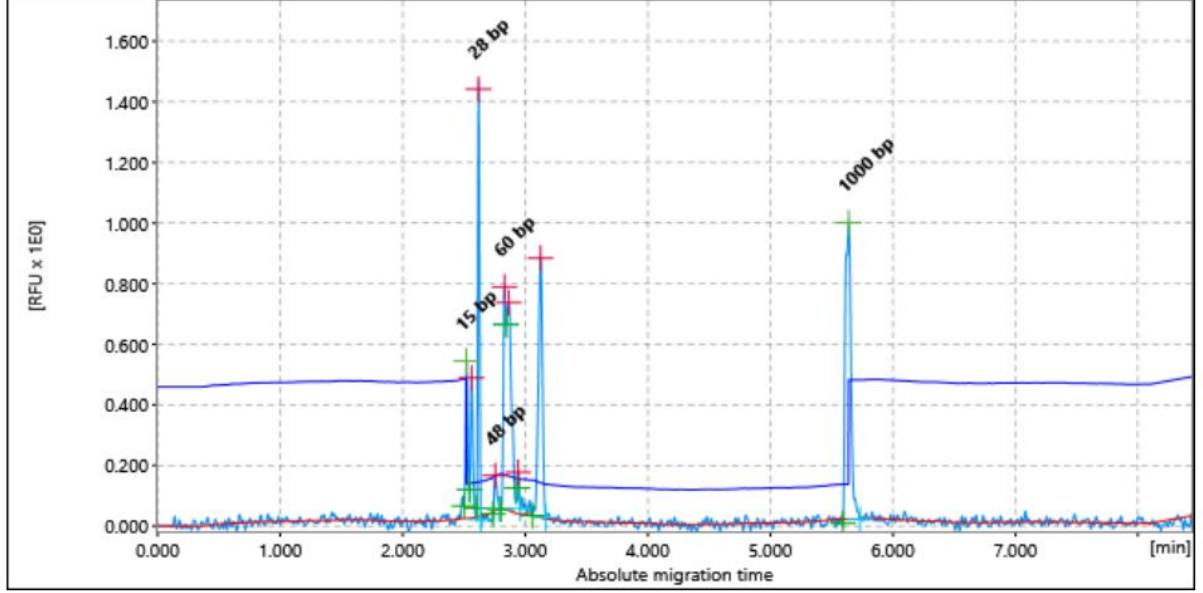


Şekil 5. SSR primerlerine ait kapiller elektroforez görüntüleri.

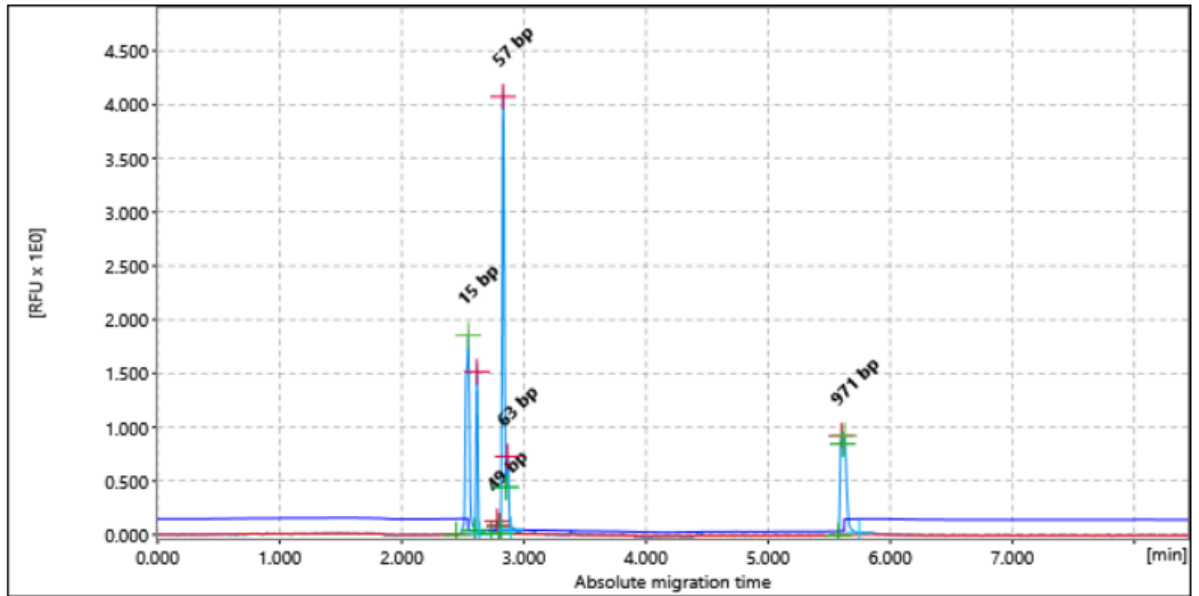


Şekil 6. EST-SSR primerlerine ait kapiller elektroforez görüntüleri.

Çalışmada kullanılan 11 kestane çeşidi için, 5 adet SSR, 8 adet EST-SSR primerine ait Qiagen Kapiller analiz sisteminde elde edilen pikler skorlanmıştır ve istatistik analizler yapılmıştır. Örneğin, Erfelek kestane çeşidine ait SSR CsCAT3 primerine ait elektroferogram görüntüsü ve belirlenen pik değerleri Şekil 7’de ve Tülü kestane çeşidine ait EST-SSR VIT057 primerine ait elektroferogram görüntüsü ve belirlenen pik değerleri Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 7. Erfelek kestane çeşidine ait SSR CsCAT3 primerine ait elektroferogram görüntüsü.



Şekil 8. Tülü kestane çeşidine ait EST-SSR VIT057 primerine ait elektroferogram görüntüsü.

Genomik SSR primerleri ile yapılan PCR işlemlerinden elde edilen bant profilleri değerlendirilmiştir ve bu primerlere ait allel boyutu aralık değerleri ile birlikte toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm oranı, ortalama heterozigotluk, polimorfizm bilgi içeriği, markır indeksi ve ayırt etme gücü değerleri Tablo 13’de özetlenmiştir. *Castanea sativa* Mill. kestane türünün 11 çeşidi için uygulanan SSR primerlerinin amplifikasyonu sonrasında, boyutları primere göre değişiklik gösteren toplam 507 adet bant elde edilmiştir (Ek-2) ve kullanılan primerlerin tamamında %100 polimorfiklik saptanmıştır. Primer başına ortalama 101,4 bant elde edilmiştir. En yüksek sayıda polimorfik bant veren SSR primeri CsCAT3 (122 bant) olurken en düşük sayıda polimorfik bant veren SSR primeri CsCAT1 (76 bant) olmuştur. **Ortalama Gözlenen Heterozigotluk (H_{avp}) değeri**, en yüksek SSR CsCAT1 primerinde (0,464) belirlenirken, en düşük SSR CsCAT6 primerinde (0,351) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm SSR primerlerinin ortalama H_{avp} değeri 0,395 olarak kaydedilmiştir. **PIC değeri** hesaplamaları sonucu elde edilen verilere göre; en yüksek PIC değerleri SSR CsCAT6 (0,366) ve CsCAT16 (0,366) primerlerinde tespit edilirken en düşük PIC değeri SSR CsCAT1 (0,339) primerinde tespit edilmiştir. Ortalama PIC değeri ise 0,357 olarak belirlenmiştir. **Markır İndeksi (MI)**, en yüksek 0,464 değeri ile SSR CsCAT1 primerinde tespit edilmiş olup en düşük ise 0,351 değeri ile SSR CsCAT6 primerinde tespit edilmiştir (ortalama 0,395). **Ayırt Etme Gücü (D)**, en yüksek 0,435 değeri ile SSR CsCAT3 primerinde tespit edilirken, en düşük SSR CsCAT6 primerinde (0,370) tespit edilmiştir. Tüm primerler için hesaplanan ortalama ayırt etme gücü değeri 0,393 olarak kaydedilmiştir.

Tablo 13. EST-SSR Primerlerine ait Bant Sayısı, Polimorfiklik, Heterozigotluk, Polimorfizm Bilgi İçeriği, Markır İndeksi ve Ayırt Etme Gücü Değerleri

SSR primer	AB (bp)	TBS	PBS	PO (%)	H_{avp}	PIC	MI	D
CsCAT1	23-976	76	76	100	0,464	0,339	0,464	0,410
CsCAT3	19-976	122	122	100	0,442	0,345	0,442	0,435
CsCAT6	19-976	97	97	100	0,351	0,366	0,351	0,370
CsCAT16	18-977	105	105	100	0,355	0,366	0,355	0,375
EMCs38	20-976	107	107	100	0,405	0,355	0,405	0,393
Ortalama		101,4	101,4	100	0,395	0,357	0,395	0,393
Toplam		507	507					

AB: Allel boyutu, TBS: Toplam bant sayısı, PBS: Polimorfik bant sayısı, PO: Polimorfizm oranı, H_{avp} : Ortalama Heterozigotluk, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği, MI: Markır İndeksi, D: Ayırt etme gücü.

Genik EST-SSR primerleri ile yapılan PCR işlemlerinden elde edilen bant profilleri değerlendirilmiştir ve bu primerlere ait allel boyutu aralığı ile birlikte toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm oranı, ortalama heterozigotluk, polimorfizm bilgi içeriği, markır indeksi ve ayırt etme gücü değerleri Tablo 14’de özetlenmiştir. Kestane türüne ait 11 çeşit için uygulanan EST-SSR primerlerinin amplifikasyonu sonrasında elde edilen, boyutları primere göre değişiklik gösteren toplam 728 bant elde edilmiştir (Ek-3). Bu primerlerin herbiri için %100 oranında polimorfiklik belirlenmiştir. Primer başına ortalama 91 bant elde edilmiştir. En yüksek sayıda polimorfik bant veren EST-SSR primerleri FIR059 (115 bant) ve VIT057 (102 bant) olurken en düşük sayıda polimorfik bant veren EST-SSR primer ise GOT021 (74 bant) olmuştur. **Ortalama Gözlenen Heterozigotluk (H_{avp}) değeri**, en fazla EST-SSR FIR059 primerinde (0,377) belirlenirken, en az EST-SSR FIR080 primerinde (0,240) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm EST-SSR primerlerinin ortalama H_{avp} değeri ise 0,309 olarak kaydedilmiştir. **PIC değeri**, en yüksek EST-SSR FIR080 primerinde 0,281 olarak tespit edilirken en düşük EST-SSR FIR059 primerinde 0,240 olarak tespit edilmiştir. Ortalama PIC değeri ise 0,262 olarak belirlenmiştir. **Markır İndeksi (MI)**, en yüksek 0,377 değeri ile EST-SSR FIR059 primerinde tespit edilmiştir. En düşük ise 0,240 değeri ile SSR FIR080 primerinde tespit edilmiştir (ortalama 0,309). **Ayırt etme gücü (D)**, en yüksek 0,980 değeri ile EST-SSR FIR059 primerinde ve en düşük ise EST-SSR GOT021 primerinde (0,304) kaydedilmiştir. Tüm primerler için hesaplanan ortalama D değeri 0,287 olarak belirlenmiştir.

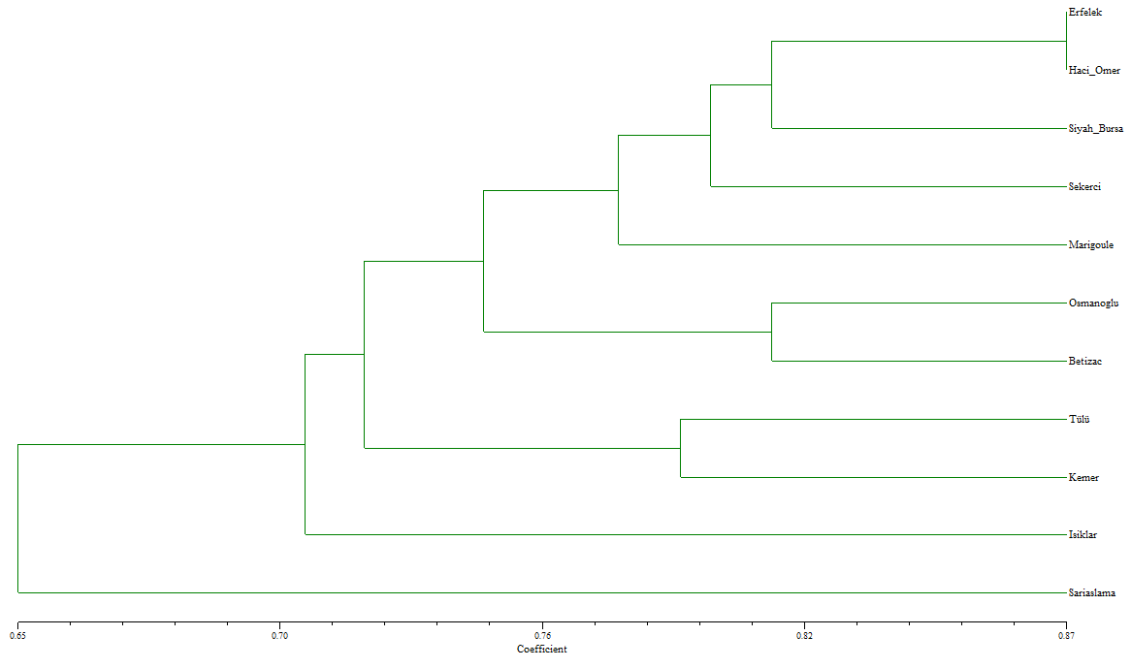
Tablo 14. EST-SSR Primerlerine ait Bant Sayısı, Polimorfiklik, Heterozigotluk, Polimorfizm Bilgi İçeriği, Markır İndeksi ve Ayırt Etme Gücü Değerleri

EST-SSR primer	AB (bp)	TBS	PBS	PO (%)	H _{avp}	PIC	MI	D
FIR059	21-975	115	115	100	0,377	0,240	0,377	0,304
FIR080	17-976	91	91	100	0,240	0,281	0,240	0,980
FIR094	19-972	94	94	100	0,248	0,278	0,248	0,979
GOT004	20-976	85	85	100	0,343	0,250	0,343	0,952
GOT021	23-976	74	74	100	0,326	0,256	0,326	0,958
GOT045	19-975	82	82	100	0,331	0,254	0,331	0,956
VIT033	19-973	86	86	100	0,301	0,264	0,301	0,966
VIT057	17-976	102	102	100	0,343	0,250	0,343	0,951
Ortalama		91	91	100	0,309	0,262	0,309	0,287
Toplam		728	728					

AB: Allel boyutu, TBS: Toplam bant sayısı, PBS: Polimorfik bant sayısı, PO: Polimorfizm oranı, H_{avp}: Ortalama Heterozigotluk, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği, MI: Markır İndeksi, D: Ayırt etme gücü.

SSR verilerine dayalı kümeleme analizi

Çalışmada SSR belirteçlerle elde edilen UPGMA dendrogramı Şekil 9’da sunulmuştur.



Şekil 9. SSR belirteçleri ile oluşturulan UPGMA dendrogramı.

SSR verilerine dayalı benzerlik analizi

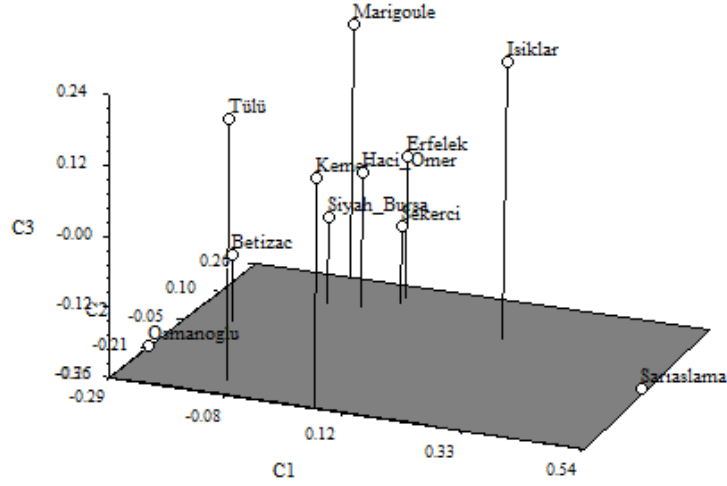
Çalışmada kullanılan SSR belirteçlere ait benzerlik matrisi Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. SSR belirteçler ile elde edilen Benzerlik Matrisi

Çeşit	Erfelek	Hacı Ömer	Siyah Bursa	Marigoule	Osmanoğlu	Şekerci	Betizac	Tülü	Sarı aşılama	Kemer	Işıklar
Erfelek	1,000										
Hacı Ömer	0,873	1,000									
Siyah Bursa	0,785	0,834	1,000								
Marigoule	0,800	0,810	0,771	1,000							
Osmanoğlu	0,732	0,741	0,732	0,678	1,000						
Şekerci	0,790	0,829	0,771	0,727	0,698	1,000					
Betizac	0,795	0,824	0,785	0,751	0,810	0,741	1,000				
Tülü	0,737	0,776	0,717	0,702	0,741	0,712	0,737	1,000			
Sarıaşılama	0,698	0,698	0,649	0,595	0,576	0,663	0,620	0,610	1,000		
Kemer	0,702	0,761	0,722	0,678	0,698	0,688	0,741	0,790	0,683	1,000	
Işıklar	0,776	0,746	0,698	0,712	0,644	0,712	0,707	0,688	0,688	0,702	1,000

SSR verilerine dayalı temel bileşen analizi

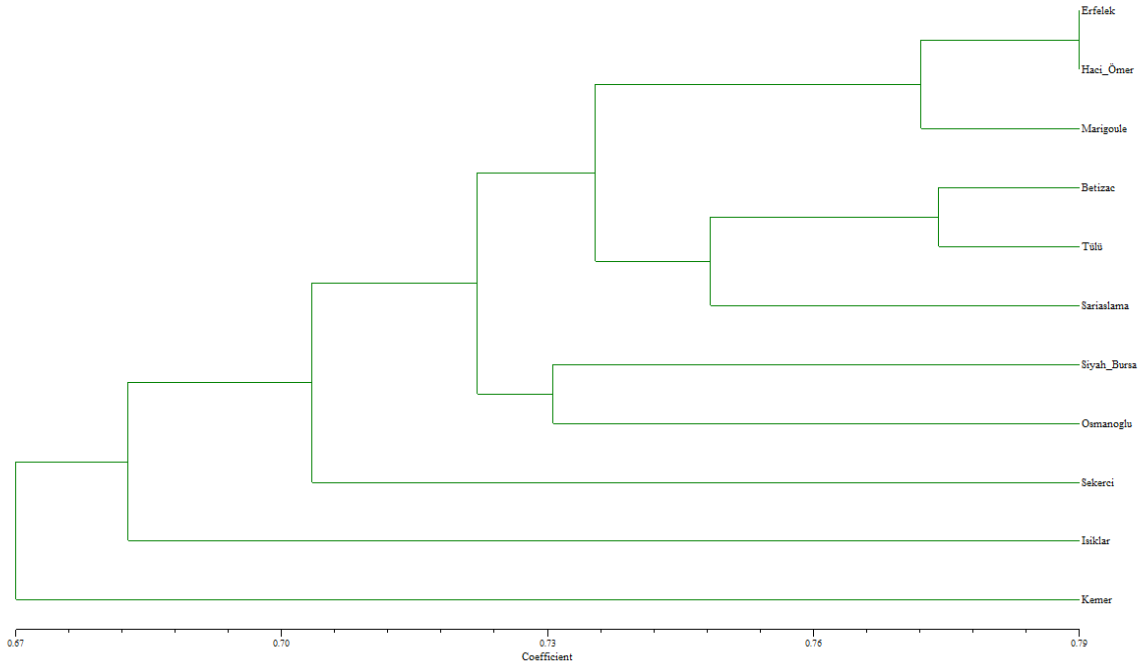
11 adet kestane çeşidinde SSR belirteçler ile elde edilen ait üç boyutlu PCoA (Principle coordinate analysis) sonucu Şekil 10’da verilmiştir.



Şekil 10. 11 adet kestane çeşidinde SSR belirteçlere ait PCoA analizi.

EST-SSR verilerine dayalı kümeleme analizi

EST-SSR belirteçlerle elde edilen UPGMA dendrogramı Şekil 11’de sunulmuştur.



Şekil 11. EST-SSR belirteçleri ile oluşturulan UPGMA dendrogram.

EST-SSR verilerine dayalı benzerlik analizi

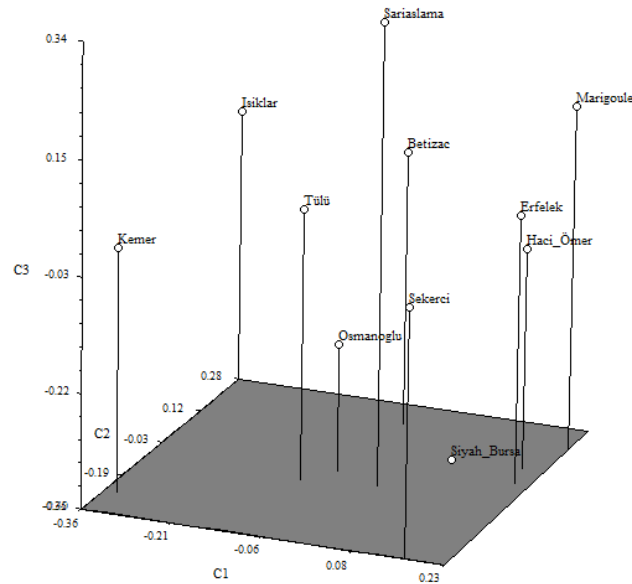
Çalışmada kullanılan EST-SSR belirteçlere ait benzerlik matrisi Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. EST-SSR belirteçler ile elde edilen Benzerlik Matrisi

Çeşit	Erfelek	Hacı Ömer	Siyah Bursa	Marigoule	Osmanoğlu	Şekerci	Betizac	Tülü	Sarı aşılama	Kemer	Işıklar
Erfelek	1,000										
Hacı Ömer	0,789	1,000									
Siyah Bursa	0,739	0,759	1,000								
Marigoule	0,759	0,785	0,690	1,000							
Osmanoğlu	0,709	0,751	0,732	0,720	1,000						
Şekerci	0,720	0,709	0,682	0,693	0,720	1,000					
Betizac	0,751	0,770	0,736	0,747	0,736	0,686	1,000				
Tülü	0,739	0,713	0,724	0,697	0,747	0,728	0,774	1,000			
Sarıaşılama	0,739	0,743	0,670	0,728	0,701	0,705	0,743	0,755	1,000		
Kemer	0,678	0,697	0,655	0,636	0,693	0,644	0,682	0,693	0,686	1,000	
Işıklar	0,670	0,674	0,670	0,682	0,709	0,628	0,743	0,709	0,682	0,667	1,000

EST-SSR verilerine dayalı temel bileşen analizi

Çalışmada elde edilen 11 adet kestane çeşidinde EST-SSR belirteçlerin analizi ile elde edilen üç boyutlu PCoA (Principle coordinate analysis) sonucu Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. 11 adet kestane çeşidinde EST-SSR belirteçlere ait PCoA analizi.

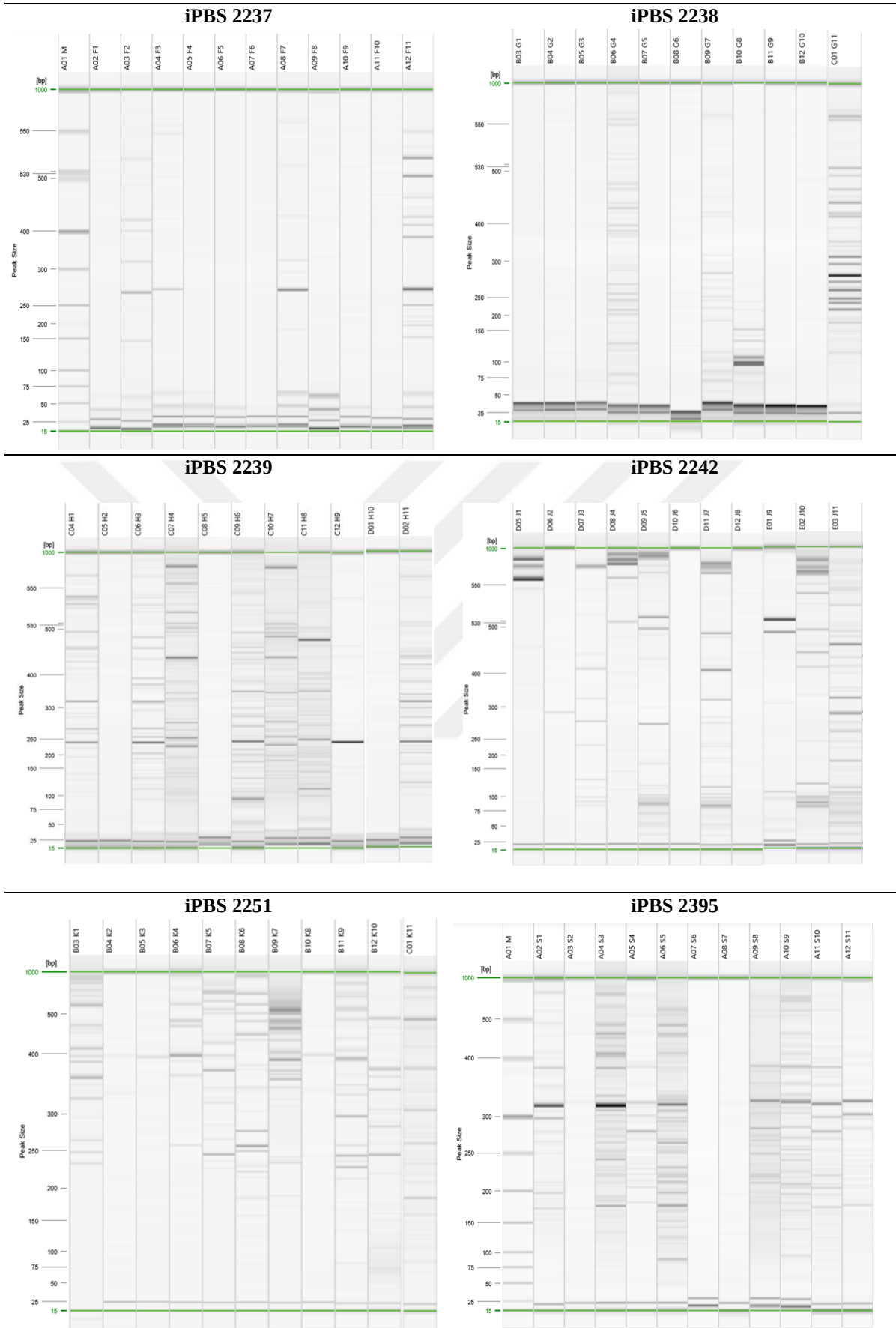
iPBS Analizlerine ait Bulgular

Çalışmada kullanılan 19 adet iPBS primeri için gradient PCR belirlenen primer bağlanma sıcaklık değerleri (Ta, °C) Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. iPBS Belirteçlerin Gradient PCR İle Belirlenen Primer Bağlanma Sıcaklıkları

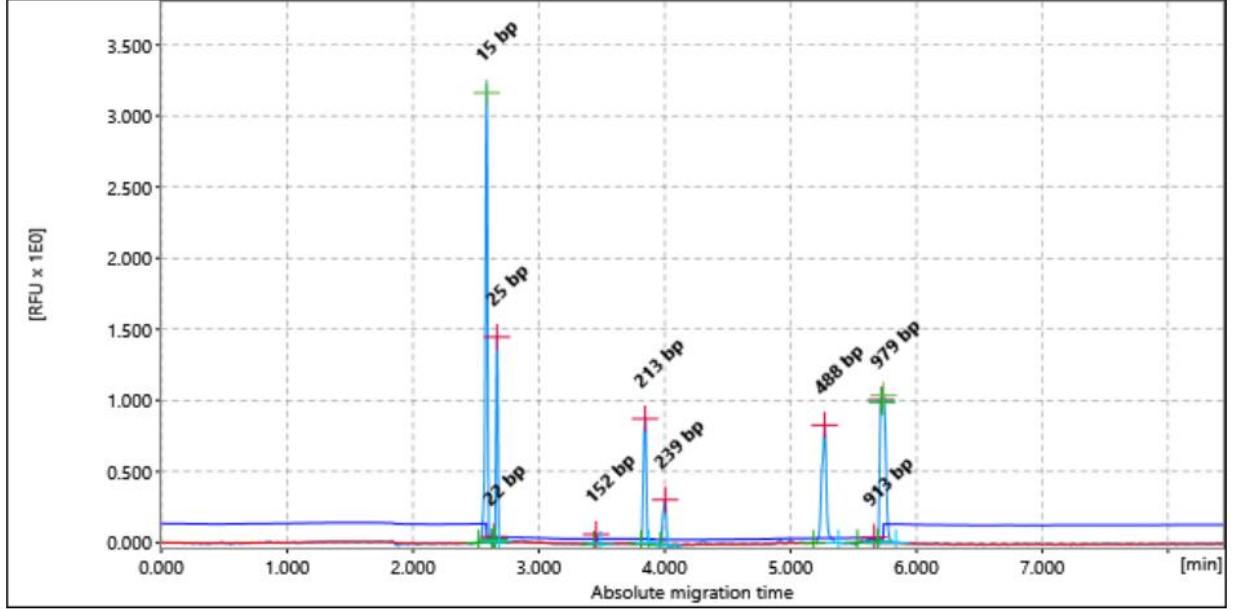
iPBS Primer	Primer bağlanma sıcaklıkları (°C)	iPBS Primer	Primer bağlanma sıcaklıkları (°C)
2222	50,0	2251	50,0
2224	50,0	2252	50,0
2229	51,5	2253	50,0
2230	50,7	2256	60,0
2232	50,0	2257	50,0
2237	58,3	2295	51,5
2238	51,5	2298	51,5
2239	50,7	2395	51,5
2242	50,0	2400	60,0
2249	50,0		

11 adet kestane çeşidi için kullanılan iPBS primerleri ile yapılan PCR işlemlerinden elde edilen kapiller elektroforez görüntülerinden bazıları (iPBS 2237, iPBS 2238, iPBS 2239, iPBS 2242, iPBS 2251 ve iPBS 2395) Şekil 13’de sunulmuştur.

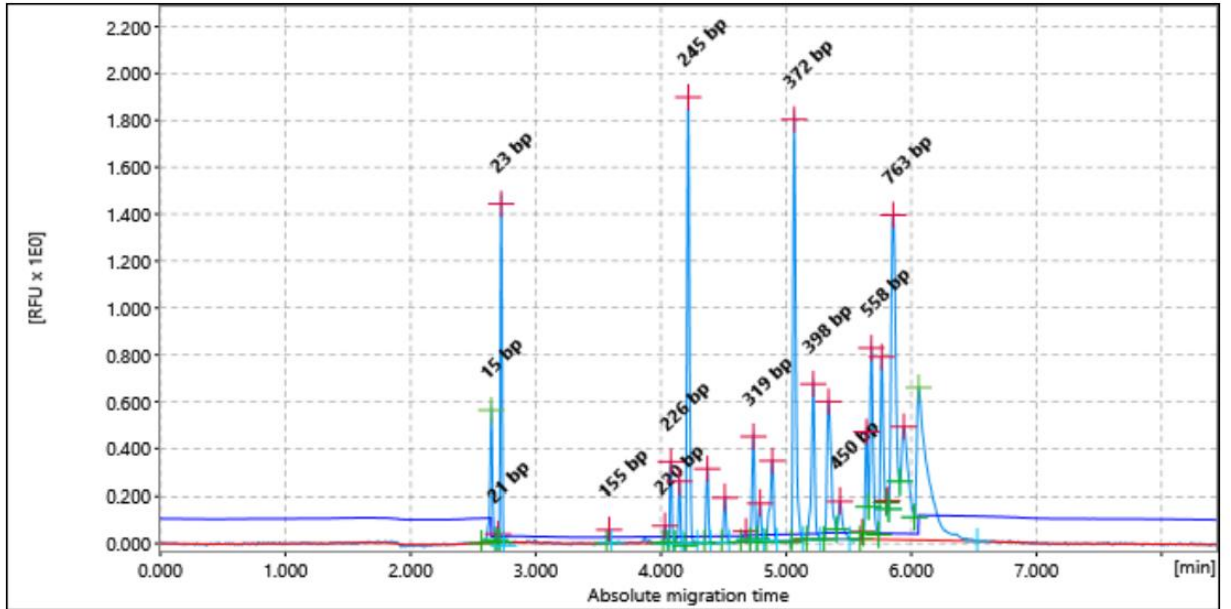


Şekil 13. 6 adet iPBS primerine ait kapiller elektroforez jel görüntüsü (M: DNA size).

Çalışmada kullanılan 11 kestane çeşidi için, 19 adet iPBS primerine ait Qiagen Kapiller analiz sisteminde elde edilen pikler skorlanarak istatistik analizler yapılmıştır. Örneğin, Marigolule kestane çeşidine ait iPBS 2222 primerine ait elektroferogram görüntüsü ve belirlenen pik değerleri Şekil 14’de ve Osmanoğlu kestane çeşidine ait iPBS 2251 primerine ait elektroferogram görüntüsü ve belirlenen pik değerleri Şekil 15’de verilmiştir.



Şekil 14. Marigolule kestane çeşidine ait iPBS 2222 primerine ait elektroferogram görüntüsü.



Şekil 15. Osmanoğlu kestane çeşidine ait iPBS 2251 primerine ait elektroferogram görüntüsü.

Retrotranspozon iPBS primerleri ile yapılan PCR işlemlerinden elde edilen bant profilleri değerlendirilmiştir ve bu primerlere ait allel boyutu aralıkları ile birlikte toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm oranı, ortalama heterozigotluk, polimorfizm bilgi içeriği, markır indeksi ve ayırt etme gücü değerleri bilgisi Tablo 18’de özetlenmiştir. *Castanea sativa* Mill. kestane türünün 11 çeşidi için uygulanan 19 adet iPBS primerinin amplifikasyonu sonrasında elde edilen ve boyutları kullanılan primere göre değişiklik gösteren toplam 2887 adet bant üretilmiştir (Ek-4). Her bir iPBS primeri için belirlenen polimorfiklik oranı %100 olmuştur. Primer başına ortalama 151,95 bant elde edilmiştir. En yüksek sayıda polimorfik bant veren primerler iPBS 2249 (320 bant), 2239 (256 bant) ve 2395 (251 bant) olarak belirlenmiştir. En düşük sayıda polimorfik bant veren primer ise 65 bant ile iPBS 2400 olarak belirlenmiştir.

Ortalama Gözlenen Heterozigotluk (H_{avp}) değeri, en fazla iPBS 2256 primerinde (0,275) belirlenirken, en az iPBS 2295 primerinde (0,184) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm iPBS primerlerinin ortalama H_{avp} değeri ise 0,204 olarak kaydedilmiştir. **PIC değeri**, en yüksek iPBS 2295 primerinde 0,186 olarak tespit edilirken en düşük iPBS 2256 primerinde 0,166 olarak tespit edilmiştir. Ortalama PIC değeri ise 0,183 olarak belirlenmiştir. **Markır İndeksi (MI)**, 0,190 (iPBS 2242)-0,274 (iPBS 2256) arasında belirlenmiş olup ortalama MI değeri ise 0,203 olarak tespit edilmiştir. **Ayırt Etme Gücü (D) ise**, en yüksek 0,989 (iPBS 2295) ve en düşük 0,201 (iPBS 2222) olarak belirlenmiştir (ortalama 0,213).

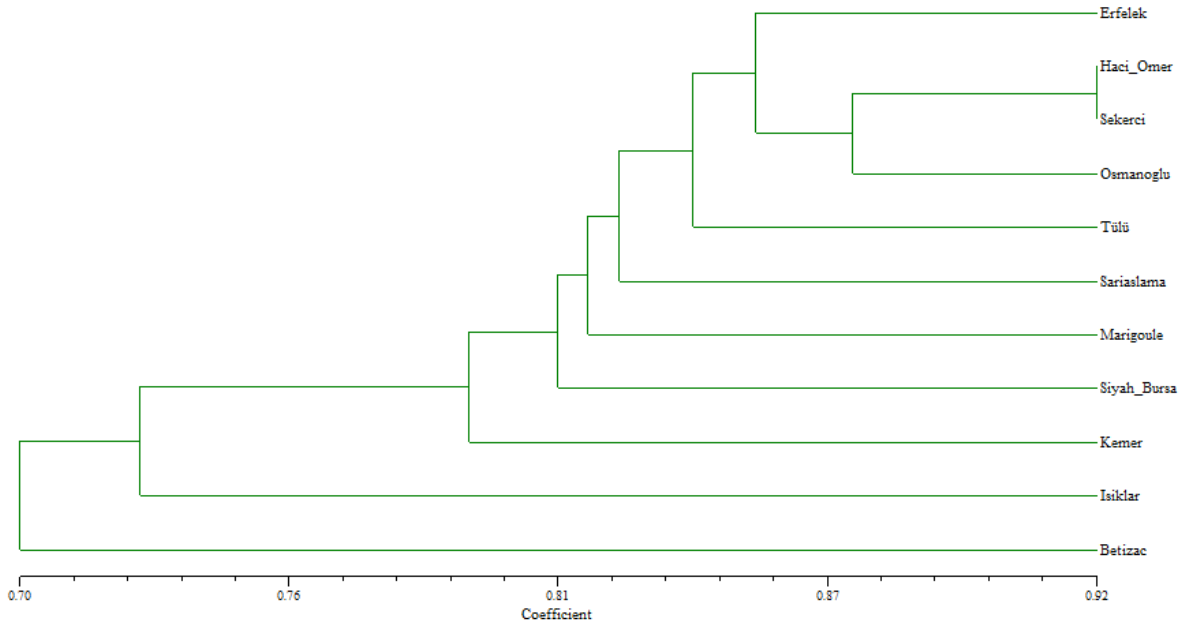
Tablo 18. iPBS Primerlerine ait Bant Sayısı, Polimorfiklik, Heterozigotluk, Polimorfizm Bilgi İçeriği, Markır İndeksi ve Ayırt Etme Gücü Değerleri

iPBS primer	AB (bp)	TBS	PBS	PO (%)	H _{avp}	PIC	MI	D
2222	21-982	131	131	100	0,197	0,184	0,197	0,201
2224	17-979	148	148	100	0,194	0,185	0,193	0,988
2229	22-984	69	69	100	0,236	0,176	0,235	0,981
2230	18-983	81	81	100	0,209	0,182	0,208	0,986
2232	20-979	163	163	100	0,199	0,184	0,198	0,987
2237	17-975	89	89	100	0,243	0,175	0,243	0,244
2238	18-885	139	139	100	0,203	0,183	0,202	0,209
2239	19-950	256	256	100	0,199	0,183	0,199	0,987
2242	19-940	154	154	100	0,190	0,185	0,190	0,988
2249	20-980	320	320	100	0,231	0,177	0,231	0,982
2251	21-957	221	221	100	0,194	0,185	0,194	0,207
2252	24-936	138	138	100	0,194	0,185	0,193	0,988
2253	17-976	141	141	100	0,191	0,185	0,191	0,988
2256	21-979	78	78	100	0,275	0,166	0,274	0,973
2257	19-951	217	217	100	0,199	0,183	0,199	0,987
2295	20-964	145	145	100	0,184	0,186	0,184	0,989
2298	17-973	111	111	100	0,195	0,184	0,195	0,988
2395	19-973	251	251	100	0,207	0,182	0,206	0,986
2400	18-860	65	65	100	0,209	0,183	0,209	0,210
Ortalama		151,95	151,95	100	0,204	0,183	0,203	0,213
Toplam		2887	2887					

AB: Allel boyutu, TBS: Toplam bant sayısı, PBS: Polimorfik bant sayısı, PO: Polimorfizm oranı, H_{avp}: Ortalama Heterozigotluk, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği, MI: Markır İndeksi, D: Ayırt etme gücü.

İPBS verilerine dayalı kümeleme analizi

Çalışmamızda İPBS belirteçlerle elde edilen UPGMA dendrogramı Şekil 16’da sunulmuştur.



Şekil 16. İPBS belirteçleri ile oluşturulan UPGMA dendrogram.

İPBS verilerine dayalı benzerlik analizi

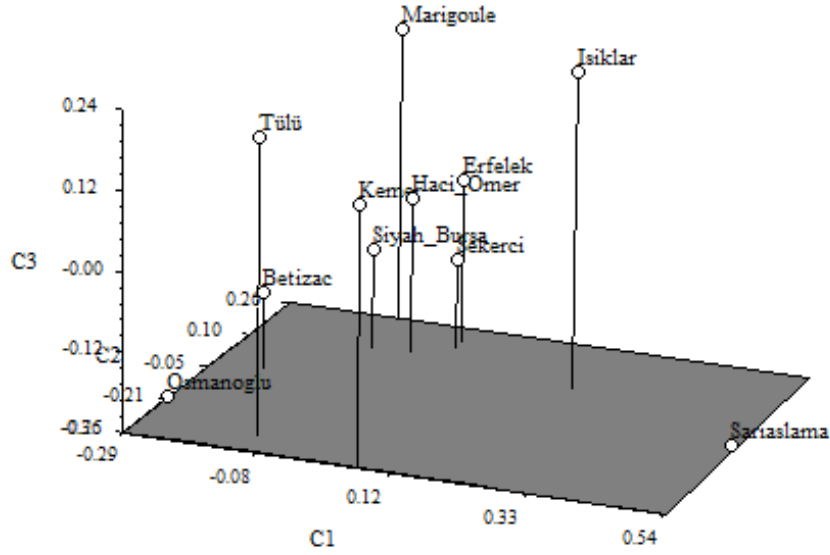
Çalışmada kullanılan İPBS belirteçlerine ait benzerlik matrisi Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19. İPBS belirteçler ile elde edilen Benzerlik Matrisi

Çeşit	Erfelek	Hacı Ömer	Siyah Bursa	Marigoule	Osmanoğlu	Şekerci	Betizac	Tülü	Sariaşlama	Kemer	Işıklar
Erfelek	1,000										
Hacı Ömer	0,888	1,000									
Siyah Bursa	0,803	0,866	1,000								
Marigoule	0,799	0,871	0,798	1,000							
Osmanoğlu	0,823	0,887	0,805	0,810	1,000						
Şekerci	0,851	0,924	0,835	0,841	0,860	1,000					
Betizac	0,710	0,773	0,694	0,696	0,710	0,740	1,000				
Tülü	0,815	0,880	0,800	0,803	0,817	0,852	0,710	1,000			
Sariaşlama	0,799	0,871	0,785	0,793	0,809	0,840	0,695	0,809	1,000		
Kemer	0,791	0,852	0,766	0,773	0,795	0,816	0,678	0,784	0,784	1,000	
Işıklar	0,736	0,789	0,702	0,702	0,730	0,760	0,625	0,723	0,709	0,696	1,000

iPBS verilerine dayalı temel bileşen analizi

Retrotranspozon iPBS belirteçlerin analizi ile elde edilen ve 11 kestane çeşidi arasındaki genetik benzerlik/farklılığı gösteren PCoA (Principle coordinate analysis) sonucu Şekil 17’de verilmiştir.



Şekil 17. 11 adet kestane çeşidinde iPBS belirteçlere ait PCoA analizi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kuraklık İlişkili SSR ve EST-SSR Belirteçlerine Göre Kestane Çeşitlerinde Kuraklığa Toleranslılık/Duyarlılık Değerlendirmesi;

Bitki ıslahının asıl amacı yüksek ekonomik değere ve yeni özelliklere sahip çeşitleri ortaya çıkarmaktır. Günümüzde küresel ısınmadan dolayı yıllık ortalama sıcaklık değerlerinin artış göstermesi ile ortaya çıkan su stresi (kuraklık), gerek açıkta yetiştiricilikte gerekse örtüaltı sistemlerde yetiştiricilikte ve topraksız tarım şeklinde yetiştiricilikte çoğu bitki türünde olduğu gibi kestane meyve türünde de üretim miktarında, verim ve kalite özelliklerinde düşüşlere ve hatta bitki ölümlerine neden olabilmektedir. Su stresinde, kuraklık şartlarında bitkilerde gerek morfolojik değişimler gerekse fizyolojik metabolizma yollarında farklı biyokimyasal düzenlenmelerde değişimler ve moleküler düzeyde mutasyonel ya da epigenetik modifikasyonların olması muhtemeldir.

Kuraklık stresi sinyallerine yanıt oluşumunda fonksiyonel genler (osmotik düzenleme ile ilişkili genler ve kuraklık ilişkili protein genleri) ve düzenleyici genlerin (sinyal iletimi ilişkili genler, transkripsiyon faktör genleri) etkili olduğu bilinmektedir.

Kuraklık stresinde etkili olan *fonksiyonel genlerden olan osmotik düzenleme ile ilişkili genler* arasında prolin ve glisin betain genleri ile birlikte çok kompleks olan çözülebilir şekerlerin (örneğin, sukroz) metabolik yollarını etkileyen enzimlerden (früktoz-1,6-bifosfataz, sukroz fosfat sentaz gibi) sorumlu olan genlerden bahsetmek mümkündür. *Fonksiyonel genlerden olan kuraklık ilişkili protein genlerinin* en bilineni LEA proteini olup bu protein geç embriyogenez aşamasında yüksek düzeyde ifade olmaktadır ve kuraklık stresine cevapta ve dayanıklılıkta önemli rol oynamaktadır. Esas olarak suyu yakalayarak proteinlerin ve zarların yapısını ve işlevini stabilize eder, moleküler bir şaperon ve hidrofilik çözünen olarak hücreleri su stresinden korur. Diğer taraftan, kuraklık stresinde etkili olan *düzenleyici genler* ise genellikle üç grupta açıklanmaktadır; a) su stresinde güçlü bir şekilde uyarılarak çeşitli fonksiyonel genlerin ifadelerini düzenleyici genler (bZIP, MYB, MYC, ERBP/APX, CBFI, DREB1A), b) stres sinyallerini algılayarak sinyal iletimi ile ilişkili olan genler (MAPK, MAPKK, MAPKKK gibi protein kinazlar), c) İkincil haberci üretimi ve iletimi ile ilişkili olan genler (Fosfolipid-D, Fosfolipid-C). Sinyal iletimi ile ilişkili düzenleyici genler arasında NCED (kuraklık toleransını düzenleyen gen olup endojen ABA seviyesini artırarak, yaprak solunum oranını artırarak

yaprak solunum oranını artırarak kuraklık direncini artırıcı etkiye sahiptir), CDPKs (Ca bağımlı kalmodulin, kalmodulin benzeri proteinler, kalmodulin-b-benzeri proteinler) ve MAP [kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık streslerinde uyarılan MAP protein kinaz genleri (AtMPK3, AtMPK4, AtMPK6, AtMEK1, AtMEKK1)] genleri bulunmaktadır. *Düzenleyici genler arasında ifade edilen transkripsiyon faktör (TF) genleri* ise, stres koşullarında stres zararını azaltıcı olarak etki yaparlar (Örneğin, HD-ZİP/b-ZİP, AP2/ERF, NAC, MYB, WRKY genleri) (Yang *et al.* 2021; Mizoguchi,1996). Bu çalışmada, kestanelerde kuraklık ilişkili olarak toleranslılık tespitinde kullanılmış olan genomik SSR lokusları (Castallana *et al.* 2021) ve genik EST-SSR lokusları (Alcaide *et al.* 2019; Castallana *et al.* 2021) tercih edilmiştir (Tablo 4). Tablo 20’de 8 adet genik EST-SSR belirtecinin bazı özellikleri ve bunların varsayılan işlevlerine yer verilmiştir.

Tablo 20. EST-SSR Belirteçlerin İşlevleri (Alcaide *et al.* 2019; Castellana *et al.* 2021)

Lokus ismi	Beklenen bant boyutu (bp)	Varsayılan işlev (Protein) / Gen	Bildirilen işlev	Referanslar
FIR059	157-169	DEAD-box ATP bağımlı RNA helikaz 7 / RH7	Kuraklık veya tuz stresi dahil olmak üzere stres adaptasyon süreçlerinde etkili olma	<i>Vashisht ve Tuteja (2006)</i> <i>Macovei et al. (2012)</i>
FIR080	207	Ricin B benzeri lektin EULS3 / EULS3	Kuraklık stresine tepki ve ABA kaynaklı stoma kapanmasında rol oynama	<i>Van Hove et al. (2015)</i>
FIR094	199-215	inaktif reseptör kinaz At2g26730 / At2g26730	Kuraklık koşullarında fonksiyonel kinaz aktivitesi	<i>Silveira et al. (2015)</i>
GOT004	290	aquaporin TIP1-1 / TIP1-1	Su stresi, tuz stresi ve eksojen ABA tarafından indüklenir. Köklerde ve yapraklarda hücre zarlarından su ve küçük nötr çözünenlerin taşınmasında rol alır.	<i>Liu et al. (1994)</i> <i>Sakurai et al. (2005)</i>
GOT021	113	Histidin kinaz SHK278 N/A	Su eksikliği gibi çevresel stres koşullarında, stoma kapanmasında bir sinyal zincirinin önemli bir parçası olarak etkili olur.	<i>Desikan et al. (2008)</i> <i>Lind and Gailing (2013)</i>
GOT045	141	E3 ubiquitin-protein ligaz ARI8 / ARI8	Kuraklık stresi gibi abiyotik streslerin neden olduğu sinyal yollarında birleştirici roller oynar.	<i>Cho et al. (2008)</i> <i>Seo et al. (2012)</i>
VIT033	111	metallotionin 3b / MT3b	Yapraklarda ve köklerde kuraklığa duyarlılık için tanımlanmıştır (güçlü kuraklık belirteci olarak onaylanmıştır)	<i>Cohen et al. (2010)</i>
VIT057	168	dehidrasyon yanıtı element bağlayıcı protein N/A	Tuz, dehidrasyon ve ABA stresinin nedeni TF (transkripsiyon faktör)	<i>Fang et al. (2015)</i>

Eksprese edilmiş dizi etiketlerinden (EST) türetilen basit dizi tekrarı (SSR) belirteçleri, genetik varyasyonu değerlendirmek ve ağaç formu genotiplerin ıslahı ve daha etkili korunmasına yardımcı olması amacıyla giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bilinen veya önerilen fonksiyonlara sahip genomun eksprese edilen bölgelerinden geliştirilirler. Genomik SSR belirteçlerden daha az polimorfik oldukları bildirilmiş olmasına rağmen, bu belirteçler adaptif varyasyon ve türler arası transfer edilebilirlik ile ilgili olarak fonksiyonel çeşitlilik açısından üstün olarak ifade edilmektedir (Kalia *et al.* 2011; Varshney *et al.* 2005; Alcaide *et al.* 2019).

Alcaide *et al.* (2019) çalışmalarında, Durand *et al.* (2010)'nin *Quercus robur* (meşe) türü için geliştirmiş oldukları EST-SSR belirteçlerini esas almışlardır ve kestanelerde kuraklık ilişkili olanların tespiti çalışmalarını bu belirteçleri kullanarak başarılı bir şekilde gerçekleştirerek farklı türler arasında transfer edilebileceğini göstermişlerdir. Castallana *et al.* (2021) tarafından da bu EST-SSR belirteçler yanında yine kuraklık ilişkili SSR belirteçler (Marinoni *et al.* 2002; Buck *et al.* 2003) kestane genotipleri için başarıyla kullanılabilmiştir.

Alcaide *et al.* (2019) kestanelerde kuraklığa toleranslılık ve duyarlılığı belirlemek amaçlı gerçekleştirdikleri çalışmalarında, kullandıkları **EST-SSR FIR059 belirteci ile duyarlı bireyler için üç özel alel (143, 160, 179 bp) ve kuraklığa toleranslı bireyler için iki özel alel (152, 176 bp) tespit etmişlerdir** (Tablo 21). **Araştırmacılar bu belirtecin stres olmayan koşullardaki *Castanea sativa* ağaçlarında kuraklık toleransını tahmin etmek için aday birer belirteç olarak kullanılabileceklerini bildirmişlerdir.** Fonksiyonel belirteçlerin ve fenotipik özelliklerin birlikte kullanımı sayesinde, kestanelerde adaptif düzeyde genetik varyasyonun belirlenmesi ve erken seleksiyon için güçlü bir yaklaşım olduğu ifade edilmiştir. Diğer taraftan, araştırmacılar kullandıkları **EST-SSR GOT021 belirteci ile kuraklığa toleranslı bireyler için (94 bp) ve kuraklığa toleranslı bireyler için (97 bp) birer özel alel belirlenmişlerdir.** Ayrıca, **EST-SSR FIR094 belirteci ile kuraklığa toleranslı bireyler için bir özel alel (193 bp) ve EST-SSR FIR080 belirteci yardımıyla ise kuraklığa duyarlı bireyler için olmak üzere bir özel alel (152 bp) belirlemişlerdir** (Tablo 21).

Tablo 21. Alcaide *et al.* (2019)'da Kestane Ağaçlarında Kuraklık Toleranslılıkla İlişkili Olarak Tespit Edilen Spesifik Alleller

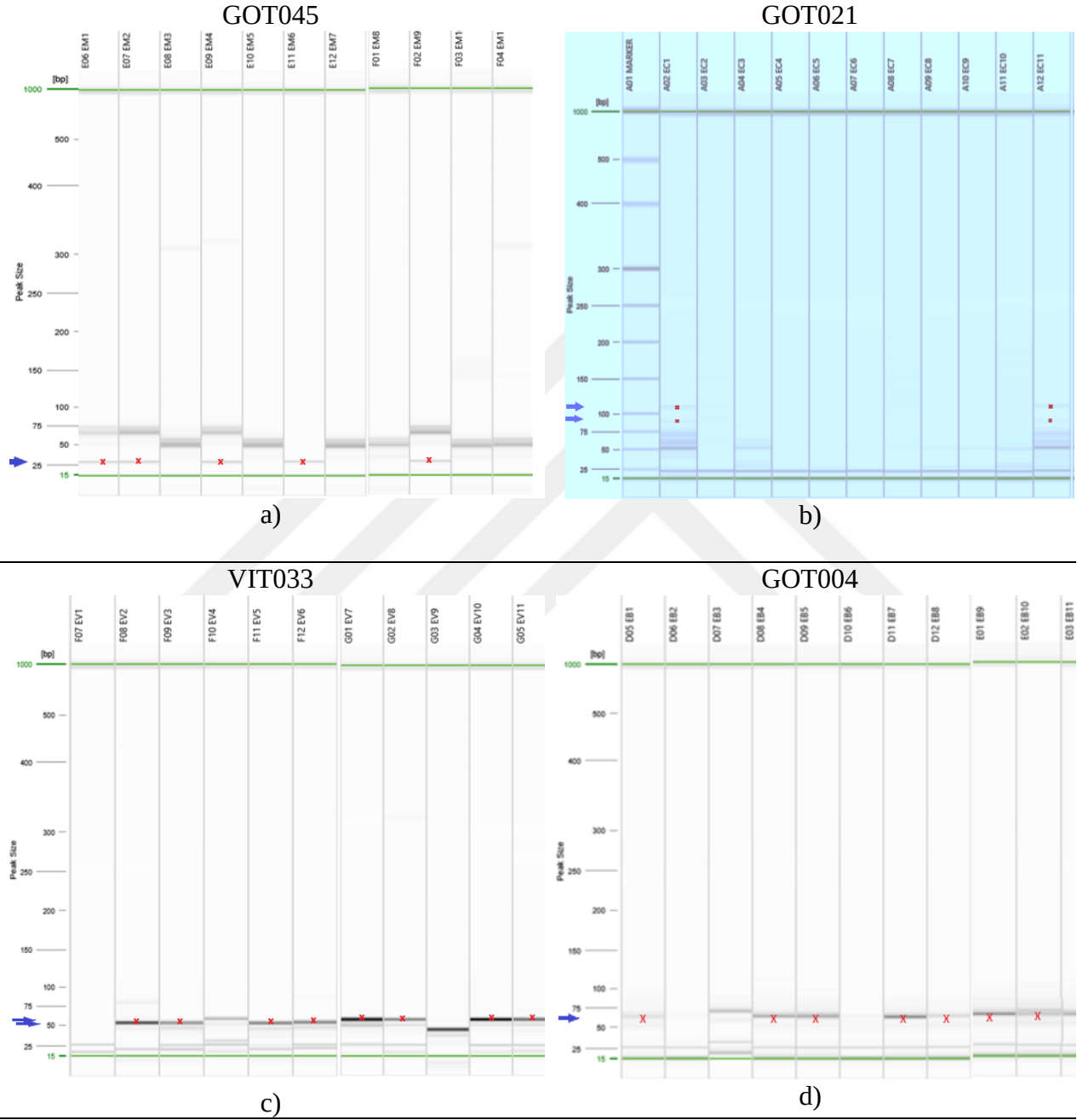
Durum	EST-SSR belirteçler	Alleller (bp)
Kuraklığa dayanıklılıkla ilişkili	FIR059	152, 176
	FIR094	193
	GOT021	94
Kuraklığa duyarlılıkla ilişkili	FIR059	143, 160, 179
	FIR080	152
	GOT021	97

Çalışmada kullanılan kestane çeşitleri iki çeşit hariç Türkiye kaynaklıdır. Literatür kaynaklı esas alınan iki çalışmada; i) Avrupa kıtasından İspanya'daki doğal ortamlarından dört farklı popülasyondan 100 kestane bitki materyalinin kullanıldığı çalışmada (Alcaide *et al.* 2019) ii) İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye'den on farklı popülasyondan doğal ortamlarından toplam 268 kestane genotipinin kullanıldığı çalışmada (Castellana *et al.* 2021) **kullanılan aynı belirteçler bu çalışmada tercih edilmiştir**. Ancak, örneğin, Alcaide *et al.* (2019) tarasından ABI-PRISM-3130XL genetik analizler ile elde edilen kapiller elektroforez sonuçlarında belirtilen bant büyüklüklerinden **farklı boyutlarda bantlar elde edilmiştir**. Yine de, bu çalışmada elde edilen kapiller elektroforez (Qiagen-QIAxcel Advanced) görüntüleri incelendiğinde 11 kestane çeşidi arasında ayırt edilebilir ölçütte farklılıklar tespit edilmiştir (Ek-5). Örneğin;

- a) Erfelek, Hacıömer, Marigoule, Sariaşlama çeşitleri (**26,30,52,66 bp**) ile birlikte Şekerci (**26,30 bp**) çeşidinin, **EST-SSR GOT045** belirteci ile elde edilen elektroforez görüntüsüne göre belirli ortak allellere sahip oldukları ve dolayısıyla yakın ilişkili oldukları tespit edilmiştir (Şekil 18a; Ek 5). Serdar vd. (2018)'de "*Marigoule kestane çeşidi kuraklığa karşı daha toleranslı olduğu için Marmara Bölgesinde en fazla tercih edilen çeşittir*" bilgisine dayanarak Marigoule çeşidi gibi Hacıömer, Sariaşlama ve Şekerci çeşitleri muhtemelen kuraklığa toleranslı olabilirler.
- b) Castellana *et al.* (2021)'de **EST-SSR GOT021** belirteci için beklenen bant büyüklüğü **113 bp** olarak ifade edilmiş olup **EST-SSR GOT021** belirteci ile Işıklar çeşidinde **112 bp**'lik allel elde edilmiştir. Ayrıca, **EST-SSR GOT021** belirteci için Alcaide *et al.* (2019)'da **94 bp**'lik allel kuraklığa toleranslılıkla ilişkili olarak belirtilmiş olup bu çalışmada **EST-SSR GOT021** belirteci ile elde edilen elektroforez görüntüsünde Işıklar çeşidinde gözlenen **90 bp**'lik allel kuraklığa duyarlılıkla ilişkili olabilir (Şekil 18b; Ek 5). Yine, **EST-SSR GOT021** belirteci ile elde edilen elektroforez görüntüsünde Erfelek çeşidinde gözlenen **89 bp** ve **110 bp**'lik alleller kuraklığa duyarlılıkla ilişkili olabilir.
- c) Yapraklarda ve köklerde kuraklığa duyarlılık için tanımlanmış olan ve güçlü kuraklık belirteci olarak onaylandığı olduğu ifade edilen **EST-SSR VIT033** belirteci (Cohen *et al.* 2010; Castellana vd. 2021) ile bu çalışmada elde edilen görüntü incelendiğinde; Siyah Bursa ve Şekerci çeşitleri (**52 bp**) ve diğer taraftan Betizac, Tülü, Kemer ve Işıklar isimli kestane çeşitleri (**57 bp**) ve ayrıca Hacıömer ve Marigoule çeşitleri yakın ilişkili (**51,58 bp**) olarak gözlenmiştir (Şekil 18c; Ek 5).
- d) Marigoule, Osmanoğlu kestane çeşitlerinde gözlenen **52, 64 ve 82 bp**'lik alleller ile birlikte Tülü çeşidinde (**52, 64, 83 bp**), Betizac çeşidinde (**51, 63, 82 bp**), Sariaşlama çeşidinde (**51,**

63, 82 bp) ve ayrıca Kemer ve Işıklar çeşitlerinde gözlenen (**51, 63 bp**) allellere göre **EST-SSR GOT004** belirteci ile kuraklık ilişkili yorum yapılabilir (Şekil 18d; Ek-5).

- e) Benzer değerlendirmeler diğer belirteçler içinde tekrar ele alınarak daha sonra planlanacak çalışmalarda tekrar değerlendirilerek doğru sonuçlara ulaşılabilir.



Şekil 18. Kestane çeşitlerinde; a) GOT045, b)GOT021, c)VIT033 ve d)GOT004 belirteçlerinde belirlenen bazı allellerin gösterimi (M:DNA size, 1:Erfelek, 2:Hacıömer, 3:Siyah Bursa, 4:Marigoule, 5:Osmanoğlu, 6:Şekerci, 7:Betizac, 8:Tülü, 9:Sarıaşlama, 10:Kemer, 11:Işıklar)

Üstelik, Mattioni *et al.* (2013)'nın çalışmalarının sonucunda yaptıkları “*doğu (Yunan ve Türk) ve batı (İtalyan ve İspanyol) kestane popülasyonları arasında genetik bir farklılık ortaya çıkmıştır*” yorumu dikkate alındığında, İspanya’da kuraklık ilişkili toleranslılık çalışmalarından elde edilen spesifik allellerin bu tez çalışmasında elde edilememesinin nedeni olarak kestanelerde bölgesel/coğrafi spesifiklikte gözlenen genetik çeşitlilik düzeylerindeki farklılıklar gösterilebilir.

SSR Analizlerinin Genetik Varyasyon Değerlendirmesi;

Moleküler belirteçler, DNA polimorfizmini spesifik lokus seviyesinde ve ayrıca genom seviyesinde tespit etme gücündedir. Literatür bilgilerine göre mikrosatellitler, heterozigotluğun belirlenmesinde ve yakın ilişkili türler arasında genetik mesafelerin hesaplanmasında yararlı olmaktadır. Üstelik, popülasyondaki PIC’in yanı sıra etkili allel sayısı gibi genetik indeksleri belirlemek için de uygun oldukları ifade edilmektedir. Allel sayısı ve allel frekansı bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin ölçütüdür. Allel sayısı ne kadar artar ise, genetik çeşitlilik o kadar büyür. Benzer şekilde, allel frekansları birbirine ne kadar yakın ise, çeşitlilik o kadar büyüktür (Doğan ve Doğan, 2019).

Çalışmada kullanılan 5 adet genomik SSR belirtecinin kullanılması sonucunda 11 adet kestane çeşidi arasındaki genetik varyasyon da başarılı bir düzeyde tespit edilmiş olup bu kestane çeşitleri arasındaki benzerlikler/farklılıklar belirlenebilmiştir. SSR belirteçlerin amplifikasyonu sonrasında elde edilen ve boyutları kullanılan primere göre değişiklik gösteren toplam 507 bandın tamamında polimorfizm belirlenmiştir (%100). 11 kestane çeşidi için en yüksek sayıda polimorfik bant veren SSR primeri CsCAT3 (122 bant) olurken en düşük sayıda polimorfik bant veren SSR primeri CsCAT1 (76 bant) olmuştur (ortalama 101,4 bant) (Tablo13). Çalışmada, SSR belirteçlerinden elde edilen ve 11 kestane çeşidi için tespit edilen ortalama allel sayıları 6,91 (CsCAT1), 11,09 (CsCAT3), 8,82 (CsCAT6), 9,55 (CsCAT16) ve 9,73 (EMCs38) olarak tespit edilmiştir (Ek-2). Janfaza *et al.* (2016) tarafından allel sayısı (Na) ortalama 2,85 olarak tespit edilmiştir. Kestanelerde SSR belirteçlerini kullanarak yaptığı bir çalışmada Küçük (2010), CsCAT1, CsCAT6, CsCAT16 belirteçlerini kullanarak allel sayılarını (Na) sırasıyla 5, 6 ve 2 olarak ve elde edilen allel büyüklük aralıklarını ise sırasıyla 190-236, 182-224 ve 148-148 bp olarak belirlemiştir. Marinoni *et al.* (2003)’de kestanelerde CsCAT1, CsCAT3, CsCAT6, CsCAT16 isimli SSR belirteçlerini kullanarak düşük sayıda allel sayısı (Na) (sırasıyla 6, 4, 3 ve 4) tespit etmişlerdir. Cruz-Lopez *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada, allel sayısı CsCAT3 belirteci ile 27 ve CsCAT16 belirteci ile 11 olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Martin *et al* (2010)’da kullanılan CsCAT1, CsCAT3, CsCAT6, CsCAT16 ve EMCs38 isimli

SSR belirteçleri yardımıyla genetik çeşitlilik başarılı olarak gerçekleştirilmiş olup etkili allel sayısı (N_e) değeri bu belirteçler arasında en yüksek 10,53 (CsCAT3), 9,26 değeri ile EMCs38 ve 7,28 değeri ile CsCAT6 belirteçlerinden elde edilmiştir. Aynı belirteçler için, Mattioni *et al.* (2013)'de N_e değeri, sırasıyla 3,35, 4,44 ve 4,04 olarak elde edilmiştir. Cruz-Lopez *et al.* (2016)'da, CsCAT3 ve CsCAT16 SSR belirteçlerinin N_e değerleri sırasıyla 3,90 ve 3,09 olarak belirlenmiştir. Janfaza *et al.* (2016)'da, 4 farklı popülasyondan temin edilen kestanelerde SSR (çalışmamızda kullanılmayan) belirteçler yardımıyla elde edilen N_e değeri ortalama 2,163 olarak belirlenmiştir.

Ortalama Heterozigotluk (H_{avp}), en fazla SSR CsCAT1 primerinde (0,464) belirlenirken, en az CsCAT6 primerinde (0,351) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm SSR primerlerinin H_{avp} değeri 0,395 olarak kaydedilmiştir (Tablo 13). Janfaza *et al.* (2016)'da gözlenen heterozigotluk (H_o) değeri ortalama 0,563 olarak belirlenirken H_e değeri ise 0,512 olarak belirlenmiştir. Martin *et al.* (201) tarafından heterozigotluk (H_o) en yüksek 0,906 değeri ile CsCAT3 belirteci ile elde edilmiştir. Mattioni *et al.* (2013)'e göre, Türkiye'nin doğu (5 genotip), batı (5 genotip) ve orta (5 genotip) kesimlerinden alınan kestanelerde bu çalışmada kullanılmayan farklı SSR belirteçler yardımıyla elde edilen (H_o) heterozigotluk değerleri sırasıyla ortalama 0,52, 0,64 ve 0,57 olarak belirlenirken H_e değeri ise sırasıyla 0,64, 0,74 ve 0,70 olarak belirlenmiştir. Bir başka çalışmada, gözlenen heterozigotluk (H_o) değerleri sırasıyla 0,78 ve 0,73 ve beklenen heterozigotluk (H_e) değerleri ise sırasıyla 0,76 ve 0,69 olarak belirlenmiştir (Cruz-Lopez *et al.* 2016).

PIC hesaplamaları sonucu elde edilen verilere göre, en yüksek PIC değerleri SSR CsCAT6 (0,366) ve CsCAT16 (0,366) primerlerinde tespit edilirken en düşük PIC 0,339 değeri ile SSR CsCAT1 primerinde tespit edilmiştir. Ortalama PIC değeri ise 0,357 olarak belirlenmiştir (Tablo 13). Çin kestanelerinde (*Castanea mollissima* Blume) yapılan bir çalışmada (Nie *et al.* 2021), 146 kestane genotipinden üretilen 18 floresan etiketli SSR markırı kullanarak genetik ilişki ve parmak izi analizi yapmışlardır. Locus başına polimorfik bilgi içeriği (PIC) 0.622 olarak belirlenmiştir.

Markır İnderksi (MI), en yüksek 0,464 değeri ile SSR CsCAT1 primerinde tespit edilmiştir. En düşük ise 0,351 değeri ile SSR CsCAT6 primerinde tespit edilmiştir. Ortalama MI değeri ise 0,395 olarak belirlenmiştir (Tablo 13).

Ayrırt Etme Gücü (D), en yüksek 0,435 değeri ile SSR CsCAT3 primerinde tespit edilirken, en düşük SSR CsCAT16 primerinde (0,370) tespit edilmiştir. Tüm primerler için hesaplanan ortalama D değeri 0,393 olarak kaydedilmiştir (Tablo 13).

Çalışmada kullanılan kuraklık ilişkili geliştirilen mikrosatellit esaslı genomik SSR belirteçlerin verilerinin analizi sonucunda elde edilen matris ve dendrogramda ki genetik benzerlik değerleri (Şekil 9 ve Tablo 15) incelendiğinde; yakın ilişkili kestane çeşitlerinden oluşan bir grup ve bu grupta uzak ilişkili birkaç kestane çeşidinin sıralandığı görülmektedir. SSR belirteçlerle elde edilen dendograma göre: Erfelek ve Hacıömer kestane çeşitleri 0,873 benzerlik katsayısı değeri ile birbirine en benzer çeşitler olarak belirlenmiştir. Bu iki çeşitle yakın benzerlik ilişkisi gösteren kestane çeşitleri Siyah Bursa, Şekerci ve Marigoule olarak belirlenirken bu çeşitlerle aralarındaki benzerlik katsayısı 0,810 olan Osmanoğlu ve Betizac isimli kestane çeşitleri yakın ilişkili olarak belirlenerek tüm bu çeşitler bir alt grup olarak ortaya çıkmıştır. Diğer alt grup olarak, aralarındaki 0,790 benzerlik katsayısı ile Tülü ve Kemer kestane çeşitleri yer almıştır. Bu iki alt grup bir grup olarak değerlendirildiğinde dendograma göre Işıklar ve Sariaşlama kestane çeşitleri bu gruptaki çeşitlerle daha uzak ilişkili olarak tespit edilmiştir.

SSR belirteçler ile elde edilen ve genetik varyasyonu göstermek amacıyla yapılan **temel koordinat analizi (PCoA)** sonucunda elde edilen grafik Şekil 10'da verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde kestane çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik uzaklıklar dendrogramdan elde edilen verileri destekler nitelikte bulunmuştur.

EST-SSR Analizlerinin Genetik Varyasyon Değerlendirmesi;

Çalışmada tercih edilen 8 adet genik EST-SSR belirtecinin kullanılması sonucunda 11 adet ticari önemi olan ve yetiştiriciler tarafından çok fazla tercih edilen kestane çeşitlerimiz arasındaki genetik varyasyon başarılı bir düzeyde tespit edilmiştir ve kestane çeşitleri arasındaki benzerlikler/farklılıklar belirlenebilmiştir. Sekiz primer kullanımı sonucunda elde edilen toplam 728 bantın (primer başına ortalama 91 bant) tamamında %100 polimorfiklik bulunmuştur. En yüksek sayıda polimorfik bant veren EST-SSR primerler FIR059 (115 bant) ve VIT057 (102 bant) olurken en düşük sayıda polimorfik bant veren EST-SSR primer ise GOT021 (74 bant) olmuştur (Tablo14). Ayrıca, bu çalışmada genik EST-SSR belirteçlerinden elde edilen ve 11 kestane çeşidi için tespit edilen ortalama allel sayıları şunlar olmuştur: 8,27 (FIR080), 7,73 (GOT004), 6,73 (GOT021), 9,27 (VIT057), 10,45 (FIR059), 5,55 (FIR094), 7,45 (GOT045), 6,54 (VIT033) (Ek-3). Alcaide *et al.* (2019)'da, kestanelerde kullandıkları sekiz adet EST-SSR belirteci ile 14 (FIR059), 6 (FIR080), 4 (FIR094), 3 (GOT004), 4 (GOT021), 4 (GOT045), 2 (VIT033) ve 2 (VIT057) allel elde etmişlerdir. Diğer taraftan, FIR059 belirtecinde 2 adet ve GOT021 belirtecinde 1 adet olmak üzere özel/spesifik alleller tespit edilmiştir Alcaide *et al.* (2019). Diğer taraftan, etkili allel sayısı (N_e), Alcaide *et al.*

(2019) tarafından yapılan çalışmada aynı belirteçler arasında en yüksek 6,59 değeri le FIR059 ve 2,33 değeri ile GOT021 belirteçlerinde elde edilmiştir. Aynı çalışmada, gözlenen heterozigotluk (Ho) değeri en yüksek FIR059 (0,699) ve GOT021 (0,691) belirteçlerinde elde edilirken beklenen heterozigotluk (He) değeri en yüksek FIR059 (0,848) ve en düşük GOT004 (0,050) belirteçlerinde elde edilmiştir.

Ortalama Heterozigotluk (H_{avp}), en fazla EST-SSR FIR059 primerinde (0,377) belirlenirken, en az EST-SSR FIR080 primerinde (0,240) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm EST-SSR primerlerinin H_{avp} değeri ise 0,309 olarak kaydedilmiştir (Tablo 14).

PIC hesaplamaları sonucu elde edilen verilere göre, en yüksek PIC değeri EST-SSR FIR080 primerinde 0,281 olarak tespit edilirken en düşük PIC değeri ise EST-SSR FIR059 primerinde 0,240 olarak tespit edilmiştir. Ortalama PIC değeri ise 0,262 olarak belirlenmiştir (Tablo 14).

Markır İndeksi (MI), en yüksek 0,464 değeri ile EST-SSR FIR059 primerinde tespit edilmiştir. En düşük ise 0,240 değeri ile SSR FIR080 primerinde tespit edilmiştir. Ortalama MI değeri ise 0,309 olarak belirlenmiştir (Tablo 14).

Ayırt Etme Gücü (D), en yüksek 0,980 değeri ile EST-SSR FIR059 primerinde tespit edilmiştir. Bu değer en düşük EST-SSR GOT021 primerinde (0,304) kaydedilmiştir. Tüm primerler için hesaplanan ortalama D değeri 0,287 olarak belirlenmiştir (Tablo 14).

Çalışmada kuraklık ilişkili geliştirilen mikrosatellit esaslı genik EST-SSR belirteçlere ait verilerin analizi sonucunda elde edilen ve Şekil 11 ve Tablo 16'da sunulmuş olan matris ve dendrograma göre; yine, Erfelek ve Hacıömer kestane çeşitleri birbirine en benzer çeşitler (0,789 benzerlik katsayısı) olarak belirlenmiş olup bu iki çeşitle yakın benzerlik ilişkisi gösteren kestane çeşidi olarak Marigoule çeşidi ile birlikte bir alt grup oluşturduğu görülmektedir. Bu alt grupla birlikte Betizac, Tülü ve Sariaşlama çeşitlerinin yakın ilişkide olduğu diğer alt grup bir grup oluşturmuştur ve bu grupla daha uzak benzerlik değerlerine sahip olan kestane çeşitleri ise Siyah Bursa, Osmanoğlu, Şekerci, Işıklar ve Kemer olarak ortaya çıkmıştır.

EST-SSR belirteçler ile elde edilen ve genetik varyasyonu göstermek amacıyla yapılan **temel koordinat analizi (PCoA)** sonucunda elde edilen grafik Şekil 12'de verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde kestane çeşitlerinin birbirleri arasındaki genetik uzaklıklar dendrogramdan elde edilen verileri destekler nitelikte bulunmuştur.

iPBS Analizlerinin Genetik Varyasyon Değerlendirmesi;

Coutinho et al (2018) tarafından yapılan bir çalışma sonuçlarına göre; *Castanea*, *Fagus* ve *Quercus* cinslerinden 25 türün moleküler karakterizasyonu için retrotranspozon esaslı belirteçlerden birisi olan iPBS yöntemi kullanılmıştır. Toplam 150 iPBS markırı üretilmiştir.

Her taksonda birkaç monomorfik iPBS markırı da amplifiye olmuştur. Türler arasındaki genetik benzerlik %27 olarak belirlenmiştir. Küresel olarak, iPBS belirteçlerinin, *Fagaceae* familyasında DNA parmak izi, filogenilerin belirlenmesi ve taksonomik ayırım için uygunluk gösterdiği ve germplazm karakterizasyonu ve koruma stratejilerinin ve ormancılık yönetiminin tanımlanması için yararlı ve alternatif bir araç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Bu tez çalışmasında tercih edilen 19 adet iPBS belirtecinin kullanılması sonucunda Ülkemiz için ticari önemi bulunan 11 adet kestane çeşidi arasındaki genetik varyasyon başarılı bir düzeyde tespit edilmiş olup kestane çeşitleri arasındaki akrabalık seviyesi belirlenebilmiştir. Tablo 18’de, iPBS primerlerinin amplifikasyonu sonrasında elde edilen toplam 2887 bant için %100 oranında polimorfizm belirlenmiştir. Primer başına ortalama 151,95 bant elde edilmiştir. En yüksek sayıda polimorfik bant veren primerler iPBS 2249 (320 bant), 2239 (256 bant) ve 2395 (251 bant) olarak belirlenmiştir. En düşük sayıda polimorfik bant veren primer ise 65 bant ile iPBS 2400 olarak belirlenmiştir. Çalışmada 19 adet retrotranspozon iPBS belirtecinden elde edilen ve 11 kestane çeşidi için tespit edilen ortalama allel sayıları Ek 4’de verilmiştir. En yüksek ortalama allel değerleri iPBS 2249 (29,09 allel), iPBS 2239 (23,27 allel) ve iPBS 2395 (22,82 allel), belirteçlerinde gözlenmiştir. 11 kestane çeşit için en düşük ortalama allel sayısı elde edilen belirteçler arasında iPBS 2400 (5,91 allel) ve iPBS 2229 (6,27 allel) yer almıştır.

Ortalama Heterozigotluk (H_{avp}), en fazla iPBS 2256 primerinde (0,275) belirlenirken, en az iPBS 2295 primerinde (0,184) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm iPBS primerlerinin H_{avp} değeri ise 0,204 olarak kaydedilmiştir (Tablo 18).

PIC hesaplamaları sonucu elde edilen verilere göre, en yüksek PIC değeri iPBS 2295 primerinde 0,186 olarak tespit edilirken en düşük PIC değeri ise iPBS 2256 primerinde 0,166 olarak tespit edilmiştir. Ortalama PIC değeri ise 0,183 olarak belirlenmiştir (Tablo 18).

Markır İndeksi (MI), en yüksek 0,274 değeri ile iPBS 2256 primerinde tespit edilmiştir. Bu değer, en düşük iPBS 2242 primerinde (0,190) kaydedilmiştir. Ortalama MI değeri ise 0,203 olarak belirlenmiştir (Tablo 18).

Ayırt Etme Gücü (D), en yüksek 0,989 değeri ile iPBS 2295 primerinde tespit edilirken, en düşük iPBS 2222 primerinde (0,201) tespit edilmiştir. Tüm primeler için hesaplanan ortalama D değeri 0,213 olarak kaydedilmiştir (Tablo 18).

Retrotranspozon iPBS belirteçlerle elde edilen benzerlik matrisi ve dendograma göre (Şekil 16 ve Tablo 19): Hacıömer ve Şekerci isimli kestane çeşitleri 0,924 benzerlik katsayısı değeri ile birbirine en benzer çeşitler olarak belirlenmiş olup bu iki çeşitle yakın benzerlik ilişkisi gösteren Osmanoğlu ve Erfelek kestane çeşitleri ile birlikte bir alt grup oluşturmuştur. Bu alt grupla ilişkili olarak sırasıyla farklılık düzeyi artış gösteren şekilde Tülü, Sariaşlama,

Marigoule, Siyah Bursa, Kemer ve Işıklar isimli kestane çeşitleri görülmektedir. Betizac kestane çeşidi ise Işıklar çeşidi ile arasında 0,625 benzerlik katsayısı ile dendogramda en uzak ilişkili çeşit olarak yer almıştır. Serdar et al. (2018) bir çalışmasında “**Marmara Bölgesinde en yaygın çeşit olarak tüketim ve pazarlama şekline uygunluk nedeniyle 'Işıklar' (Şekerci) çeşidi tercih edilmektedir.**” ifadesini kullanarak bu iki çeşidin aynı olduğu ifadesinde bulunurken, gerçekleştirilen bu çalışmada **Şekerci ve Işıklar olmak üzere iki kestane çeşidinin birbirinden farklı olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.**

Ayrıca, iPBS belirteçler ile elde edilen ve genetik varyasyonu göstermek amacıyla yapılan **temel koordinat analizi (PCoA)** sonucunda elde edilen grafik Şekil 17’de verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde kestane çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik uzaklıklar dendrogramdan elde edilen verileri destekler nitelikte bulunmuştur.

Sonuç:

Çalışmada tercih edilen mikrosatellit belirteçler (genomik SSR ve genik EST-SSR) literatür kaynaklı olup farklı ülkelerden farklı kestane (*Castanea sativa* Mill.) çeşitleri ve genotiplerinde başarılı sonuçlar alınmış olan belirteçlerdir (Materyal ve Metod bölümünde açıklanmıştır). Meşe (*Quercus robur* L.) bitkisinde çalışılarak geliştirilmiş olan ve kullanılabilirliği akraba olan kestane bitkisinde (aynı familyadan farklı cins içinde yer alan) daha önce yapılan bazı çalışmalar ile kanıtlanmış olan bu belirteçler, Ülkemizde kullanımı ilk olmak üzere çalışmamızda da başarılı sonuçlar vermiştir. Bu tez çalışmasında, az sayıda kestane çeşidinde bir ön çalışma niteliğinde kullanılan bu belirteçler yardımıyla elde edilen alleller ile ülkemizde önemli olan ticari çeşitlerin kuraklık toleranslılığı/duyarlılığı konusunda bazı sonuçlar elde edilebileceği sonucu ortaya çıkmıştır. Bu belirteçlerin markır destekli seleksiyon (MAS) çalışmaları şeklinde klasik ıslah programlarına dâhil edilmesi durumunda, **hedeflenen ıslah amaçlarına ilave olarak kuraklık toleranslılığına yönelik erken seleksiyona olanak sağlanabilir.**

Çalışmada ismine doğru olarak ifade edilen sertifikalı ticari değeri yüksek kestane çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitlerden **sadece Marigoule kestane çeşidinin kuraklığa toleranslı olduğuna dair bir bilgiye ulaşıldığı için kuraklık esaslı SSR (genomik) ve EST-SSR (genik) belirteçlerle diğer çeşitlerin kuraklığa toleranslılık durumlarının tespitine yönelik olarak net yorumlar yapılamamıştır.** Üstelik, daha önce çalışılan literatür kaynaklarda toleranslılık ve duyarlılık için tespit edilmiş olan allel boyutlarından farklı alleller elde edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı, çalışmadaki bitki materyali kestane çeşitlerinin moleküler karakterizasyonun doğruluk derecesinin teyidi amacıyla başka çalışmalara da

ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için; i) özellikle ön tespitlerin yapıldığı bu çalışmanın sonuçları, ii) Ülkemizin gen kaynaklarından **doğal ortamlarından kestane genotiplerinin temini**, iii) Ülkemizdeki Traımsal Araştırma Enstitüleri ve çeşitli kurumlar tarafından oluşturulmuş **kestane koleksiyon bahçelerinden ismine doğru çeşitlerin dâhil edileceği geniş kapsamlı değerlendirmelere ihtiyaç vardır.** Ayrıca, iklimsel verilerinde değerlendirmeye dâhil edileceği kesta ne çeşitlerinin kuraklık toleranslılık durumlarının tespitinde kolaylık sağlayacak anahtar nitelikte birkaç belirtecin belirlenmesi durumunda kestane ıslah çalışmalarına yardımcı bilgiler edinilebilir.

Diğer taraftan, Çalışmada kullanılan **mikrosatellit esaslı SSR ve EST-SSR belirteçler, kuraklık ilişkili spesifik nitelikte olsalar da, kestane çeşitleri arasındaki genetik ilişkinin tespitinde de yardımcı olacak sonuçlar vermiştir.** Kestane ıslahı çalışmalarında bu belirteçler dahil edilerek genetik ilişki tespitleri yönünde moleküler karakterizasyon analizleri yapılabilir ve ıslah sürecinin etkin planlanamsı sağlanabilir.

Ayrıca, bu çalışmada tercih edilen retrotranspozon esaslı iPBS belirteçler kulanılarak yapılan moleküler düzeyde karakterizasyon analizi, **Ülkemizde kestanelerde ilk kez olmak üzere kestane çeşitleri arasındaki genetik ilişki düzeyini belirlemek amacıyla başarılı sonuçlar ortaya çıkarmıştır.** Üstelik bu konuda yapılmış olan sadece bir literatür kaynak bulunmakta olup belirlemiş olduğumuz polimorfizm seviyesi bu kaynak çalışmadan çok yüksek seviyede elde edilmiştir. Çalışmamızda polimorfiklik gösteren tüm iPBS belirteçler de kestane ıslahı çalışmalarında moleküler düzeyde karakterize etme çalışmalarında kullanılabilir ve ıslah sürecinin etkin planlanmasında yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Abdelhamid, S., Lê, C.L., Conedera, M., Küpfer, P. (2014). The assessment of genetic diversity of *Castanea* species by RAPD, AFLP, ISSR, and SSR markers. *Turkish Journal of Botany*, 38, 835-850. doi:10.3906/bot-1303-30
- Alcaide, F., Solla, A., Mattioni, C., Castellana, S., Martín, M.Á. (2019). Adaptive diversity and drought tolerance in *Castanea sativa* assessed through EST-SSR genic markers. *Forestry*, 92, 287-296. doi:10.1093/forestry/cpz007
- Alcaide, F., Solla, A., Cuenca, B., & Martín, M.Á. (2022). Molecular evidence of introgression of Asian germplasm into a natural *Castanea sativa* forest in Spain. *Forestry*, 95(1), 95-104.
- Alessandri, S., Krznar, M., Ajolfi, D., Ramos Cabrer, A.M., Pereira-Lorenzo, S., Dondini, L. (2020). Genetic diversity of *Castanea sativa* Mill. accessions from the Tuscan-Emilian Apennines and Emilia Romagna Region (Italy). *Agronomy*, 10, 1319. doi:10.3390/agronomy10091319
- Altın, Y. (2022). Kestane çeşit ve genotiplerinin çiçek tozu kalitesinin belirlenmesi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. <http://hdl.handle.net/11452/25532>
- Amiryousefi, A., Hyvönen, J., Poczar, P. (2018). iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 6(6), e1159. <https://doi.org/10.1002/aps3.1159> <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aps3.1159>
- Boccacci, P., Akkak, A., Marinoni, D.T., Bounous, G., Botta, R. (2004). Typing European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars using oak simple sequence repeat markers. *Hortscience*, 39(6), 1212-1216. https://www.researchgate.net/publication/277869046_Typing_European_Chestnut_Castanea_sativa_Mill_Cultivars_Using_Oak_Simple_Sequence_Repeat_Markers
- Borges, O.P., Carvalho, J.S., Correia, P.R., Silva, A.P. (2007). Lipid and fatty acid profiles of (*Castanea sativa* Mill.) chestnuts of 17 native Portuguese cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 80-89.
- Bouffartigue, C., Debille, S., Fabreguettes, O., Cabrer, A. R., Pereira-Lorenzo, S., Flutre, T., & Harvengt, L. (2020). Two main genetic clusters with high admixture between forest and cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in France. *Annals of Forest Science*, 77(3), 1-16.
- Buck, E.J., Hadonou, M., James, C.J., Blakesley, D., Russell, K. (2013). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes*, 3:239-241. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00410.x
- Büber, S. (2021). Bursa bölgesi Anadolu kestanesi ormanlarının dağılışı ve yetiştirme ortamı özelliklerinin belirlenmesi (Master's thesis, BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Camisón A., Martín M.Á., Dorado F.J., Moreno G., Solla A. (2020). Changes in carbohydrates induced by drought and waterlogging in *Castanea sativa* Trees 34:579–591. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01939-x>
- Castellana, S., Martín, M.Á., Solla, A., Alcaide, F., Villani, F., Cherubini, M., Neale, D., Mattioni, C. (2021). Signatures of local adaptation to climate in natural populations of

- sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from southern Europe. *Annals of Forest Science*, 78: 27. <https://doi.org/10.1007/s13595-021-01027-6>
- Cho, S.K., Ryu, M.Y., Song, C., Kwak, J.M., and Kim, W.T. (2008). Arabidopsis PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *Plant Cell* 20 (7), 1899–1914.
- Coğrafya Harita (2021). Türkiye Kestane Üretim Haritası (2019). <http://cografyaharita.com/turkiye-tarim-haritalari4>. Son erişim tarihi: 31.04.2021
- Cohen, D., Bogeat-Triboulot, M.B., Tisserant, E. (2010). Comparative transcriptomics of drought responses in Populus: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 11:630. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-630>
- Coutinho, J.P., Carvalho, A., Martín, A., Lima Britol, J. (2018). Molecular characterization of *Fagaceae* species using inter-primer binding site (iPBS) markers. *Molecular Biology Reports*, 45:133-142. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4146-3>
- Davis, P.H. (1982). Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 7, 659.
- Desikan, R., Horák, J., Chaban, C., Mira-Rodado, V., Witthoft, J. (2008). The histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in Arabidopsis guard cells. *Plos One*, 3:e249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002491>
- De Vasconcelos, M.C.B.M., Bennett, R.N., Rosa, E.A.S., Ferreira-Cardoso, J.V. (2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1578- 1589.
- Doğan, İ., Doğan, N. (2019). Allel Sayılarının ve Allel Frekanslarının Heterozigotluk ve Polimorfizm Bilgi İçeriği Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri/ J. Med. Sci.* 39(2):187-93. doi: 10.5336/medsci.2018-63604
- Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J.M., Vendramin, G., Sebastiani, F. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics*, 11, 570.
- Ekinci, E.H. (2020). Farklı Çerezlik Kabak (*Cucurbita Pepo* L.) Popülasyonlarının SSR markörleri ile moleküler karakterizasyonu, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Ekşioğlu, A. (2016). Kuraklık stresinde miRNA cevaplarının domateste araştırılması. Doctoral dissertation, İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Bilim Dalı.
- Emreköy, (2022). Emreköy Tarım ve Hayvancılık İşletmeciliği. (Erişim tarihi: 02.08.2022). <http://www.emrekoy.com.tr/kestane/>
- Erdem, R. (1951). Türkiye’de kestane ölümünün sebepleri ve savaş imkanları, Tarım Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, Yayın No:102/11. Ankara: OGM Yayınları.
- Ertan, E., & Kılınç, S.S. (2005). Seleksiyon ile belirlenmiş kestane genotiplerinin morfolojik, fenolojik ve biyokimyasal özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(2), 67-77.

- Ertan, E., Seferoglu, G., Dalkilic, G., Tekintas, F.E., Seferoglu, S., Babaeren, F., Onal, M. and Dalkilic, Z. 2007. Selection of chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) grown in Nazilli district, Turkey. *Turk. J. Agric. For.* 31:115-123.
- Eser, H. (2019). Bursa ekolojik koşullarında yetiştirilen kestane çeşit ve genotiplerin meyvelerinde morfolojik karakterizasyon ve kimyasal içeriğin belirlenmesi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- EUFORGEN, (2021). “Species”, <http://www.euforgen.org/species/castanea-sativa/> Son erişim tarihi: 31.04.2021.
- Fang, Y., Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Mol Life Sci* 72:673–689. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>
- FAOSTAT-data, (2021). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Son erişim tarihi: 13.03.2021.
- Fernández-Cruz, J., Fernández-López, J. (2012). Morphological, molecular and statistical tools to identify *Castanea* species and their hybrids. *Conservation Genetics*, 13(6), 1589-1600.
- Fernández-Cruz, J., & Fernández-López, J. (2016). Genetic structure of wild sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in northwest of Spain and their differences with other European stands. *Conservation Genetics*, 17:949-967. doi:10.1007/s10592-016-0835-4i:10.3906/bot-1303-30
- Ganopoulos, I.V. vd. (2011). Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. *Euphytica*, 181:237-251. doi: 10.1007/s10681-011-0416-z
- GEKA, (2009). T.C. Güney Ege Kalkınma Ajansı. Aydın İli Kestane Yatırım Raporu. (Erişim tarihi: 02.08.2022). www.geka.org.tr
- Gleku, O.D. (2020). Molecular characterization of *Vaccinium* species from Turkey (Ülkemizden örneklenen *Vaccinium* türlerinin moleküler karakterizasyonu). Niğde Ömer Halisdemir University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Agricultural Genetic Engineering (Doctorate thesis), 49p.
- Gobbin, D., Hohl, L., Conza, L., Jermini, M., Gessler, C., Conedera, M. (2007). Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome*, 50,1089-1103.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles eserches sur la Distribution Florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44:223-270.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., & Panneerselvam, R. (2007). Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 205-209.
- Janfaza, S., Yousefzadeh, H., Nasr, S.M.H., Botta, R., Abkenar, A.A., Marinoni, D.T. (2017). Genetic diversity of *Castanea sativa* an endangered species in the Hyrcanian forest. *Silva Fennica*, 51(1), article id 1705. <https://doi.org/10.14214/sf.1705>
- Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. (2010). iPBS auniversal method for DNA fingerprinting and retro transposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* 121:1419-1430. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-010-1398-2>

- Kalendar, R. (2011). The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity. *Ratar. Povrt. Field Veg. Crop Res.* 48:261- 274. <http://hdl.handle.net/10138/42723>
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177 (3), 309–334.
- Karimizadeh, R., Asghari, A., Chinipardaz, R., Sofalian, O., Ghaffari, A., Shahbazi, K., Hosseinpour, T., Ghogog, H., Armion, M. (2019). Use of principal coordinate analysis formeasuring GE interactions in rain-fed durum wheat genotypes. – *Journal of Agriculture Sciences* 25: 38-46.
- Kendir, G., Öztürk, A., & Köroğlu, (2016). *Castanea sativa* Mill.(kestane), meyve ve yaprak anatomisi.
- Krutovskii, K.V., Neale, D.B. (2001). Forest genomics for conserving adaptive genetic diversity. In *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*. Geburek T. and Turok J. (eds). *Arbora Publishers*, pp. 369–390.
- Kumru, A. (2019). Bazı kestane (*Castanea sativa* Mill.) çeşit ve genotiplerin Bursa koşullarında bitki gelişim kuvveti ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi. Bursa Uludağ Üniversitesi, Doktora Tezi.
- Kuras, A. vd. (2013). Application of five DNA marker techniques to distinguish between five apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and their sports. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 88(6):790-794. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11513040>
- Küçük, E. (2010). Kazdağları yerinde (in situ) muhafaza alanlarındaki kestane (*Castanea sativa* Mill.) popülasyonlarının mikrosatelit (SSR) markörler ile karakterizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü (Doktora Tezi).
- Li, X., Gao, W., Guo, H., Zhang, X., Fang, D. D., Lin, Z. (2014). Development of EST-based SNP and InDel markers and their utilization in tetraploid cotton genetic mapping. *BMC Genomics*, 15(1), article 1046.
- Li, G., Quiros, C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and applied genetics*, 103(2-3):455-461.
- Lind, J.F., Gailing, O. (2013). Genetic structure of *Quercus rubra* L. and *Quercus ellipsoidalis* E.J. Hill populations at gene-based EST SSR and nuclear SSR markers. *Tree Genet Genomes* 9:707–722. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0586-4>
- Liu, Q., Umeda, M., Uchimiya, H. (1994). Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol. Biol.* 26 (6), 2003–2007.
- Macovei, A., Vaid, N., Tula, S., Tuteja, N. (2012). A new DEAD-box helicase ATP-binding protein (OsABP) from rice is responsive to abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 7 (9), 1138–1143.
- Marinoni, D., Akkak, A., Bounous, G., Edwards, K.J., Botta, R. (2003). Development and characterization.
- Martin, M.A., Mattioni, C., Cherubini, M., Turchini, D., Villani, F. (2010). Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 6,735-744. doi:10.1007/s11295-010-0287-9

- Mattioni, C., Cherubini, M., Micheli, E., Villani, F., & Bucci, G. (2008). Role of domestication in shaping *Castanea sativa* genetic variation in Europe. *Tree Genetics & Genomes*, 4(3), 563-574.
- Mattioni, C., Martin, M.A., Pollegioni, P., Cherubini, M., Villani, F. (2013). Microsatellite markers reveal a strong geographical structure in European populations of *Castanea sativa* (Fagaceae): Evidence for Multiple Glacial Refugia1. *American Journal of Botany*, 100(5), 951-961.
- MEB, (2013). T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Bahçecilik: Kestane yetiştiriciliği. (Erişim tarihi: 02.08.2022).
http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/kestane%20yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., Shinozaki, K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 765–769.
- Morgil, H. (2019). Kuraklık stresi uygulanmış mercimek (*Lens Culinaris Medik.*) bitkisinin RNA dizileme yöntemi ile transkripsiyonel analizi.
- Müftüoğlu, B. (2017). Bazı kestane çeşit ve genotiplerinin fenolojileri ve çiçek yapıları üzerinde araştırmalar. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans tezi).
- Nadeem, M.A. vd. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 32(2):261–285 <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nei, M., Tajima, F. and Tateno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19(2), 153-170.
- Nie, X.H., Wang, Z.H., Liu, N.W., Song, L., Yan B.Q., Xing, Yu., Zhang, Q., Fang, K.F., Zhao, Y.L., Chen, X., Wang, G.P., Qin, L., Cao, Q.Q. (2021). Fingerprinting 146 Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) accessions and selecting a core collection using SSR markers. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(5), 277-1286. doi: 10.1016/S2095-3119(20)63400-1
- Nunziata, A., Ruggieri, V., Petriccione, M., De Masi, L. (2020). Single nucleotide polymorphisms as practical molecular tools to support European chestnut agrobiodiversity management. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 4805. doi:10.3390/ijms21134805
- NZOB, (2022). Nazilli Ziraat Odası Başkanlığı Tarımsal Yayın ve Danışmanlık, Kestane Yetiştiriciliği, (Erişim tarihi: 02.08.2022). <http://www.nzob.org.tr/sayfa.asp?id=99>
- Orhan, E. (2020). Review: Some Molecular Breeding Issues at Genome Level in Fruit Species. *International Journal of Scientific and Technological Research*. 6(8):61-83. Doi: 10.7176/JSTR/6-08-08
- Özkarakaş, İ. (2001). Kestane Tarımı. TAYEK/TYUAP Tarımsal Araştırma Yayın ve Eğitim Koordinasyonu. 2001 yılı Bahçe Grubu Bilgi Alışveriş Toplantısı, 21-23 Ağustos 2001, sayfa 1- 17, yayın no:102, Menemen-İzmir.
- Pereira-Lorenzo, S., Costa, R.M.L., Ramos-Cabrera, A.M., Ribeiro, C.A.M., da Silva, M.F.S., Manzano, G., & Barreneche, T. (2010). Variation in grafted European chestnut and

- hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genetics & Genomes*, 6(5), 701-715.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.01. Exeter Software. Setauket, New York.
- Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M. and Maeshima, M. (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46 (9), 1568–1577.
- Örs, S., Ekinci, M. (2015). Kuraklık stresi ve bitki fizyolojisi. *Derim*, 32(2), 237-250. doi: 10.16882/derim.2015.90060
- Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S. (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 100 (5), 723–726.
- Seo, D.H., Ryu, M.Y., Jammes, F., Hwang, J.H., Turek, M., Kang, B.G. (2012). Roles of four Arabidopsis U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of ABA-mediated drought stress responses. *Plant Physiol.* 160 (1), 556–568.
- Serdar, Ü., Akyüz, B., Ceyhan, V., Hazneci, K., Mert, C., Er, E., Ertan, E., Çoskuncu Savaş, K.S., Uylaşer, V. (2018). Horticultural characteristics of chestnut growing in Turkey. *Erwerbs-Obstbau*, 60:239–245. <https://doi.org/10.1007/s10341-017-0364-4>
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 115(2), 327–334.
- Silveira, R.D., Abreu, F.R., Mamidi, S., McClean, P.E., Vianello R.P., Lanna, A.C. (2015). Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). *Genet Mol Res*, 14:8181– 8200. <https://doi.org/10.4238/2015.July.27.6>
- Soylu, A. (1984). Kestane yetiştiriciliği ve özellikleri. Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 59, Yalova.
- Soylu., A., Ufuk, S. (1994). Marmara Bölgesi kestanelerinin seleksiyon yoluyla ıslahı. Sonuç Raporu, Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Soylu, A. (2004). Chestnut growing and specialities, Hasad Publication. İstanbul, Turkey (book in Turkish)
- Soylu, A., Serdar, Ü., Ertan, E., Mert, C. (2006). Türkiye kestane yetiştiriciliğinde son gelişmeler. 1. Uluslararası Odun Orman Ürünleri Sempozyumu, Trabzon, 365-375.
- Sullivan, A., Lind, J.F., McCleary, T., Romero-Severson, J., Gailing, O. (2013). Development and characterization of genomic and gene based microsatellite markers in North American red oak species. *Plant Mol Biol Report*, 31:231–239. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11105-012-0495-6>
- TAGEM (2021). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü: Enstitüler. <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Link/13/Enstituler> Son erişim tarihi: 28.08.2021.
- Tardieu, F., Simonneau, T. and Muller, B. (2018). The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 733–759.
- Tessier, C., David, J., P., This, J. M., Boursiquot, and Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Theoretical and Applied. *Genetics*, 98: 171–177.

- Torokeldiev, N., Ziehe, M., Gailing, O. (2019). Genetic diversity and structure of natural *Juglans regia* L. populations in the southern Kyrgyz Republic revealed by nuclear SSR and EST-SSR markers. *Tree Genet Genomes* 15:5. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1311-8>
- TTSM, (2016). Registered fruit cultivars. (12.02.2016) <http://www.tarim.gov.tr/BUGEM/TTSM/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=87>
- TÜİK, (2022). TÜİK Veri Portalı, Bitkisel Üretim 1.Tahmini (2021), Tablo-3 Meyve ürünleri içecek ve baharat bitkileri üretim miktarları. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-1.Tahmini-2022-45502> Son erişim tarihi: 28.07.2022.
- Uylaser, B.İ.V. (2009). A research on suitability of some chestnut cultivars for candied chestnut. Proceedings of the First European Congress on Chestnut (s. 571-572). Torino: Acta Horticulturae
- Van Hove, J., De Jaeger, G., De Winne, N., Guisez, Y. and Van Damme, E.J. M. (2015). The Arabidopsis lectin EULS3 is involved in stomatal closure. *Plant Sci*, 238, 312–322.
- Vashisht, A.A. and Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *J. Photoch. Photobio*, B 84 (2), 150–160.
- Varshney, R.K., Graner, A. and Sorrells, M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23 (1), 48–55.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., Chen, S. (2021). Review: Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae*, 7(50). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Yatabe, Y., Kane, N.C., Scotti-Saintage, C., and Rieseberg, L.H. (2007). Rampant gene exchange across a strong reproductive barrier between the annual sunflowers, *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Genetics* 175 (4), 1883–1893.
- Yeh, F., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z., Mao, J. (1997). POPGEN Ver. 1.32. The userfriendly software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, Univ. of Alberta, Canada.
- Yıldız, M., Kaya, F., Terzi, H. (2020). Kuraklık stresi ve bitki proteomiği. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(1), 286-297.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E., Tanur, E.M. (2015). Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı. Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi (Journal of Bahri Dagdas Crop Research), 4 (2):1-12. <https://dergipark.org.tr/en/pub/bdbad/issue/25865/272665>
- Yurdakul, E. (2008). Kahvaltılık gevrekleri zenginleştirmek amacıyla üretilen dondurarak kurutulmuş kestanenin kalite kriterlerinin değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Didem KARA

Doğum tarihi:

Doğum Yeri:

Uyruğu:

E-mail:

Eğitim

Lise: Fatih Sultan Mehmet Anadolu Lisesi

Lisans: Atatürk Üniversitesi/ Ziraat fakültesi/Tarımsal Biyoteknoloji

Yüksek lisans: Bitkisel Biyoteknoloji

Doktora: -

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce: İyi

Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-