



Türkiye'deki Söğüt Türlerinin Moleküler Filogenetiği ve Ekonomik Açıdan Önemli Olan Türlerin (*Salix alba* & *Salix excelsa*) Islahına Yönelik Gen Kaynaklarının Karakterizasyonu

Program Kodu: 1001

Proje No: 213O154

**Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Zeki Kaya**

Araştırmacılar: Prof. Dr. Hayri Duman

Bursiyerler:

Araş. Gör. Funda Özdemir Değirmenci

Araş. Gör. Pelin Acar

Araş Gör. Asiye Çiftci

Burak Yelmen

Nisan 2017

ANKARA

ÖNSÖZ

Söğüt cinsi (*Salicaceae*) dünya genelinde yaklaşık 500 türü kapsamakta olup çok fazla morfolojik farklılıklar göstermektedir. Ülkemizde 27 tür yayılış göstermekte olup teşhislerinde problemler yaşanmaktadır. Özellikle morfolojik ve anatomik karakterler bu cins içinde yer alan türlerin taksonomik tayini ve cins içinde yer alan diğer türlerle olan evrimsel ilişkisini tayin etmek için yeterli olamamaktadır. Bu çalışmada evrimsel olarak korunmuş olan ve moleküler filogenetik çalışmalarda yaygınca kullanılan kloroplast (*matK*, *rbcL*, *tRNA*) ve çekirdek (rDNA ITS) genomlarında bulunan bölgeler karşılaştırmalı olarak araştırılmış ve türlerin moleküler düzeyde nasıl farklılaştığı ortaya konmuştur. İlave olarak Türkiye nehir ekosistemlerinin en önemli türlerinden olan ve habitatları sulama ve elektrik amaçlı yapılan barajlarla parçalanmış ya da tahrip edilmiş ekonomik ve ekolojik öneme sahip *Salix alba* ve *Salix excelsa* türlerinin gen kaynaklarının etkin bir şekilde belirlenmesi ve korunmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmada bu cinste ileride yapılacak tür teşhisi, gen kaynaklarını koruma ve ıslah çalışmalarını daha etkin ve programlı yapılmasına katkıda bulunulacak veriler üretilmiştir.

Kloroplast ve çekirdek DNA bölgeleriyle ayrı ayrı oluşturulan her iki ağaçtaki türlerin konumları arasındaki farklar görülmüştür. Bu da söğüt türlerinde görülen kloroplast paylaşımı ve introgresif melezlenme (gen aktarımına yönelik birçok nesilde benzer birey ve ebeveynler arasında geri çaprazlama) ile türlerin arasında yoğun etkileşim ile açıklanmaktadır. Altçinslerin bu şekilde moleküler veriye göre iki ağaçta da iki ana gruba ayrılması (altçins *Salix* ve *Vetrix*) farklı biyocoğrafalarda; ılıman (altçins *Salix*) ve soğuk (altçins *Vetrix*) yer almalarıyla açıklanabilmektedir.

Morfolojik olarak iki farklı tür olarak ifade edilen *S. alba* –*S. excelsa* türlerinin kloroplast ve çekirdek DNA bölgeleri ile DNA dizi analizi ile etraflıca çalışılmasına rağmen net bir şekilde ayrışmadığı görülmüştür. *S. alba* ve *S. excelsa* türlerinde türleşme devam ettiği için kesin bir tür farklılaşması görülmemiştir. Bu nedenle (*S. alba/excelsa*) kompleksi olarak örneklenen 10 nehirden toplanan tüm popülasyonlar *S. alba*- *S. excelsa* ve melezleri olarak çok fazla iç içe girdiğinden *S. alba* baskın tür olarak dikkate alınmıştır.

Türkiye çapında *Salix alba* popülasyonları 10 nehirde çalışılmış ve alel paylaşımına dayalı genetik yapılaşma değerlendirmeleri bu türün popülasyonlarının 3 atasal gen havuzundan evrimleştiğini ve türleşmenin devam ettiğini göstermektedir. Popülasyonların genetik benzerliklerine göre yapılan sınıflandırmada ise Anadolu Çaprazı'nın önemli rolü olduğu görülmektedir. Bu çaprazın doğusunda Seyhan, Ceyhan, Fırat, Aras ve Çoruh nehir popülasyonları batısında ise üç alt gruptan oluşan Göksu, Kızılırmak-Ihlara-Aksu ve Susurluk

yeralmaktadır. Genetik çeşitlilik de uzun ve farklı nehirlerde daha yüksek iken kısa ve daha tahrip görmüş kısa nehirlerde oldukça düşük ve akrabalık dereceside yüksek bulunmuştur.

Bu proje kapsamında örneklenen nehirlerin hemen hepsinde doğal nehir ekosistemlerinin ve habitatlarının çeşitli çevresel faktörler yüzünden ya yok olduğu ya da parçalı bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Halbuki söğütler nehir ekosistemlerinin en önemli türlerinden olup, nehirlerin temizlenmesi ve ekosistemin tekrar tamir edilmesi çalışmalarında bütün dünya da en etkili bitkisel çözüm (Phytoremediation) aracı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu projenin verileri ışığı altında, parçalanmış ve tahrib olmuş veya tahribatın devam ettiği nehir ekosistemlere öncelik verilerek *Salix alba* ile akarsu boyları ekosistemlerin restorasyonuna ve türün gen kaynaklarını korumaya yönelik programların vakit geçirilmeden oluşturulması gerekmektedir.

Proje TOVAG- 213O154 numaralı araştırma projesi olup TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Proje sonuçlarının konuyla ilgilenen uygulamacı ve araştırmacılara yararlı olması dileğiyle.

5 Nisan 2017

Prof. Dr. Zeki Kaya

ODTÜ. Biyolojik Bilimler Bölümü

Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
PROJEYLE İLGİLİ BİLİMSEL VE TEKNİK SONUÇLAR	1
1. GİRİŞ	1
1.1 Literatüre özeti	2
1.1.1 Söğütlerin ekonomik değeri.....	3
1.1.2 Söğütlerin taksonomisi.....	4
1.1.3 Türkiye’de söğüt cinsi.....	4
1.1.4 Moleküler çalışmalar.....	7
2. ÇALIŞMANIN AMACI	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1 Örnekleme ve bitki materyali (iş paketi-1)	11
3.2 DNA izolasyonu (iş paketi 1-2)	2
3.3 Söğüt türlerinin filogenetiğini (soyağacını) Moleküler yöntemlerle (kloroplast DNA <i>matK</i>, <i>rbcl</i>, tRNA ve çekirdek rDNA <i>ITS</i>) ortaya koyma çalışmaları (iş paketi-1)	4
3.3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	2
3.3.2 Agaroz jel elektroforez koşulları.....	5
3.4 Verilerin toplanması ve analiz edilmesi	6
3.5 Önemli nehir sistemlerinde doğal olarak bulunan <i>Salix alba-S. excelsa</i> tür kompleksinin moleküler karakterizasyonu (iş paketi 1-ek)	7
3.6 <i>Salix alba</i> populasyonlarının genetik çeşitlilik ve yapılanmasının Türkiye nehir sistemlerinde (havzasında) belirlenmesi (iş Paketi 2)	10
3.6.1 Örnekleme ve bitki materyali.....	10
3.6.2 SSR (Simple Sequence Repeats-Basit dizi tekrarları) DNA belirteçlerin seçimi ve PCR koşullarının optimizasyonu.....	12
3.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	14
3.6.4 Agaroz jel elektroforezi.....	17
3.6.5 Fragment analizi.....	17
3.6.6 Genetik veri analizleri.....	17
4. BULGULAR	20
4.1 Türkiye söğüt türlerinin moleküler filogenetiği	20
4.2 Filogenetik Ağaçların Değerlendirilmesi (<i>trn</i> T-F, <i>matK</i>, <i>rbcl</i> ve rDNA <i>ITS</i>)	23
4.3 Türkiye nehir sistemlerinde <i>Salix alba-S.excelsa</i> teşhisi (iş paketi 1-ek)	26
4.4 <i>S. alba-S.excelsa</i> filogenetik ağaçlarının değerlendirilmesi	27
4.5 <i>Salix alba</i> populasyonlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve genetik yapılarının karakterizasyonu (iş Paketi 2)	33
4.5.1 DNA İzolasyonu ve PCR.....	33
4.5.2 Fragment Analizi.....	33
4.5.3 Genetik verilerin değerlendirmesi.....	36
4.5.3.1 Genetik çeşitliliğin nehirler arası yapılanması.....	36

4.5.3.2 Genetik çeşitliliğin nehir bazında yapılanması	40
4.5.3.3 Türkiye bazında <i>Salix alba</i> populasyonların genetik yapılanması	43
4.5.3.4. Nehir bazında <i>Salix alba</i> populasyonlarının genetik yapı analizi	45
4.5.3.5 Behiçbey Söğüt (" <i>Salix alba-Salix excelsa</i> ") klon bankasında genetik çeşitlilik ve yapılanma	58
5. TARTIŞMA	61
5.1 Türkiye Söğüt türlerinin moleküler filogenetiği	61
5.2 <i>Salix alba-S. excelsa</i> türlerinin moleküler fiogenetiği.....	63
5.3 <i>Salix alba</i> popülasyonlarının Türkiye bazında genetik çeşitliliği ve yapılanması	65
5.4. <i>Salix alba</i> populasyonlarında genetik yapılaşma	68
5.5 Nehir bazında <i>Salix alba</i> populasyonlarının genetik yapılanması	71
6. SONUÇLAR.....	75
7. KAYNAKLAR.....	78

TABLULAR

Tablo 1 : Türkiye’de doğal olarak bulunan söğüt türleri (Baytop, 1997).....	5
Tablo 2 : Ülkemizde doğal olarak bulunan söğüt türlerinin filogenetiği çalışmaları (İş Paketi-1) için elde edilen türler ve yapılan arazi örneklemeleleri	1
Tablo 3 : Söğüt türlerinde filogenetik ağaç için kullanılan primer nükleotid dizileri; Kloroplast trnT-F, matK, rbcL ve Çekirdek rDNA ITS.....	1
Tablo 4 : Bütün gen bölgeleri (cpDNA trn T-F, matK, rbcL ve rDNA ITS) için PCR reaksiyonunda kullanılan optimum çözelti miktarları.....	3
Tablo 5 : Bütün gen bölgelerinde (cpDNA trn T-F, matK, rbcL ve rDNA ITS) kullanılan primerler için optimize edilen ve uygulanan PCR koşulları.....	4
Tablo 6 : Önemli nehir sistemlerinde doğal olarak bulunan <i>Salix alba</i> - <i>S. excelsa</i> tür kompleksinin moleküler karakterizasyonuna yönelik örneklenen popülasyonları ve kodları (İş Paketi-1 ek çalışma).....	8
Tablo 7: <i>S. alba</i> ve <i>S.excelsa</i> ’da tür ayrımı için çalışılan çekirdek ETS’ye yönelik kullanılan primer nükleotid dizileri	9
Tablo 8: Çekirdek rDNA ETS gen bölgesi için optimize edilen PCR reaksiyonunda kullanılan çözelti miktarları.	9
Tablo 9: Çekirdek rDNA ETS gen bölgesi için kullanılan primerler için optimize edilen ve kullanılan PCR koşulları.	10
Tablo 10 : Projede çalışılan nehirlerin isimleri, popülasyon kodları, buldukları il/ilçeler, ve rakım aralıkları.	11
Tablo 11 : SSR lokusları ve işaretleme boyası.	13
Tablo 12 : SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, motif, bağlanma sıcaklığı ve kaynakları.....	14
Tablo 13: Her bir primer çifti için belirlenen optimizasyon koşulları.	15
Tablo 14: Optimize edilen PCR reaksiyon koşulları.	16
Tablo 15: Çalışan kloroplast genomu gen bölgelerinde belirlenen moleküler çeşitlilik parametreleri.....	22
Tablo 16: Çalışan çekirdek gen bölgesinde (<i>ITS</i>) belirlenen moleküler çeşitlilik parametreleri.	22
Tablo 17: <i>S.alba</i> ve <i>S.excelsa</i> ’ya yönelik çalışılan kloroplast ve çekirdek gen bölgelerinde belirlenen moleküler çeşitlilik parametreleri.	27
Tablo 18 : <i>S.alba</i> / <i>S. excelsa</i> tür tayinini belirleyen 3 gen bölgesine (<i>matK</i> , <i>ITS</i> ve <i>ETS</i>) ait substitüsyon bazları ve pozisyonları (A: adenin, G: guanin, C: sitozin, T: timin).....	28
Tablo 19: Her popülasyondan alınan söğüt türlerinin çekirdek (<i>ITS</i> ve <i>ETS</i>) ve kloroplast (<i>matK</i>) gen bölgesi ağaçlarına göre <i>S.alba</i> / <i>S.excelsa</i> tayini ve değerlendirilmesi.....	32
Tablo 20: Fragment analizi yöntemi ile örneklerin fragment (alel) uzunluklarının dağılımı....	36
Tablo 21: Tüm <i>Salix alba</i> popülasyonlarında lokuslara ait genetik çeşitlilik parametreleri (Polimorfizm oranı (P), gözlenen alel sayısı (Ap), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho) kendileme katsayısı/ popülasyon (Fis), kendileme katsayısı/ popülasyon (Fit) ve Genetik farklılaşma (Fst)).	37
Tablo 22: Lokuslar için hesaplanan Fis, Fit ve Fst değerleri.	37
Tablo 23: Tüm nehirlerdeki <i>Salix alba</i> türüne ait popülasyonlarında bulunan genetik çeşitlilik parametreleri. örnek Sayısı (N), ortalama Alel Sayısı (A), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho) kendileme katsayısı/ popülasyon (Fis), kendileme katsayısı/ popülasyon (Fit) ve Genetik farklılaşma (Fst)).	38
Tablo 24: Tüm nehirlerdeki <i>Salix alba</i> türüne ait popülasyonlarında hesaplanan genetik çeşitlilik parametreleri.....	41
Tablo 25 : 10 nehirden örneklenen 643 <i>Salix alba</i> genotipinin STRUCTURE genetik yapı analizi.....	44
programı ile belirlenen 3 farklı genetik gruba ait olma sayısı ve yüzdeleri.....	44
Tablo 26 : 10 nehirden örneklenen 643 <i>Salix alba</i> genotipinin 3 farklı genetik.....	44
gruba ait olma katsayısı oranları.....	44

Tablo 27 : Nehirlerin bireysel olarak STRUCTURE genetik yapı analizi programı ile belirlenen farklı genetik gruplara ait olma sayısı ve yüzdeleri.....	46
Tablo 28 : Kızılırmak Nehri'nden örneklenen 147 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları.....	48
Tablo 29 : Göksu Nehri'nden örneklenen 112 <i>Salix alba</i> genotipinin 3 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.	49
Tablo 30 : Ceyhan Nehri'nden örneklenen 74 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları.	50
Tablo 31 : Seyhan Nehri'nden örneklenen 29 <i>Salix alba</i> genotipinin 3 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.	51
Tablo 32 : Aksu Nehri'nden örneklenen 58 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.	52
Tablo 33 : Ihlara, Melendiz çayıdan örneklenen 30 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.....	53
Tablo 34 : Aras Nehri'nden örneklenen 55 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.	54
Tablo 35 : Fırat Nehri'nden örneklenen 25 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları	55
Tablo 36 : Susurluk Nehri'nden örneklenen 86 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları.....	57
Tablo 37 : Çoruh Nehri'nden örneklenen 27 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.	58
Tablo 38 : Behiçbey klon bankasında bulunan ve <i>Salix alba</i> ve <i>Salix excelsa</i> türü olduğu varsayılan söğüt populasyonların genetik çeşitlilik parametreleri.....	59

ŞEKİLLER

Şekil 1 : Türkiye’de doğal olarak bulunan söğüt türlerine ait harita. Her renteki yuvarlak farklı bir türü temsil etmektedir. (http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=karsilastir).....	6
Şekil 2 : Türkiye genelinde yapılan arazi çalışmalarında örneklenen söğüt türlerinin lokasyonlarını gösteren harita (İş paketi-1).....	12
Şekil 3: İzole edilen 19 söğüt bireyine ait DNA’ların %8’lik agaroz jelde yürütülmesi. Soldan ilk kuyucuk markör (Referans) DNA’yı, markör DNA’dan soldan sağa sırasıyla kuyucuklar 19 örnek DNA’ları temsil etmektedir.	4
Şekil 4 : Kloroplast <i>trnT-F</i> bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Taberlet vd., 1991).	1
Şekil 5 : Kloroplast <i>matK</i> bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Li vd., 1997).	1
Şekil 6 :Kloroplast <i>rbcL</i> bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Savolainen vd., 2000).	2
Şekil 7:rDNA <i>ITS</i> bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Hsiao vd., 1995).	2
Şekil 8: <i>trnL</i> bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5 ‘luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S12) örneklerin DNA’larından çoğaltılmış <i>trnL</i> bantlarını göstermektedir.	5
Şekil 9 : <i>matK-1</i> bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5’luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S10) örneklerin DNA’larından çoğaltılmış <i>matK-1</i> bantlarını göstermektedir.	5
Şekil 10 : <i>rbcL-1</i> bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5’luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S10) örneklerin DNA’larından çoğaltılmış <i>rbcL-1</i> bantlarını göstermektedir.	6
Şekil 11 : <i>ITS</i> bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5 ‘luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S10) örneklerin DNA’larından çoğaltılmış <i>ITS</i> bantlarını göstermektedir.	6
Şekil 12: Çekirdek rDNA ETS bölgesinin görsel konumu ve kullanılan primer bilgileri (Baldwin ve Markos, 1998).	9
Şekil 13 : Projede örneklenen popülasyonların harita üzerinde konumları (Kaynak: http://cografyaharita.com).....	12
Şekil 14: Kloroplastın <i>trn T-F</i> , <i>matK</i> ve <i>rbcL</i> bölgelerine göre 24 <i>Salix</i> türü ve 1 <i>Salix</i> melezi için NJ ile elde edilen Filogenetik Ağaç. Filogenetik ağaç dalları üzerindeki numaralar: öz yazılım (bootstrap) değerleri. ●: Altıncı <i>Salix</i> . ▲: Altıncı <i>Vetrix</i> . ■; Dış grup (outgroup).	24
Şekil 15: Çekirdek rDNA <i>ITS</i> bölgesine göre 24 <i>Salix</i> türü ve 1 <i>Salix</i> melezi için NJ ile elde edilen Filogenetik Ağaç (Dallardaki numaralar: öz yazılım (bootstrap) değeri. ●: Altıncı <i>Salix</i> ▲: Altıncı <i>Vetrix</i> , ■: Dış grup (outgroup),]; Seksiyon.....	26
Şekil 16: <i>S.alba</i> ve <i>S.excelsa</i> ’ya yönelik. Kloroplast <i>matK</i> gen bölgesine göre NJ ile elde edilen Filogenetik Ağaç.	30
Şekil 17: <i>S.alba</i> ve <i>S.excelsa</i> ’ya yönelik çekirdek <i>ITS</i> ve <i>ETS</i> gen bölgelerine göre NJ ile elde edilen filogenetik ağaç.	31
Şekil 18: Farklı renkte boyanan SSR primerlerini analiz programı ile (Peak Scanner software v1.0) değerlendirme. Mavi, siyah ve yeşil pikler farklı SSR lokuslarını kırmızı pik ise kontrolü temsil etmektedir.	34
Şekil 19: Pik profiline göre örneklenen her genotipin homozigot (A) ya da heterozigot (B) olma durumunun belirlenmesi.....	35
Şekil 20 : UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile oluşturulan genetik ilişki ağacı.	39
Şekil 21 : Nehir bazında UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile oluşturulan genetik ilişki ağacı.	42

Şekil 22 : Türkiye’de ki farklı coğrafik bölgeleri temsil eden 10 nehirden örneklenen 643 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizi testi sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler nehirleri birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, turkuaz renk grup 2’yi kırmızı renk grup 3’ü temsil etmektedir.	45
Şekil 23: Kızılırmak Nehri’nden 5 populasyon olarak örneklenen 112 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizi testi sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	48
Şekil 24: Göksu Nehri’nden 4 populasyon olarak örneklenen 112 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, turkuaz renk grup 2’yi kırmızı renk grup 3’ü temsil etmektedir.	50
Şekil 25 : Ceyhan Nehri’nden 2 populasyon olarak örneklenen 74 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	51
Şekil 26 : Seyhan Nehri’nden bir populasyon olarak örneklenen 29 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, turkuaz renk grup 2’yi kırmızı renk grup 3’ü temsil etmektedir.	52
Şekil 27 : Aksu Nehri’nden 2 populasyon olarak örneklenen 58 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analiz sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	53
Şekil 28 : Ihlara, Melendiz çayından bir populasyon olarak örneklenen 30 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin testi sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	54
Şekil 29 : Aras Nehri’nden 2 populasyon olarak örneklenen 55 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	55
Şekil 30 : Fırat Nehri’nden bir populasyon olarak örneklenen 25 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	56
Şekil 31 : Susurluk Nehri’nden 4 populasyon olarak örneklenen 86 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	57
Şekil 32 : Çoruh Nehri’nden bir populasyon olarak örneklenen 27 <i>Salix alba</i> genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, kırmızı renk grup 2’yi temsil etmektedir.	58
Şekil 33 : UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile oluşturulan genetik ilişki ağacı.	60
Şekil 34 : Structure programı ile elde edilen populasyonları grupları.....	60

ÖZET

Ülkemizde doğal olarak 27 *Salix* türü yayılış göstermekte, teşhisinde problemler bulunmaktadır. İlk iş paketi kapsamında Türkiye'deki söğüt türleri arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için, kloroplast genomunun *matK*, *rbcL* ve tRNA ile çekirdek genomundaki rDNA *ITS* bölgelerinin DNA dizileri çoğaltılarak, analiz edilmiştir. Hem kloroplast hem de çekirdek verilerine göre Türkiye Söğütleri monofiletik yapıda olup filogenetik ağaçta, iki ana grupta (Alt cins *Salix* ve *Vetrix*) toplanmaktadır. *S. pentandroides*, *S. babylonica* ve *S. acmophylla* (Alt cins *Salix*), *S. elbursensis* ve *S. amplexicaulis* (Alt cins *Vetrix*) en uzak türler olarak bulunmuştur. İki ağaçtaki türlerin konum farkları kloroplast paylaşımı ve introgresif melezlenme sonucunda oluşmuştur. Morfolojik olarak iki farklı tür olarak ifade edilen *S. alba* ve *S. excelsa*'nın moleküler olarak ayrımı için ilave iş paketinde, iki tür için moleküler düzeyde ayırım yapılamamıştır. *S. alba*/*S. excelsa* kompleksi olarak örneklenen 10 nehirden toplanan tüm popülasyonlar, moleküler türleşme devam ettiği için *S. alba* popülasyonları olarak kabul edilmiştir.

İkinci iş paketinde; Türkiye' de doğal olarak yetişen ve ekonomik öneme sahip *Salix alba*'nın gen kaynaklarının belirlenmesi amacıyla, 10 farklı nehir havzasından, toplam 23 farklı popülasyon, 15 farklı çekirdek SSR belirteçi ile taranmıştır. Genetik yapılaşma analizi sonuçlarına göre birbirinden farklı 3 genetik gruba (K=3) yerleştirilmiştir. Bu 3 ana grubu yüksek yüzde ile temsil eden nehirler sırasıyla 1. grubu Göksu ve Kızılırmak, 2. grubu Ceyhan-Seyhan-Fırat ve ve 3. grubu ise Susurluk ve Çoruh Nehir'lerini temsil eden genotipler oluşturmuşlardır. Çalışılan 10 nehir sistemindeki *S. alba* popülasyonları genetik benzerlik bakımından iki ana grupta toplanmış olup, Anadolu Çaprazı'nın etkisi bariz bir şekilde görülmektedir. Uzun ve daha farklı habitatları içinde bulunduran nehirler hariç (Kızılırmak ve Göksu), bütün nehirlerde genetik çeşitlilik daha düşük ve popülasyon içinde akrabalık derecesi ise daha yüksek bulunmuştur. Örneklenen nehirlerde doğal ekosistemlerin çoğunun yok olduğu ve parçalandığı görülmüştür. Nehir ekosistemlerinin kontrol edici görevi olan önemli türlerin (Türkiye durumunda *S. alba*) gen kaynaklarını koruma programlarının acilen oluşturulması ve bozulmuş nehir ekosistemlerinin restorasyonunda kullanılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Salix* spp., moleküler sistematik, soyağacı, genetik çeşitlilik, gen kaynaklarının korunması

ABSTRACT

Naturally, 27 *Salix* species are found in Turkey which have taxonomical problems. In the first work package, all *Salix* species are studied with respect to cpDNA *matK*, *rbcL* and tRNA and nrDNA *ITS* gene regions to reveal the genetic relationships. Based on molecular data, *Salix* species in Turkey with a monophyletic structure were clustered in two major groups (subg. *Salix* & *Vetrix*). *S. pentandroides*, *S. babylonica* and *S. acmophylla* (Subg. *Salix*), *S. elbursensis* and *S. amplexicaulis* (Subg. *Vetrix*) were distantly located species within subgenera. The differences in location of species in the both phylogenetic trees were due to chloroplast sharing and introgressive hybridization. *S. alba* and *S. excelsa* species which are morphologically close species were studied with an additional work package though it was difficult to separate them clearly as due to haplotype (chloroplast) sharing. All populations (*S. alba*/*S. excelsa*) were considered as *S. alba* due to molecular evolution.

In the second work package, 23 populations (*S. alba*) from 10 rivers were screened with 15 markers (SSR) to generate the genetic data. Genetic structure analysis in *S. alba* populations revealed 3 different genetic groups (K=3). These groups represented with high membership values were 1st group with Göksu and Kızılırmak, 2nd group with Seyhan-Ceyhan-Euphrate and 3rd group with Susurluk and Çoruh rivers. Genetic distance among *S. alba* populations were clustered in two major groups in which the role of Anatolian Diagonal is clearly present. Genetic diversity of all *S. alba* populations except for the populations from the rivers with diverse habitats (Kızılırmak and Göksu) was low associated with high inbreeding coefficients. Most of the river habitats studied were either destroyed or fragmented. Genetic resources of *Salix alba* in Turkey with important regulatory functions in river ecosystems need to be taken into conservation programs and used restoration of degraded river ecosystems.

Key words: *Salix* spp., molecular systematics, phylogeny, genetic diversity, genetic resource conservation.



PROJEYLE İLGİLİ BİLİMSEL VE TEKNİK SONUÇLAR

1. GİRİŞ

Söğüt cinsi (*Salicaceae*) dünya genelinde yaklaşık 500 türü kapsamakta olup, çok fazla morfolojik farklılıklar göstermektedir (Hardig vd., 2010). Kuzey kürede daha fazla görülen söğüt türleri yoğun olarak Çin (270 tür). Rusya ve Orta Asya Cumhuriyetleri sınırları içinde (120 tür) bulunmaktadır. Söğütler Kuzey Amerika'da 103 tür ile temsil edilirken Avrupa için bu sayı 65'tir (Argus, 1997). Ülkemizde 27 tür yayılış göstermekte olup, teşhisinde problemler bulunmaktadır (Terzioğlu vd., 2014).

Türkiye de yayılışı bilinen doğal söğüt türlerinin coğrafi dağılışında bazı özellikler dikkat çekmektedir. Bazı türler dar bir yayılış alanı gösterirken (*S. triandra* subsp. *triandra*), bazı türler ise (*S. alba*) coğrafi bölgelerimizin hemen hemen hepsinde yayılış göstermektedir.

Son zamanlarda fark edilmiştir ki; sadece morfolojik ve anatomik karakterler bu cins içinde yer alan türlerin taksonomik tayini ve cins içinde yer alan diğer türlerle olan evrimsel ilişkisini tayin etmek için yeterli olamamaktadır. Bu yüzden, özellikle son 20 yıldır kloroplast ve çekirdek DNA'da yer alan çok sayıda farklı bölge, PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) metodu kullanılarak çoğaltılmakta ve türlerin filogenetik ilişkisi bitkilerin genetik materyali esas alınarak ortaya konmaktadır. Bu sayede morfolojik, anatomik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiş örnekler genetik materyal bakımından da değerlendirilmekte ve ortaya daha tutarlı bir sonuç çıkartılmaya çalışılmaktadır.

Bu proje kapsamınca morfolojik olarak çok benzer olan farklı bölgelerden toplanmış Söğüt türleri, total DNA'sı izole edilmiş ve hedeflenen bölgelerin optimize edilmiş metodlarla çoğaltılmıştır. Bunun yanında Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nın ilgili kuruluşları tarafından söğüt gen kaynaklarını korumak ve ıslah çalışmalarını yürütmeye yönelik olarak Türkiye'nin belirli yörelerinden (özellikle iç Anadolu bölgesinden) söğüt klonları seçilmiştir. Seçilen klonlar Ankara Behiçbey Fidanlığı'ndaki klon bankasına aktarılma çalışmaları başlatılmış olmasına rağmen bunlar hiçbir genetik bilgi olmadan programsız ve rastgele yapılmaktadır. Böyle kurulan bir gen bankasından, söğüt gen kaynaklarından ıslah programlarında etkin şekilde yararlanılması şimdye kadar mümkün olmamıştır. Yeterli genetik ve ıslaha yönelik araştırmalar olmadığı için bu klonlar biyokütle üretiminde de kullanılamamaktadır.

Ülkemizde söğütlerle ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Türlerin yayılışı ile ilgili son yıllarda yapılmış güncel çok az bilgiye ulaşılabilmektedir. Genetik çeşitlilik çalışmaları ise yoktur. Bundan dolayı, bu proje çalışması ile Türkiye’de bulunan doğal söğüt türlerinin evrimsel ilişkilerini ve ticari öneme sahip türlerine ait gen kaynaklarının genetik karakterizasyonlarını ortaya konması sağlanmış ve dolayısıyla bu cinste ziraat, orman ve eczacılık alanlarında yapılacak olan tür teşhisi, gen kaynaklarını koruma ve ıslah çalışmaları için çok değerli olan ve bulunmayan bilgiler üretilmiştir.

1.1 Literatüre özeti

Söğüt cinsi, sulak yerlerde yetişen yaprak döken diyoyik ağaç ve çalı formunda bitkileri içerir. Çiçek ve yapraklarının farklı zamanlarda gelişiminden dolayı bütün karakterlerin tek bir bitkide gözlenmesini zorlaştırmaktadır (Arıhan ve Güvenç, 2009). Az sayıda türü orman ağacı olup, yine çok az sayıda türü ekolojik olarak baskın türler basamağında yer alır. Bunlar diğer türlerin tercih etmediği uç alanlarda veya ekosistemdeki değişikliklerde öncü tür olarak yetişir. Bu öncü özellikleri pamuksu tüylerle donanımlı tohumlarının kolayca yayılması ve uç iklim koşullarına dayanıklı olmasından kaynaklanır (Davis, 1965). Özellikle sulak alanlarda veya dağlarda yaygındırlar. Söğütler, ışık ağaçları olup nem istekleri de fazladır. Dere, ırmak ve göl kıyılarında, sulak çayırarda yetişmeyi yeğler. durgun sudan zarar görmezler. Tohumları çok küçük, rüzgar ile hızlı dağılabilir ve nemli topraklar bulduğunda çabuk çimlenebilirler (Skvortsov, 1999). Skvortsov’a göre Rusya ve Avrupa’da yayılış gösteren bütün Söğüt türlerinin morfolojik karakterleri büyük çeşitlilik göstermektedir.

Söğüt türlerinde melezlenme oranı yüksektir (Argus, 1997). Melez türler tam olarak teşhis edilemediği için Söğütlerdeki taksonomi çalışmaları çok net değildir. Melezlenmenin ve introgresyonun (türler arası gen akışı) söğüt türlerinde çok görülmesinden kaynaklanan, taksonomideki bu sorunları çözmek zordur (Karrenberg vd., 2002). Bütün bitkilerin % 30-80’ninin melezlenme olaylarından kaynaklandığı düşünülmektedir ve böylece melez zonları bitki evriminde önemli rol oynamaktadır (Campbell vd., 1997). Aynı habitatı paylaşmak bir çok söğüt türünün melez zonlar oluşturmaya sebep olmuştur. Yapılan bir çalışmada söğüt türlerinden *S. eriocephala* ve *S. sericea* aynı alanı paylaşarak melez zonlar oluşturduğu tespit edilmiştir (Fritz vd., 1994).

Melez Söğüt türlerinin çekirdek DNA içerikleri genellikle kararlı iken, morfolojileri değişiklik göstermektedir. Melez türler morfolojik özelliklerini iki ebeveyninden birden almakta, melez fenotipleri bir ebeveyn özelliği baskın gelmektedir (Thibault, 1998). Hardig vd. (2010) Söğüt

cinsinde melezlerin kloroplast haplotiplerinin dağılımlarına etkisi üzerine bir çalışma yaparak melezlerin söğütler üzerindeki etkisini net bir şekilde ortaya koymuştur.

1.1.1 Söğütlerin ekonomik değeri

Yüzlerce yıldır halk tarafından kullanılan ve bugün çağdaş fitoterapi tarafından da kullanımı kabul edilmekte olan ilaçlar arasında söğüt kabuğundan elde edilen 'cortex salicis', aspirinin daha az etkili bir öncüsü olan salisinin özgün kaynağıdır (Baytop, 1997). Ağaç kabuklarında bulunan salisilin, salisilik asit molekülüne dönüşerek aspirinin ham maddesi olan asetil salisilik asitin keşfine öncü olmuştur. Bugün yapılan araştırmalar ışığında bu molekülün antikanser özelliği olduğu da bilinmektedir (Mahdi vd., 2006).

Ağaçlardaki ağır metal birikimine dayalı fitoremediasyon çalışmalarında söğüt türlerinin yüksek potansiyeli dikkat çekmektedir (Pulford ve Watson, 2002). Sekiz söğüt türünde yapılan araştırmada Cu ve Zn konsantrasyonlarının çok fazla değiştiği dokular arası metal birikiminin topraktaki metal oranını değiştirdiği ifade edilmiştir (Nissen ve Lepp, 1997). Sander ve Ericsson (1998) 'ın yaptığı çalışmada ise *Salix viminalis*'da bulunan Zn, Cu, Ni ve Cd miktarlarının boyla beraber arttığını gözlemlenmiştir. Kontaminasyonun çok olduğu toprakların artması söğüt gibi hızlı yetişen ve vejetatif olarak üretilen ağaçlar ile bölgenin iyileştirilmesi çalışmaları giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Söğüt türleri erozyon ve rüzgar perdesi, su bentlerinin ve hendeklerin tahkimi, sepet yapımı, çit yapımı, yakacak, selüloz ve kağıt, süs bitkisi, kriket sopası ve küçük el aletlerinin yapımı ve hayvanlar için yem olarak kullanılması gibi birçok amaç için değerlendirilmektedir (Tunçtaner, 1990). Aynı zamanda bu türler mobilya yapımında da kullanılmaktadır (Andleeb vd., 2011).

Diğer ve önemli bir ekonomik değeri ise söğütler dünya genelinde enerji projelerinde en çok kullanılan türler olmasıdır (Vermerris, 2008). Söğüt klonlarının plantasyonu ile elde edilen verileri abiyotik ve biyotik faktörlere dirençli olan genleri belirlemekte uzun vadede biyoenerji çalışmalarında kullanılabilirliğini artırmaktadır (Aravanopoulos vd., 1999). Bugün, yenilenebilir biyoenerji kaynakları olarak orman biyoteknolojisi çalışmalarında hızlı büyümesi. yaygın olarak bulunması, kontrollü su ve gübre kullanımı olması sebebiyle bazı söğüt klonları tercih edilmektedir (Herrera, 2006). Söğüt klonlarının böcek ve hastalıklara dirençli olma. strese dayanıklı olma. ilk yıl kesiminden sonra hızlı büyüme özelliklerine sahip olmaları biyoyakıt olarak seçilmesini sağlamaktadır. Bu ise türlerin doğru teşhisi, seçimi ve genetik karakterisizasyonu ile mümkün olmaktadır (Smaliukas vd., 2007). Örneğin Przyborowski'in

(2010) *Salix viminalis* üzerinde yapmış olduğu çalışmalar genetik çeşitliliği çok yüksek olan bu türün biyoenerji ürünü olarak uygunluğunu ortaya koymaktadır.

1.1.2 Söğütlerin taksonomisi

Salicaceae familyası *Populus* ve *Salix* olmak üzere iki cinsi içermektedir (Cronquist, 1981). Bazı kaynaklar bu familyaya farklı bir cins olan *Chosenia* veya *Toisusu* ekleyebilmektedir. Fakat söğüt türlerinden sadece birkaç farklı özellik ihtiva ettiği için bu grupları alt cins olarak değerlendirmek daha doğru olacağı düşünülmüştür (Skvortsov, 1999). İlk olarak Linnaeus tarafından 1753 yılında 23 *Salix* türü yayınlanmış, hayatı boyunca bu sayı 31'e çıkmıştır (Skvortsov, 1999). Tarihte Söğüt cinsi, yaprak karakterlerine, çiçek gelişimlerine, ovaryum durumlarına, anter boyutlarına göre seksiyonlara ayrılmıştır (Argus, 1997). Buradan elde edilen bilgiler ile Cordatae seksiyonu için polyploidi çalışmaları farklı araştırmacılar tarafından devam ettirilmiştir (Skvortsov, 1999). Bugün Türkiye'deki Söğüt türleri alt cins ***Salix***, seksiyon *Humboltianae* Pax., seksiyon *Amygdalinae* W. Koch., seksiyon *Pantandrae* (Borrer) Schneider. seksiyon *Salix* seksiyon *Subalbae* Koidzumi ve Alt cins ***Vetrix*** Dumort., seksiyon *Hastatae* Kerner., seksiyon *Vetrix* Dumort., seksiyon *Vimen* Dumort., seksiyon *Canae* Kerner., seksiyon *Helix* Dumort ve seksiyon *Cheilophilae* Hao olacak şekilde 2 alt cins (Subg. *Salix* ve *Vetrix*), 11 seksiyon altında toplanmıştır (Davis, 1965). Bu sayı Türkiye'de olduğu tespit edilen yeni türlerin seksiyonları ile 13'e çıkmıştır (Skvortsov, 1999). Söğüt türlerinin ihtiva ettiği ikincil bileşenler taksonomik ayırım için kullanılmıştır (Meier vd.,1985). Yine de türlerin tanınması ve teşhis edilmesi zordur ve melezlerin varlığı yaygındır. 19. yüzyıl'da Avrupa'da melezlerin varlığının anlaşılması J.Scopoli tarafından sağlanmış ve türlerin teşhisinin ne kadar zor olduğunun altı çizilmiştir (Skvortsov,1999). Farklı ekolojik toleranslarından dolayı bazı melezler üzerinde introgresyon ve geri çaprazlama çalışmaları ile genetik çeşitliliklerinin saptanması sağlanmıştır (Hardig vd., 2000). Yapılan diğer genetik çeşitliliği çalışmalarında bazı söğüt klonlarındaki heterozigotluğun yakın akrabası olan *Populus* türlerine göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (Aravanopoulos vd., 1999).

1.1.3 Türkiye'de söğüt cinsi

Eski kayıtlara göre, dünyada söğüt 300 tür ile yayılış gösteren zengin bir cinstir (Argus,1997). Yeni kaynaklar ışığında ise Söğüt cinsinde bulunan türler. tüm dünyada yetiştirilir ve yaklaşık 500 türle temsil edilir (Hardig vd., 2010). Avrupa için bu sayı 65 iken (Argus, 1997). Tablo

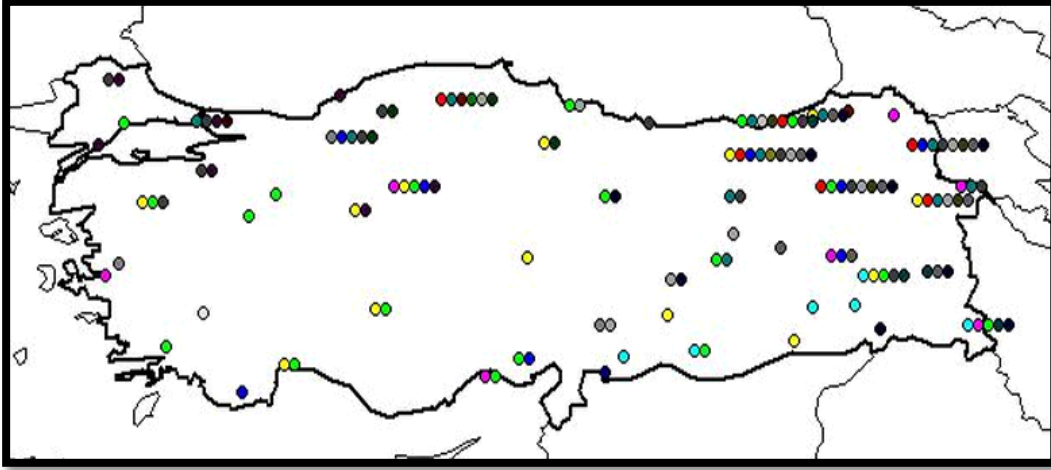
1'de görüldüğü üzere Türkiye'de ise doğal olarak 27 tür bulunur (Terzioğlu vd., 2014). Bazı söğüt türleri Türkiye'deki yayılış alanları elemanı olarak nitelendirildikleri flora bölgesi ile uygunluk içerisindeyken (İran-Turan elemanı olarak nitelenen *Salix aegyptiaca* sadece Doğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermesi gibi). bir kısmı bu özelliği göstermezler (örneğin Avrupa- Sibiryaya elemanı olarak nitelendirilen *Salix fragilis* in Türkiye'deki yayılış alanı Öksin sahası ile sınırlı kalmayıp, Doğu Anadolu Bölgesi'ne de taşar) (Avcı, 1999).

Türkiye Söğütlerinden 4 tanesi endemiktir; *S. trabzonica*. *Salix purpurea* subsp. *leucodermis* (Erguvani söğüt). *Salix rizeensis* (Rize söğüdü) (Skvortsov ve Edmonson, 1970; Donner, 1990; Güner ve Zielinski, 1993; Güner, 2000). Diğer bir endemik türün türün varlığı Adana'da yeni keşfedilmiştir; *Salix anatolica* (Zielinski & Tomaszewski, 2008) . Diğerleri ise Tablo 1 'de verilmiştir.

Tablo 1 : Türkiye'de doğal olarak bulunan söğüt türleri (Baytop, 1997).

Numara	Salix türleri	Yazar
1	<i>Salix acmophylla</i>	Boiss.
2	<i>Salix triandra</i> subsp. <i>triandra</i>	L.
	<i>Salix triandra</i> subsp. <i>bornmuelleri</i>	(Hauskn.) A. Skv.
3	<i>S. pentandra</i>	L.
4	<i>S. pentandroides</i>	A. Skv
5	<i>S. alba</i>	L.
6	<i>S. excelsa</i>	J.F. Gmelin
7	<i>S. fragilis</i>	L.
8	<i>S. babylonica</i>	L.
9	<i>S. apoda</i>	Trautv.
10	<i>S. trabzonica</i> *	A. S.kv.
11	<i>S. myrsinifolia</i>	Salisb.
12	<i>S. caucasica</i>	Andersson
13	<i>S. pedicellata</i> subsp. <i>pedicellata</i>	Desf.
14	<i>S. caprea</i>	L.
15	<i>S. aegyptiaca</i>	L.
16	<i>S. cinerea</i>	L.
17	<i>S. pseudomedemii</i>	E. Wolf
18	<i>S. pseudodepressa</i>	A. Skv
19	<i>S. viminalis</i>	L.
20	<i>S. armenorossica</i>	A. Skv.
21	<i>S. elaeagnos</i>	Scop.
22	<i>S. elbursensis</i>	Boiss.
23	<i>S. amplexicaulis</i>	Bory & Chaub
24	<i>S. rizeensis</i> *	A. Güner et J. Zielinski
25	<i>S. purpurea</i> subsp. <i>leucodermis</i> *	L.
26	<i>S. wilhelmsiana</i>	Bieb.
27	<i>S. anatolica</i> *	J.Zielinski & D. Tomaszewski

*Endemik türler



Şekil 1 : Türkiye’de doğal olarak bulunan söğüt türlerine ait harita. Her renteki yuvarlak farklı bir türü temsil etmektedir. (<http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php?sayfa=karsilastir>).

Türkiye’de söğüt açısından en zengin bölge, ülkemizde mevcut olan 27 türün 23’ünü barındıran Karadeniz Bölgesi’dir ve bunu 15 türle Doğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Söğüt türleri bakımından en az çeşitliliğe sahip bölgemiz ise 6 türle Güneydoğu Anadolu Bölgesi’dir (Arıhan ve Güvenç, 2009). Türkiye ve dünya için yeni bir Söğüt türü olan *Salix rizeensis*. Güler ve Zielinski (2007) tarafından Rize’de tanımlanmış ve türle ilgili morfolojik araştırmalar Terzioğlu vd. (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu türün yanı sıra *S. myrsinifolia* Salisb., Kuzey Anadolu’dan *S. purpurea* subsp. *leucodermis* Yalt. floranın 11. Cildine Türkiye florası için yeni türler olarak eklenmiştir (Zielinski ve Güner, 2000) (Şekil 1).

Türkiye’de söğüt cinsi ile ilgili eksik bilgileri tamamlamak adına Ankara çevresinde yetişen söğüt türleri incelenmiş ve morfolojik özellikleri ile 9 tür belirlenmiştir. Aynı türler üzerinde yapılan odun anatomisi çalışmalarından da net bir ayırım gözlenememiştir (Arıhan ve Güvenç, 2011). Ayrıca bu cinsin yaprak morfolojisinin diğer bir familya olan Lauraceae familyasına çok fazla benzemesi familya düzeyinde sorunları beraberinde getirmiştir ve bunu ortadan kaldırmak için yaprak damarlanması üzerine morfometrik analiz çalışmaları da denenmiştir (Melanie, 2002).

Türkiye’deki Söğüt cinsi için daha önceden yapılmış moleküler bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu proje ile önemli bir eksiklik olarak görülen Türkiye söğütlerinin moleküler biyoloji yöntemleriyle soy ağaçlarının çıkarılması ve aralarındaki genetik ilişkilerin ortaya konması sağlanmıştır.

1.1.4 Moleküler çalışmalar

Söğüt türü kromozomu küçük ve tek tiptir. Familyanın diğerlerinde de olduğu gibi kromozom sayısı $n=19$ 'dur. Bazen kromozom fragmentasyonuna bağlı olarak bu sayı 22 olarak geçebilmektedir. Suda ve Argus (1968) Söğüt türlerini kromozom sayılarına göre 6 seksiyona ayırmıştır. Söğütlerin poliploidi seviyeleri $3x$ 'den $12x$ 'e kadar değişebilmektedir (Argus, 1997). Morfolojik karakterler cinsteki türleri ayırt etmekte yeterli olmadığı için moleküler belirteçler kullanılmaktadır (Saarela vd., 2007). Söğütler cinsinin sadece Longifolia seksiyonunun üzerine Brunsfeld vd. (1991) tarafından filogenetik analizler yapılmıştır. Türler arası infragenerik analizler ise dünyada ilk Argus (1997) tarafından gerçekleştirilmiştir. Azuma vd. (2000) söğüt cinsinin kloroplast *rbcL* nükleotid bölgesine bağlı filogenetik ilişkileri çalışmışlardır. Melezlenme, introgresyon ve filogenetik ilişkileri ortaya koymak üzere Hardig vd. (2010) kloroplast *matK* bölgesini ve rDNA *ITS* bölgelerini çoğaltmışlardır. Dünya'da *Salicaceae* familyasında çekirdek ribozomal *ITS* bölgesine bağlı ayrıca moleküler çalışmalar da yapılmış. seksiyonların ayrılması için anlamlı veriler elde edilmiştir (Leskinen ve Alström-Rapaport, 1999; Abdollahzadeh vd., 2011).

Son yıllarda bitki türlerindeki mevcut genetik çeşitlilik, moleküler çalışmalarla beraber genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik düzeylerde de incelenmektedir. Bu varyasyonların belirlenmesi ve korunması için moleküler markörlerin kullanılması önem teşkil etmektedir. Model olarak kullanılan bitkilerin dışında kalan söğüt gibi türlerde etkin ve seri araştırmaya olanak sağlayan moleküler belirteç sistemlerinin kullanılması oldukça önemlidir. DNA parmak izi tanısında tercih edilen SSR markörler, söğütte; çeşit tayini, ebeveyn analizi, genetik çeşitlilik ve genetik haritalama gibi çalışmalarda kullanılmıştır. Genotipleme araştırmalarının yanında, kodominatlık avantajından dolayı ebeveyn ve melez tanısında, genomda korunan dizilerin baz almasından dolayı ise bitkilerin genetik evrim çalışmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerdeki ekonomik özellikleri (tane rengi, hastalıklara dayanıklılık gibi) kontrol eden genlerin klonlanması amacı ile yürütülen genetik haritalama çalışmalarında ve genom projelerinde SSR belirteçlerin önemi detaylı şekilde geçmiş çalışmalarda tartışılmıştır (Fischer vd., 2004; Welter vd., 2007; Akkurt vd., 1998; Velasco vd., 2007). Daha önce bu belirteçlerle ilgili söğüt çalışmaları Türkiye' de yapılmamıştır. Farklı hedeflenen amaçlara yönelik SSR markörler kullanılarak dünyada söğütte gerçekleştirilen önemli çalışmalar bulunmaktadır. Birçok söğüt türünde popülasyon çalışmaları için mikrosatellit belirteçlerin geliştirilmiş ve bunlar daha sonraki çalışmalar için öncü olmuştur (Lian vd., 2001; Barker vd., 2003). Hanley vd. (2002). AFLP ve mikrosatellit belirteçlerini kullanılarak *Salix viminalis* Söğüt türünün genetik bağlantı haritasını oluşturmuşlardır. Lian vd. (2003). *S. reinii*

populasyonunun genetik yapısı ve üreme dinamiğini araştırmak; Stamati vd. (2003). *S. lanata*, *S. lapponum* ve *S. herbacea* koruma stratejileri hakkında bilgilendirme sağlamak; Lin vd. (2009) *S. eriocephala* ve *S. purpurea* türlerinde genetik çeşitlilik ve genetik yapı karşılaştırmak; Puschenreiter vd. (2010). *Salix caprea* türünde. genetik yapı ve Zn / Cd birikimi kapasitesi üzerinde uzun vadeli ağır metal kirlenmelerinin potansiyel seçici etkilerini ortaya koymak için çeşitli mikrosatellit bölgelerinin genotiplerini analiz etmişler ve genetik tanımlama yapmışlardır. Sochor vd. (2013), SSR ve AFLP belirteçleri beraber kullanarak. habitat parçalanmasından dolayı tehlike altında olan *Salix daphnoides*'ın ekolojik ve demografik olarak karakterize edilen populasyonlarının genetik özelliklerini ortaya çıkarmışlar ve biyotop, cinsiyet, yaş, nüfus ve genetik yapısı arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Lauron-Moreau vd. (2013). dizi analiz tamamlanan kavak genomuna göre. 24 mikrosatellit belirteçlerini yerli Kuzey Amerika Söğüt türleri (*S. amygdaloides*, *S. discolor*, *S. eriocephala*, *S. interior* ve *S. nigra*) üzerinde test etmişler ve biyokütle açısından ekonomik önemi olan *S. eriocephala* türünde 11 SSR belirteç yapılan çalışma sonucu bu türün potansiyelini teyit etmişlerdir. Böylece bu mikrosatellit belirteçlerinin Kuzey Amerika söğüt türlerin genetik çeşitliliğini değerlendirmede kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir.

2. ÇALIŞMANIN AMACI

Son zamanlarda fark edilmiştir ki sadece morfolojik ve anatomik karakterler bu cins içinde yer alan türlerin taksonomik tayini ve cins içinde yer alan diğer türlerle olan evrimsel ilişkisini tayin etmek için yeterli olamamaktadır. Bu yüzden özellikle son 20 yıldır kloroplast ve çekirdek DNA'da yer alan çok sayıda farklı bölge, PCR metodu kullanılarak çoğaltılmakta ve türlerin filogenetik ilişkisi bitkilerin genetik materyali esas alınarak ortaya konmaktadır. Morfolojik, anatomik ve biyokimyasal olarak değerlendirilen örnekler, genetik materyal bakımından da değerlendirilmekte ve ortaya daha tutarlı bir sonuç çıkarılmaya çalışılmaktadır. Bu proje kapsamında morfolojik olarak çok benzer olan, farklı bölgelerinde yayılış gösteren Söğüt türlerinin moleküler genetik teknikleri kullanılarak çalışılması tür ayrışması ve söğüt gen kaynaklarını koruma ve kullanıma yönelik çalışma ve programlar için önemli veriler sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun yanında Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nca seçilen söğüt klonları Ankara Behiçbey Fidanlığı'nda bulunmakla beraber, ancak bu materyallere dair hiçbir genetik bilgi bulunmamaktadır ve devam eden çalışmalar da genetik veri eksikliğinden programsız ve rastgele yapılmak zorunda kalmaktadır. Yeterli genetik ve ıslaha yönelik araştırmalar olmadığı için bu klonlar biyokütle üretiminde de kullanılamamaktadır. Söğütlerle ilgili Türkiye'de çok az sayıda çalışma vardır. Türlerin yayılışı ile ilgili son yıllarda yapılmış güncel çok az bilgiye ulaşılabilmektedir. Genetik çeşitlilik çalışmaları ise yoktur. Bundan dolayı, bu proje çalışması ile Türkiye'de bulunan doğal söğüt türlerinin evrimsel ilişkilerini ve ticari öneme sahip türlerine ait gen kaynaklarının genetik karakterizasyonlarını ortaya konması amacıyla ve dolayısıyla bu cinste ziraat, orman, eczacılık gibi diğer alanlarda yapılacak tür teşhisi, gen kaynaklarını koruma ve ıslah çalışmalarının için çok değerli olan ve bulunmayan bilgilerin üretilmesi amaçlanmıştır.

Başından itibaren projenin iki temel amacı vardı: 1) Moleküler biyoloji yöntemleriyle kloroplast (*matK*, *rbcl*, tRNA) ve çekirdek genomundaki (rDNA ITS) evrimsel açıdan korunan bölgeleri çalışarak ülkemizde doğal olarak bulunan Söğüt türlerinin filogenetiğini (soyağacını) ortaya koymak (*İş Paketi-1*) ve 2) Moleküler markörlerle (SSR markörler) yardımıyla Türkiye' de doğal olarak yetişen ve ekonomik öneme sahip *Salix alba* ve *S. excelsa*'nın gen kaynaklarının belirlenmesi, kullanımı ve genetik çeşitliliğinin korunmasına katkıda bulunacak genetik bilgiyi üretmek (*İş Paketi-2*).

Bunlara ek olarak yapılan *iş paketi 2* için yapılan arazi çalışmalarında görülmüştür ki, her nehir genelde tek bir öncü *Salix* türü ihtiva etmektedir. Arazi yapılan nehirlerde doğal olarak yetişen ve ekonomik öneme sahip *Salix alba* ve *S. excelsa*'nın arasında morfolojik fark çok az olduğu için morfolojik ayırmda problemler çıkmış, bu iki türün daha net tayin edilmesi için

proje kapsamında nehir sistemlerinde tür teŖhisine yönelik ilave alıŖma yapılmıŖtır. Bu alıŖma *İŖ Paketi-1*'e ek olarak dahil edilmiŖtir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Örnekleme ve bitki materyali (İş paketi-1)

Türkiye Söğütlerinin moleküler filogenetik çalışmasında. arazide tür teşhisini kolaylaştırmak adına daha önceden Herbaryumlar (Herbarium Turcicum-ANK, Gazi Üniversitesi Herbariyumu-GAZI, Hacettepe Üniversitesi Herbariyumu, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbariyumu, Ankara Orman Müdürlüğü Herbariyumu) ziyaret edilmiştir. Filogenetik çalışmalar için ayrıca Davis (1965)'in Türkiye Florası kitabına göre her Söğüt türü için coğrafik bölgeler tespit edilmiş ve belirlenen nehir havzalarından Aras, Çoruh, Kızılırmak, Susurluk, Aksu, Göksu, Seyhan, Ceyhan ve Fırat olmak üzere arazi çalışmaları yapılmıştır. Literatüre göre daha önceden Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren söğüt türleri Şekil 1 de gösterilirken. bu proje ile gidilen arazi çalışmalarından elde edilen Söğüt türlerinin haritası Şekil 2 'da verilmiştir. Her tür için en az 5 birey ve klon ve akrabalık yapısını bozmak için en az 200 metre aralık veya daha uzak ile toplanmasına dikkat edilmiştir. Arazi çalışmaları esnasından bulunan her tür için ayrıca pres kullanılarak yaprak. çiçek ve gövde morfolojilerini belirlemek üzere örnekler muhafaza edilmiş, daha sonra Davis (1965)'in Türkiye florası 7 cildindeki söğüt anahtarına göre teşhisleri yapılmıştır. Sıkıntıya düşülen durumlarda Ankara ve Gazi Üniversitesi Herbaryumlarına gidilerek karşılaştırmalı çalışmaları yapılmıştır. Edinilemeyen bazı türler için (*S.myrsinifolia*, *S.rizeensis* ve *S.pseudodepressa*) herbaryumlardan yaprak materyali sağlanmıştır. Bunların sonunda projede Türkiye'de doğal olarak yetişen 24 farklı *Salix* türü ve bir melez türe (*S.albaxfragilis*) ulaşılmıştır (Tablo 2). Toplanan örnekler silika jellerde muhafaza edilmiş ve nemlenmeleri önlenmiştir. Bunlar içerisinden DNA miktarları yüksek olan örnekler üzerinden dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi yapılacak birey sayısı 126 olarak belirlenmiştir. Ancak Söğüt türlerinde fenolik maddelerin birikimine bağlı olarak DNA'nın zor elde edilmesinden kaynaklanan. her gen bölgesi her örnekte çoğaltılamamıştır. Her gen bölgesi için dizilenen örnek sayısı farklıdır.



Şekil 2 : Türkiye genelinde yapılan arazi çalışmalarında örneklenen söğüt türlerinin lokasyonlarını gösteren harita (İş paketi-1)

Tablo 2 : Ülkemizde doğal olarak bulunan söğüt türlerinin filogenetiği çalışmaları (İş Paketi-1) için elde edilen türler ve yapılan arazi örneklemeleri

No	Seksiyon	Altcins	Söğüt Türleri	Örnekleme yapılan yerler (Belde/il)
1	<i>Humboltianae Pax</i>	<i>Salix</i>	<i>S.acmophylla</i>	Asma Su Çeken Köprü/Batman, Birecik Halfeti/ Şanlıurfa, Birecik-Ziyaret Köyü/Şanlıurfa
2	<i>Amygdalinae W. Koch</i>	<i>Salix</i>	<i>S. triandra</i> subsp. <i>triandra</i>	Ihlara Vadisi /Aksaray, Çerkeş Orman Fidanlığı(Göletler)/ Çankırı.Üçköy/Çorum, Ardıçlı-Niksar/Tokat, Afyon, Uzundere vadisi/Rize, Tortum yol kenarı söğütlük/Erzurum,Tosya- Beşçam-Deringöz/Amasya
2	<i>Amygdalinae W. Koch</i>	<i>Salix</i>	<i>S.triandra</i> subsp. <i>Bornmuelleri</i>	Çeltekk -Tersakan /Amasya
3	<i>Pentadrae (Borrer) Schneider</i>	<i>Salix</i>	<i>S. pentandroides</i>	Çarşamba-Melikköy/Samsun, Çoruh-Bağbaşı/Erzurum
4	<i>Salix</i>	<i>Salix</i>	<i>S. alba</i>	Akyazı-vakıflar/Sakarya. Konya, Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı/Ankara, Çoruh Yavuz mah. Köprüsü yol kenarı-Çoruh/Artvin, Aksu dere kenarı/Antalya, İspir/Erzurum, Ürgüp/Aksaray. Ihlara Vadisi/Aksaray, Kurtboğazı barajı altı/Ankara, Ilgın-Çatak-Çitdere/Konya
5	<i>Salix</i>	<i>Salix</i>	<i>S. excelsa</i>	Çarşamba-Çelikli. Şenyurt/ Samsun, Kışlacık Köyü Yol Çıkışı, Kırklar/ Kırklareli, Ovacık Köyü Öncesi Yol kenarı/ Gebze, Derkapı-Yusufeli/Artvin
6	<i>Salix</i>	<i>Salix</i>	<i>S. fragilis</i>	Çay/Afyon,Beynam Ormanı/Ankara, Akşehir/Konya
**	<i>Salix</i>	<i>Salix</i>	<i>S.albaxfragilis</i>	Behiçbey Fidanlığı Ormanı/Ankara
7	<i>Subalbae Koidzumi</i>	<i>Salix</i>	<i>S. babylonica</i>	Kalecik/ Ankara, Yaylacık Köyü-Göynücek/Amasya,Tokat. Çoruh Yaylacık Çıkışı, Yusufeli çıkışı/Artvin, Ihlara Vadisi/Aksaray
8	<i>Hastatae Kerner</i>	<i>Vetrix</i>	<i>S. apoda</i>	Ladik/ Samsun
9	<i>Nigricantes</i>	<i>Vetrix</i>	<i>S.myrsinifolia*</i>	İlgaz/Kastamonu
10	<i>Vetrix Dumort</i>	<i>Vetrix</i>	<i>S. caucasica</i>	Yokuşlu köyü/Artvin. Çoruh – Sırakonaklar-İncirli/Artvin, İlgaz/Kastamonu, Ayder/Rize
11	<i>Vetrix Dumort</i>	<i>Vetrix</i>	<i>S. pedicellata</i>	Göksu-Ermenek Çayı/Karaman

			subsp. <i>pedicellata</i>	
12	<i>Vetrix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. caprea</i>	Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı/Ankara, Kastamonu Çankırı ilsinırı, Bostan/Kastamonu, Kafkasör Yaylası/ Artvin
13	<i>Vetrix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S.aegyptiaca</i>	Bahçesaray/Van, Tatvan/Bitlis
14	<i>Vetrix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. cinerea</i>	Akyazı Gebeş/Sakarya, Çubuk Karagöl/ Ankara, Uzungöl/ Rize. Çoruh Bağbaşı/Artvin
15	<i>Vetrix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. pseudomedemii</i>	Beynam Ormanı /Ankara, Zile/Tokat
16	<i>Vetrix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S.pseudodepressa*</i>	Sarıkamış/Kars, GümüşDamla Köyü/Bayburt
17	<i>Vimen</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S.viminalis</i>	Nehirbaşı/Erzurum
18	<i>Vimen</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. armenorossica</i>	Oltu/ Erzurum, Bağbaşı-Çoruh/Erzurum
19	<i>Canae</i> Kerner	<i>Vetrix</i>	<i>S. elaeagnos</i>	Ilgaz/Çankırı,Tosya-Beşçam/Kastamonu, Ladik/Samsun
20	<i>Helix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. elbursensis</i>	Çoruh-Alanbaşı/Artvin
21	<i>Helix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. amplexicaulis</i>	Kızılcahamam/Soğuksu Milli Parkı/Ankara, Çubuk Karagöl/Ankara, Ilgaz kuzey yamacı/Kastamonu, Ilgaz dağ girişi/Kastamonu
22	<i>Helix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S.rizeensis*</i>	İkizdere/Rize
23	<i>Helix</i> Dumort	<i>Vetrix</i>	<i>S. purpurea</i> subsp. <i>Leucodermis</i>	Köyceğiz-Dana deresi/Muğla, Gökçeova Göl Kıyısı/ Muğla
24	<i>Cheilophilae</i>	<i>Vetrix</i>	<i>S.wilhelmsiana</i>	Tortum/Erzurum, Kars-Erzurum Yolu

*Herbarium Örnekleri

**Projeye dahil edilen Melez Söğüt

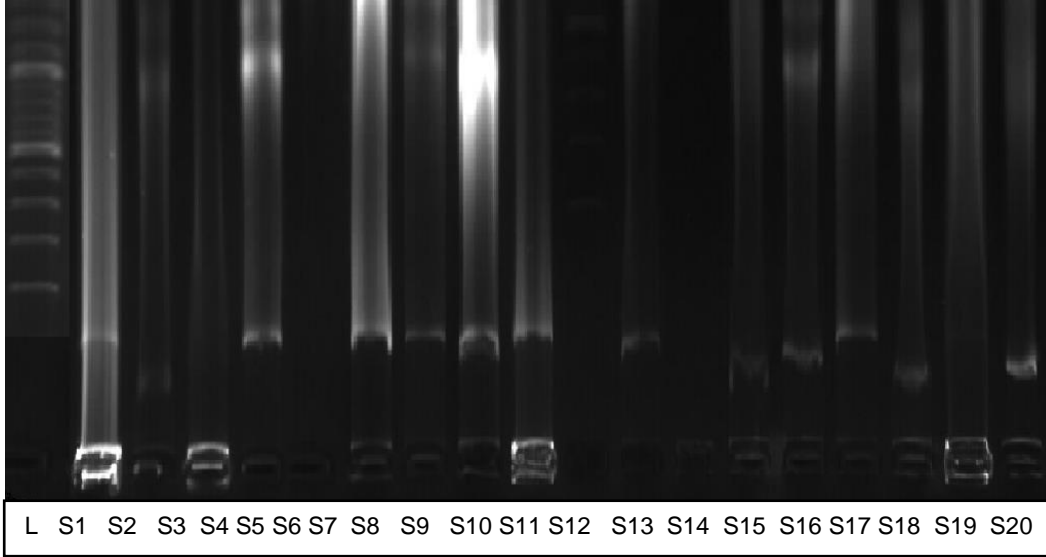
3.2 DNA izolasyonu (İş paketi 1-2)

Labaratuvar ortamına getirildiğinde örnekler sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler etiketlenerek ependorf tüplerde -20 °C saklanmıştır. Yapraftan DNA izolasyonu için. arazi çalışmalarında elde edilen türlerde Doyle ve Doyle'un (1990) CTAB metodundan yararlanılarak yeni bir yöntem geliştirilmiştir ve detayları :

(1) Her bir türe ait 0.1 gram taze yaprak otoklavlanarak steril edilmiş havanlara konularak üzerine mekanik parçalanmayı kolaylaştırıcı 1000 µl özütleme tamponu (CTAB-Cetil Trimetil Ammonio Bromuro) ilave edilmesi,

- (2) Oluşan karışım homojen yeşil bir görünüm alana kadar havanda ezildikten sonra 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine konularak üzerine tekrar 700 µl CTAB ve 200 µl β-merkapt-etanol ilave edilmesi,
- (3) İçerisinde ezilen yaprak metaryalinin bulunduğu eppendorf tüpler önceden 65 °C'ye kadar ısıtılmış su banyosunda 30 dakika bekletilmesi,
- (4) Daha sonra 15000rpm +4 °C'de 15 dakika boyunca santrifuj edilmesi,
- (5) Alınan süpernatant yeni bir tüpe aktararak 0.8V Fenol : Kloroform: İzamil alkol (25:24:1) eklenmesi (Eğer istenilen berraklık sağlanmaz ise Fenol ile yıkama aşaması bir kaç kere tekrarlanması),
- (6) Süpernatant yeni bir tüpe alınarak 0.8V kloroform IAA(24:1) eklenip. hafifçe karıştırılması,
- (7) 15000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifuj edilmesi,
- (8) Süpernatant alınması ve 0.7-1V izopropanol eklenip ve karıştırılması ve çözünen DNA alkol ile görülür hale getirilmesi,
- (9) -20 °C'de 1 gün (veya -80 °C' de 2 saat) bekleyen örneklerin 13000 rpm +4 °C'de 8 dakika santrifuj yapılması,
- (10) Pellet 500ml %70'lik etanol ile yıkanması,
- (11) Süpernatant atılıp pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılması. sonra DNA'yı kurutmak amacı ile tüpler oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kadar bekletilmesi,
- (12)DNA' nın kurduğundan emin olunduktan sonra her bir örnek 80-90 µl TE tamponunda (10 mM Tris. 1 mM EDTA pH 8.0) çözülmesi ve elde edilen stok DNA örnekleri uzun vadede kullanım için -80 °C' de saklanması,
- (13)Daha sonra elde edilen DNA miktarları fluorometrik yöntemle belirleyerek 10 ng/ µl'ye seyreltilmesi,
- (14) DNA kalite ve miktar ölçümleri amacı ile %0. 8' lik agaroz jel ve Thermo NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific Inc. NanoDrop 2000 Spectrophotometer Version 1.4.1) kullanılarak ölçülmesi şeklindedir.

DNA izolasyonu sonunda DNA miktarları 10-20 ng/µl (*iş paketi-1*) ve 30-40 ng/µl (*iş paketi-2*) ayarlanmıştır.



Şekil 3: İzole edilen 19 söğüt bireyine ait DNA'ların %8'lik agaroz jelde yürütülmesi. Soldan ilk kuyucuk markör (Referans) DNA'yı, markör DNA'dan soldan sağa sırasıyla kuyucuklar 19 örnek DNA'ları temsil etmektedir.

3.3 Söğüt türlerinin filogenetiğini (soyağacını) Moleküler yöntemlerle (kloroplast DNA *matK*, *rbcl*, tRNA ve çekirdek rDNA ITS) ortaya koyma çalışmaları (İş paketi-1)

Kodlanmayan kloroplast DNA bölgeleri yüksek derecede mutasyon göstermektedir. Bundan dolayı evrimsel ilişki analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Taberlet *vd.*, 1991). Kloroplast DNA' sında bulunan ve kodlanmayan bölgelerden bir tanesi tRNA (*trnT-trnF*) dir ve familia altı filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde tercih edilmektedir (Taberlet *vd.*, 1991; Kelchner, 2000). Bu bölge *trnL* intronik geni ve buna bağlı iki yan IGS (Inter genic spacer) bölgesinden (*trnT-L* ve *trnL-F*) oluşmuştur (Bakker *vd.*, 2000). Ayrıca bu bölge *trn a-b*, *trn c-d* ve *trn e-f* adında 3 zıt yönlü primer ile çoğaltılmıştır. Tablo 3 'te kloroplast *trnT-F* bölgesi ve diğer gen bölgeleri için kullanılacak olan evrensel primer çiftleri verilmiştir.

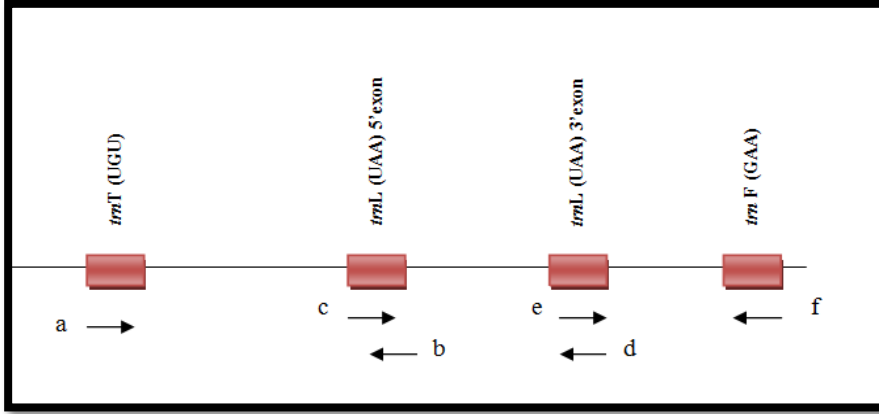
Bir kloroplast geni olan maturaz kinaz (*matK*) geni *trnK* (lizin tRNA) geninin intron bölgelerinin arasında bulunmaktadır. İkinci tip intron içeren (Hausner *vd.*, 2006) *trnK* geni open reading frame (ORF) olarak bilinen stop kodunu içermeyen DNA dizisinden oluşur ve RNA uç birleştirmede kullanılan maturaz proteinini kodlamakta görevlidir (Neuhaus ve Link, 1987; Wolfe *vd.*, 1992; Mort *vd.*, 2001). Bu *matK* geni ORF'lerin hızlı evrimleşmesinden dolayı bitki filogenisinde aile, cins ve tür seviyesinde yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir (Hilu ve Liang, 1997; Kelchner, 2002; Hausner *vd.*, 2006).

Kloroplast içerisinde yer alan *rbcL* geni PCR teknikleri kullanılarak iki primer ile Murakami vd. (1999) tarafından çoğaltılmıştır. *rbcL* geni tütündeki pozisyonu 307-1016 nükleotid uzunluğundadır ve açık tohumlular dahil birçok damarlı bitki de etkin olarak bulunmaktadır (Murakami vd., 1999). Projede Söğüt türlerinde *rbcL* gen bölgesini çoğaltmak amacı ile 1F (forward) ve 724 (reverse) olmak üzere *rbcL1* ve *rbcL2* adında iki primer kullanılmıştır (Tablo 3).

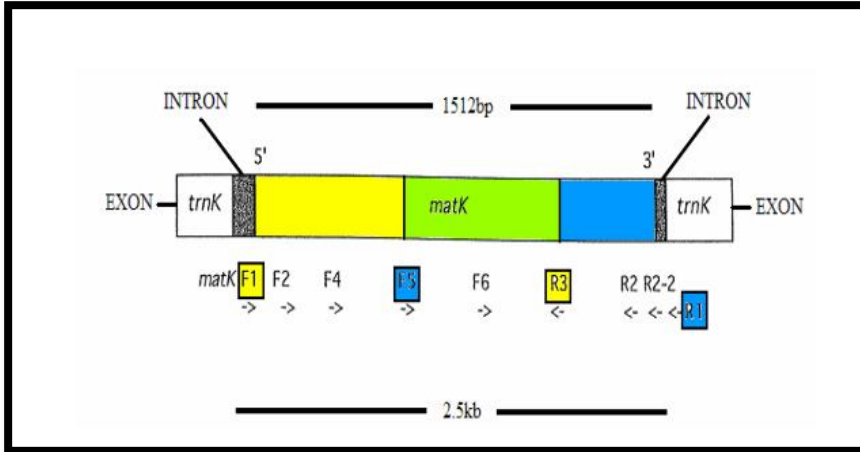
Ökaryotik ribosomal RNA geni rDNA olarak ifade edilmektedir ve kromozom üzerinde NOR adı verilen nükleer organize bölgesinde bulunmaktadır. Her bir gen bölgesi 18S (ribozomun küçük altbirimi), 5.8S ve 26S (büyük altbirim) genlerini içermektedir. 5.8S geninin her iki yanında bulunan kodlanmayan bölgelere 'internal transcribed spacer' (*ITS1* ve *ITS2*) bölgeleri denilmekte ve bu alanlar filogenetik çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çekirdek içinde yeni üretilmiş olan rRNA'lar 18S rRNA *ITS1*, 5.8S rRNA, *ITS2*, 26S rRNA bölgelerini içermekte ve olgunlaşma aşamasında rDNA *ITS* bölgeleri kodlanan bölgelerden uzaklaşmaktadır. 18S ve 26S gen bölgeleri familya veya daha yüksek taksonomik seviyelerdeki çalışmalar için tercih edilse de (Zimmer vd., 1989) *ITS* bölgesinin cins ve tür gibi daha alt taksonları çalışmak için daha uygun olduğu belirtilmektedir. Çünkü bu bölgelerin evrimleşme hızları kodlanan bölgelere oranla daha yüksektir (Suh vd., 1993). Bu bölgenin bir diğer avantajı ise bölgenin türler içinde çok korunması fakat türler arasında çok çeşitlilik göstermesidir (Hillis ve Dixon, 1991). Bu gibi özelliklerinden dolayı kloroplast *trn* T-F, *matK* ve *rbcL* ve çekirdek rDNA *ITS* genleri Türkiye söğüt türlerinin filogenetik ilişkilerinin ortaya konmasında seçilen gen bölgeleridir. Bu gen bölgelerine ait etraflı bilgi şematik çizimlerle ilgili şekillerde verilmiştir (Şekil 4, 5, 6, ve 7)

Tablo 3 : Söğüt türlerinde filogenetik ağaç için kullanılan primer nükleotid dizileri; Kloroplast *trnT-F*, *matK*, *rbcL* ve Çekirdek rDNA ITS.

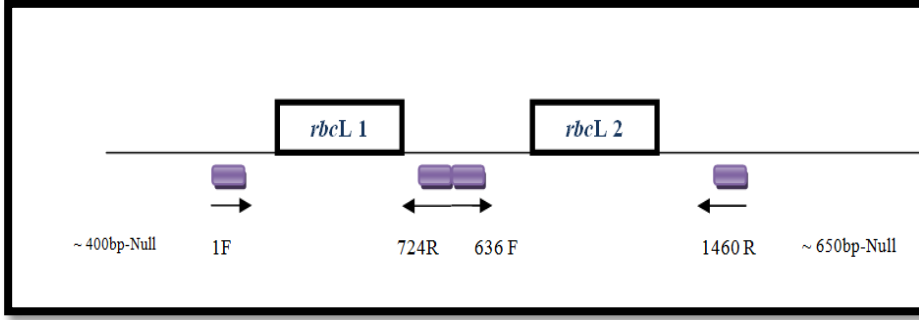
Çalışılan bölgeler	Primer dizinleri	Bölge uzunluğu
<i>trnT</i> IGS	<i>trna</i> (F) 5' CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT 3' <i>trnb</i> (R) 5' TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC 3'	~ 830 baz çifti
<i>trnL</i>	<i>trnc</i> (F) 5'CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3' <i>trnd</i> (R) 5'GGG GAT AGA GG ACT TGA AC 3'	~ 610 baz çifti
<i>trnL-F</i> IGS	<i>trne</i> (F) 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3' <i>trnf</i> (R) 5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3'	~ 320 baz çifti
<i>matK1</i>	F1 5' ACT GTA TCG CAC TAT GTA TCA 3' R3 5' GAT CCG CTG TGA TAA TGA GA 3'	~ 1200 baz çifti
<i>matK2</i>	F5 5' TGGAGYCCTTCTTGAGCG 3' R1 5' GAACTAGTCGGATGGAGTAG 3'	~ 720 baz çifti
<i>rbcL</i> 1	1F 5'-ATGTCACCACAAACAGAAAC-3' 724R 5'- TCGCATGTACCTGCAGTAGC -3'	~ 660 baz çifti
<i>rbcL</i> 2	636F 5'-GCGTTGGAGAGATCGTTTCT -3' 1460R 5'- CCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG-3	~ 840 baz çifti
<i>ITS</i>	ITSL-F 5'TCG TAA CAA GGT TTC CGT AGG TG3' ITS4-R 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	~ 650 baz çifti



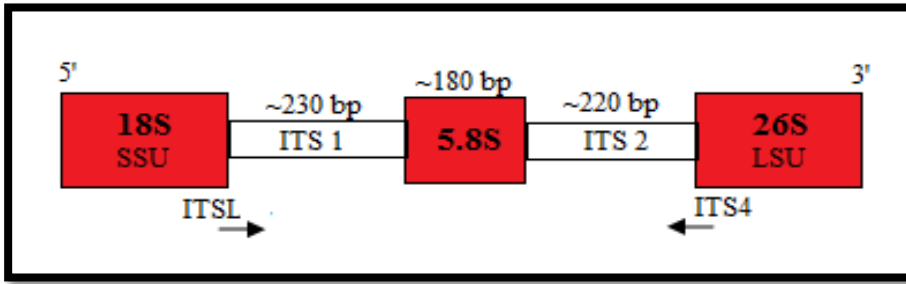
Şekil 4 : Klorplast *trnT-F* bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Taberlet vd., 1991).



Şekil 5 : Klorplast *matK* bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Li vd., 1997).



Şekil 6 :Kloroplast *rbcL* bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Savolainen vd., 2000).



Şekil 7:rDNA ITS bölgesinin görsel olarak konumu ve kullanılan primerler (Hsiao vd., 1995).

3.3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Nükleotid dizileri elde etmek için. ilgi duyulan gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Her gen bölgesi için optimize edilmiş program koşulları daha önceden belli olsa da, Türkiye *Salix* türleri için PCR koşulları ve reaksiyon içerikleri tekrar optimize edilmiştir. Tablo 4 'te her bölge veya primer için kullanılan PCR reaksiyon içerikleri görülmektedir. Ayrıca, Tablo 5 'te de PCR çoğaltılan gen bölgesi primerlerinin program koşulları verilmektedir.

Tablo 4 : Bütün gen bölgeleri (cpDNA *trn* T-F, *matK*, *rbcL* ve rDNA *ITS*) için PCR reaksiyonunda kullanılan optimum çözelti miktarları.

PCR Karışımı	<i>trnT-L</i> IGS	<i>trnL</i> intron	<i>trnL-F</i> IGS	<i>MatK1</i>	<i>MatK2</i>	<i>rbcL1</i>	<i>rbcL2</i>	<i>ITS</i>
H₂O	12,9 µl	13,2 µl	12,4 µl	12,2 µl	14,1 µl	13,3 µl	13,3 µl	13,3 µl
MgCl₂ (25 mM)	4,0 µl	3,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl
10X PCR Tamponu	3,0 µl	2,0 µl	3,0 µl	4,0 µl	2,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl
dNTP (10 mM)	0,6 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,6 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
F- primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,5 µl
R-primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5u/µl)	0,5 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,2 µl
DNA (10 ng/ µl)	3,0 µl	5,0 µl	4,0 µl	3,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl
Toplam	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl

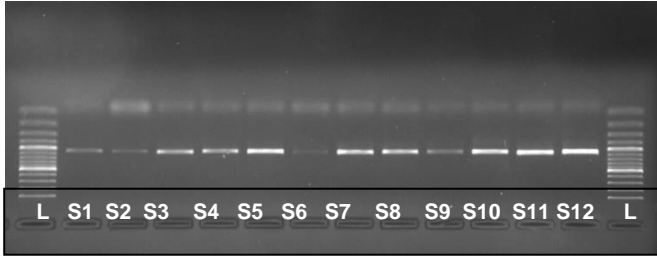
Tablo 5 : Bütün gen bölgelerinde (cpDNA *trn* T-F, *matK*, *rbcL* ve rDNA *ITS*) kullanılan primerler için optimize edilen ve uygulanan PCR koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı	Tanım
<i>trn</i> T-L	95°C	4'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	94°C	1'	35 tekrar	Sarmal bozulum (Denaturation)
	58°C	45"		Birleşme (Annealing)
	72°C	40"		Uzatma (Extension)
	72°C	10'	1	Son Uzatma (Final Extension)
<i>trn</i> L	95°C	5'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	94°C	30"	35 tekrar	Sarmal bozulum (Denaturation)
	58.3°C	30"		Birleşme (Annealing)
	72°C	1'		Uzatma (Extension)
	72°C	10'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
<i>trn</i> L-F	95°C	4'	1	Sarmal bozulum (Denaturation)
	94°C	30"	35 tekrar	Birleşme (Annealing)
	60.5°C	30"		Uzatma (Extension)
	72°C	40"		Uzatma (Extension)
	72°C	10'	1	Son Uzatma (Final Extension)
<i>matK</i> 1	94°C	5'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	94°C	1'		Sarmal bozulum (Denaturation)
	55.5°C	1'		Birleşme (Annealing)
	72°C	2'		Uzama (Extension)
	72°C	10'	1	Son Uzatma (Final Extension)
<i>matK</i> 2	95°C	5'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	94°C	1'	35 tekrar	Sarmal bozulum (Denaturation)
	52°C	40"		Birleşme (Annealing)
	72°C	1'		Uzama (Extension)
	72°C	8'	1	Son Uzatma (Final Extension)
<i>rbcL</i> 1-2	95°C	5'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	95°C	1'	35 tekrar	Sarmal bozulum (Denaturation)
	49.5°C	30"		Birleşme (Annealing)
	72°C	1'		Uzama (Extension)
	72°C	7'	1	Son Uzatma (Final Extension)
<i>ITS</i>	94°C	6'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	94°C	70"	30 tekrar	Sarmal bozulum (Denaturation)
	57.5°C	45"		Birleşme (Annealing)

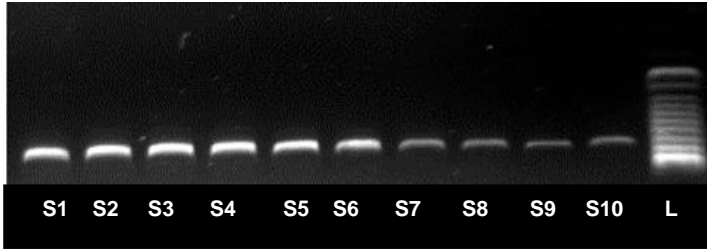
	72°C	90"		Uzama (Extension)
	72°C	10'	1	Son Uzatma (Final Extension)

3.3.2 Agaroz jel elektroforez koşulları

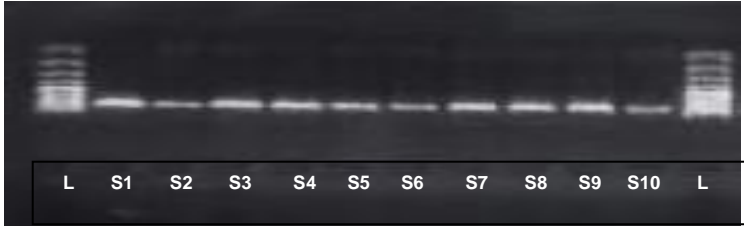
Agaroz jeli hazırlarken çözelti tampon solüsyon olarak TBE (Tris Borat EDTA) kullanılmıştır. Jelin oranı ise çoğaltılan alanın büyüklüğüne göre değişmekte olup genelde % 0,8 ile % 1,5 arasında değişmektedir. Agaroz jel tankta 100-120V arasında çoğaltılan bölgenin büyüklüğüne göre 30 dakika- 45 dakika arasında yürütülmüştür. Kullanılan bütün primerlere ait jel fotoğrafları Şekil 8, 9, 10,11 'de gösterilmiştir.



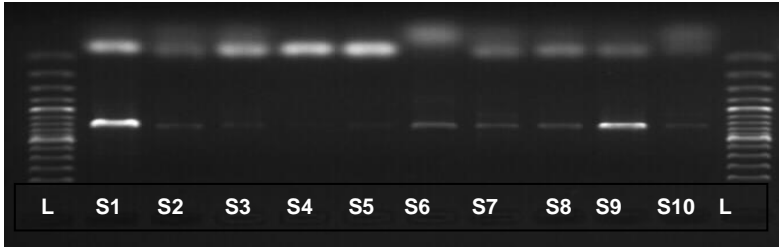
Şekil 8: *trnL* bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5 'luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S12) örneklerin DNA'larından çoğaltılmış *trnL* bantlarını göstermektedir.



Şekil 9 : *matK-1* bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S10) örneklerin DNA'larından çoğaltılmış *matK-1* bantlarını göstermektedir.



Şekil 10 : *rbcL-1* bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S10) örneklerin DNA'larından çoğaltılmış *rbcL-1* bantlarını göstermektedir.



Şekil 11 : *ITS* bölgesine ait PCR ürünlerinin %1.5 'luk agaroz jelde görüntülenmesi. Jel fotoğrafındaki L referans DNA bandını diğerleri ise (S1-S10) örneklerin DNA'larından çoğaltılmış *ITS* bantlarını göstermektedir.

3.4 Verilerin toplanması ve analiz edilmesi

Optimizasyon basamakları gerçekleştirildikten sonra PCR ürünleri -20°C'de DNA dizileri analiz edilene kadar bekletilmiştir. DNA dizileme ve saflaştırma işlem basamakları Genoks Moleküler Biyoteknoloji Şirketi (Cinnah, Ankara) tarafından ABI3730XL 96 kapillar otomatik DNA dizi cihazlarında yapılmıştır. DNA çoğaltma işlemi için "Mega Alignment software" (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 7.0 kullanılmıştır. Geopize Araştırma grubunun geliştirdiği Finch TV (Versiyon 1.4) programı kromotogramları görüntülemek ve kontrolleri yapmak için kullanılmıştır (Patterson vd., 2004-2006).

Kloroplast ve çekirdek DNA gen bölgelerinden elde edilen DNA dizileri toplandıktan sonra MEGA software formatına göre düzenlenip, moleküler çeşitlilik parametre analizleri gerçekleştirilmiştir (Tamura vd., 2007). Bütün filogenetik ağaçları oluşturmak için "neighbor-joining" (NJ) methodu kullanılmıştır. Ağacın oluşturulması ve örneklenmesi bin kere tekrarlanarak, her filogenetik dalın oluşturulmasında tekrarlanma yüzdeleri (bootstrap) olarak

hesaplanmıştır. Eğer bu tekrarlanma yüzde değeri %95'in üzerinde ise güvenilir olduğu düşünülüp ve dallanma topolojisinin doğru olduğu söylenebilmektedir. Ayrıca bu değer %50'den büyükse bilgilendirici olarak değerlendirilmektedir (Nei ve Kumar, 2000).

3.5 Önemli nehir sistemlerinde doğal olarak bulunan *Salix alba*-*S. excelsa* tür kompleksinin moleküler karakterizasyonu (İş paketi 1-ek)

Proje amacıyla ifade edildiği üzere *iş paketi* -2 için bütün nehir sistemlerine iki tür bulma olasılığı ile arazi çalışmaları yapılmıştır. Ancak gidilen her nehirde morfolojik değerlendirmeler sonucu, bir adet Söğüt türünün baskın gelerek, diğerine olanak vermeden nehir boyunca dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Bu yüzden her nehirde, sadece tek bir türe ait olduğu düşünülen Söğüt örneklerinden toplanılmıştır. Farklı nehir havzalarında, her popülasyonda farklı morfolojik yapıda Söğüt türlerine rastlanıldığı için her popülasyonda morfolojik ayırım yapılmaya çalışılmış, ancak çok tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu yüzden *iş paketi* 2'deki türlerin (*S.alba* ve *S.excelsa*) tür tayinini yapmak üzere *iş paketi*-1'de kullanılan gen dizileri (markörler) ile taksonomik tayin yapılmak istenmiştir. Bu amaçla *iş paketi*-1'e ilave olarak, Türkiye'deki söğüt türlerinde özellikle *S. alba* ve *S. excelsa*'da çok iyi ayırım yaptığı düşünülen ve birkaç bilgilendirici çeşitlilik içeren gen bölgelerine ait primerler seçilmiştir. 9 nehir sisteminin de dahil edildiği 23 farklı popülasyondan, 3'er adet olmak üzere 69 (23x3=69) adet Söğüt örneğinde bir adet kodlanan kloroplast (*matK*) ve iki adet çekirdek rDNA bölgesi (*ETS* ve *ITS*) dizi analizlerine bakılmıştır (Tablo 6 ve 7).

Son yıllarda yapılan çalışmalara çekirdek DNA *ITS* gen bölgesine ek olarak 'external transcribed spacer' olarak bilinen çekirdek DNA *ETS* bölgesinin çok fazla varyasyon ihtiva ettiği görülmüştür. Bu varyasyonların çoğunun bilgilendirici olmasıyla, *ETS* geni filogenetik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Weeks vd., 2005). Wu vd. (2015) tarafından çekirdek *ETS* gen bölgesinin söğütler üzerinde etkisi, yaptıkları çalışmalarla ortaya çıkmış; kısa bir bölge ancak çok ayırıcı olduğu ifade edilmiştir. Böylece proje kapsamına çok yakın olan *S.alba* ve *S.excelsa* türlerin ayrımı için sonradan ek bir gen bölgesinin dahil edilmesinin yararlı olacağı düşünülmüştür. Tek bir primerin çoğaltılmasıyla elde edilen çekirdek *ETS* bölgesi, rRNA18S ve 26S bölgelerinin arasında yer almaktadır (Şekil 12).

Kloroplast *matK* ve çekirdek *ITS* gen bölgelerine ait şematik şekil, PCR reaksiyonu çözelti miktarları ve PCR koşulları *iş paketi*-1 içerisinde daha önceden ifade edildiği için sadece çekirdek DNA *ETS* gen bölgesine ait görsel veriler (Şekil 12). PCR reaksiyonu çözelti miktarları (Tablo 8) ve PCR koşulları (Tablo 9) olarak ayrıca verilmiştir.

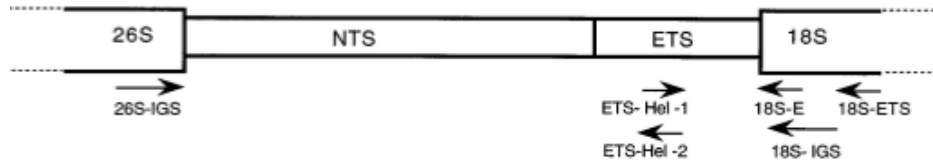
Moleküler çeşitlilik parameterleri ve moleküler filogenetik analizler için raporun 3.5 ile belirtilen bölümünde detayları verilen yaklaşım ve yöntemler kullanılmıştır.

Tablo 6 : Önemli nehir sistemlerinde doğal olarak bulunan *Salix alba-S. excelsa* tür kompleksinin moleküler karakterizasyonuna yönelik örneklenen popülasyonları ve kodları (İş Paketi-1 ek çalışma)

No	Nehir sistemi	Popülasyon	Kodları
1	Kızılırmak	K1 KIRIKKALE	3K1,7K1,9K1
2	Kızılırmak	K2 KAYSERİ	53K2, 56K2, 57K2
3	Kızılırmak	K3 KIRŞEHİR	K386, K387, K390
4	Kızılırmak	B BAFRA	B2-119, B3-120, B13-130
5	Kızılırmak	C CORUM	C3, C6, C8
6	Göksu	G1 ORTA	G1-1, G1-2, G1-3
7	Göksu	G2 SON	G2-1, G2-2, G2-3
8	Göksu	G3 ERMENEK	G3-1, G3-3, G3-4
9		G4 ILK	G4-5, G4-14, G4-15
10	Aksu	A AKSU	A4, A6, A8
11	Aksu	A2 AKSU	A33, A34, A35
12	Fırat	F FIRAT	F1, F2, F3
13	Aras	I İğdır	I4, I5, I6
14	Melendiz çayı	I IHLARA	I2, I3, I10
15		E ERZURUM	E1, E3, E4
16	Ceyhan	C1 CEYHAN	C1, C2, C3
17	Ceyhan	C2 CEYHAN	C69, C70, C73
18	Seyhan	S SEYHAN	S7, S9, S12
19	Çoruh	Co ÇORUH	Co1, Co2, Co3
20	Susurluk	R1 SUSURLUK	R1-1, R1-2, R1-3
21	Susurluk	R2 SUSURLUK	R2-21, R2-22, R2-23
22	Susurluk	R3 SUSURLUK	R3-42, R3-44, R3-45
23	Susurluk	R4 SUSURLUK	R4-68, R4-69, R4-70

Tablo 7: *S. alba* ve *S.excelsa*'da tür ayrımı için çalışılan çekirdek ETS'ye yönelik kullanılan primer nükleotid dizileri .

Primer Adı	Dizin	Bölge Uzunluğu
ETS 1F-18R	5'TTC GGT ATC CTG TGT TGC TTA C3' 5'GAGACAAGCATATGACTACTGGCA GGATCAACCAG-3'	~ 340 baz çifti



Şekil 12: Çekirdek rDNA ETS bölgesinin görsel konumu ve kullanılan primer bilgileri (Baldwin ve Markos, 1998).

Tablo 8: Çekirdek rDNA ETS gen bölgesi için optimize edilen PCR reaksiyonunda kullanılan çözelti miktarları.

PCR Karışımı İçindekiler ETS	
H ₂ O	13 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
10X PCR Tamponu	3 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
F- primer (10 µM)	0,5 µl
R-primer (10 µM)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0,5 µl
DNA(10 ng/ µl)	4 µl
Toplam	25 µl

Tablo 9: Çekirdek rDNA ETS gen bölgesi için kullanılan primerler için optimize edilen ve kullanılan PCR koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı	Tanım
ETS	95°C	5'	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	94 °C	3'	} 35 tekrar	Sarmal bozulum (Denaturation)
	58.3°C	1"		Birleşme (Annealing)
	72 °C	1,20'		Uzama (Extension)
	72 °C	7'	1	Son Uzatma (Final Extension)

3.6 *Salix alba* populasyonlarının genetik çeşitlilik ve yapılanmasının Türkiye nehir sistemlerinde (havzasında) belirlenmesi (iş Paketi 2)

3.6.1 Örneklem ve bitki materyali

İlk olarak Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğüne bağlı Ankara Behiçbey Fidanlığı'nda çeşitli tarihlerde farklı yerlerden seçilen ve *Salix alba* ve *Salix excelsa* olarak sınıflandırılan söğütler çalışmaya dahil edilmiştir. Bu amaçla, Örneklenen 72 klondan 29 genotip *S. excelsa* türüne aitken, 43 genotipin *S. alba* 'ya ait olduğu öne sürülmüştür. Bu sınıflandırmaların çok da geçerli olmadığını düşündük ve bu materyalleri sadece bir ön çalışma olarak ele aldık. Farklı şehirlerden örneklenen bireyler kendi içlerinde Marmara (9 *S. alba* genotipi ve 12 *S. excelsa* genotipi), Orta Anadolu (20 *S. alba*, 10 *S. excelsa*) ve Karadeniz Bölgesi (14 *S. alba*, 17 *S. excelsa*) olarak üç grupta birleştirilmiştir.

Ekonomik açıdan önemli olan türlerin ıslahına yönelik gen kaynaklarının karakterizasyonu için *Salix alba* ve *S. excelsa* türlerinde örneklem yapılmıştır. *Salix alba*'nın yayılış yoğunluğu göz önünde bulundurularak 9 nehir havzasından (Aras, Çoruh, Kızılırmak, Susurluk, Aksu, Göksu, Seyhan, Ceyhan ve Dicle) farklı populasyonlarından ve *Salix excelsa* için ise literatürdeki türün yayılışına yönelik bilgileri dikkate alınarak 5 nehir havzasından (Aras, Çoruh, Kızılırmak, Susurluk, Seyhan, ve Ceyhan) yine farklı populasyonlarından mümkün olan durumlarda en az 20' şer genotipden (ağaçtan) örneklem yapılmıştır. Proje başvurusunda alan seçimi yapılırken türlerin en az iki alanda doğal olarak bulunmasına dikkat edileceği belirtilmişti. Fakat bazı nehir sistemleri beklenenden daha fazla habitat parçalanması ve yok olmasının varlığı Dicle nehri yerine Fırat nehrinden örneklem yapmamıza neden olmuştur. Fırat nehir havzasında bile yapılan barajlar, yerleşim ve diğer nehir ile ilgili aktiviteler (kum ocakları) gibi örneklenecek populasyon sayısını kısıtlamıştır. Proje önerisinde belirtilmeyen ancak proje çalışmaları esnasında dikkate alınan özel koruma

alanı, Ihlara vadisinden de (Melendiz Çayı) örnekleme yapılmıştır. Bu seçilen her alanda türe ait populasyon içerisindeki bireyler rastgele örnekleme yöntemiyle seçilmiş ve birbirinden en az 200 metre uzaklıkta olmaları ve aynı klondan gelmemelerine yönelik azami titizlik gösterilmiştir. Bu amaçla, türler için 10 nehir havzasından (Ihlara dahil) mümkün olan bölgelerde 3 farklı populasyon olacak şekilde 23 populasyon (nehirin yukarı, orta ve aşağı kısımlarından birer populasyon olmak üzere toplam 3 populasyon) örneklendirilmiştir. Ancak, arazi şartları topoğrafik yapı, baraj ve tarla konumları ve diğer tahribatlar her nehir den en az üç populasyon alınmasını engellemiştir. Örneklenen populasyonlar harita üzerinde yeşil daire ile simgelenmiştir (Şekil 13). Projede bulunan nehir isimleri, populasyon kodları, buldukları il/ilçeler, rakım aralıkları ve populasyonun şu anki mevcut durumu Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10 : Projede çalışılan nehirlerin isimleri, populasyon kodları, buldukları il/ilçeler, ve rakım aralıkları.

Nehir Adı	Populasyon Kodu	Bulunduğu İl/İlçe	Rakım Aralığı (m)	Populasyon Durumu (devamlılık arzemesi)
Göksu	GKSYUKARI	Mut	246-284	İyi
	GKSERM	Ermenek	333-342	
	GKSORTA	Mut	91-104	
	GKSAŞAĞI	Silifke	27-58	
Kızılırmak	KIZYUKARI-KAY	Kayseri Ürgüp	789-1113	İyi
	KIZORTA-KIR	Kırşehir	640-816	
	KIZORTA-KRK	Kırıkkale	730-1269	
	KIZAŞAĞI-COR	Çorum	358-424	
Ceyhan	CEYHANYUKARI	Osmaniye	19-60	Orta
	CEYHANAŞAĞI	Ceyhan	0-30	
Seyhan	SEYHAN	Seyhan	0-13	Parçalanmış, kirli
Aksu	AKSUYUKARI	Aksu	39-329	Parçalanmış, DSİ, EXPO inşaatı
	AKSUAŞAĞI	Aksu	2-17	
Ihlara	IHLARA	Nevşehir	1102	İyi
Aras	ARASYUKARI	Erzurum	1508-2012	Orta
	ARASAŞAĞI	İğdır	850-870	
Fırat	FIRAT	Urfa	337-358	Parçalanmış
Susurluk	SUSYUKARI	Balıkesir	46-86	İyi
	SUSMANNAS	Balıkesir	38-128	
	SUSORTA	Bursa	9-55	
	SUSAŞAĞI	Balıkesir	30-72	
Çoruh	ÇORUH	Artvin Erzurum	604-2099	Parçalanmış, HES ve baraj tahribatı



Şekil 13 : Projede örneklenen popülasyonların harita üzerinde konumları (Kaynak:<http://cografyaharita.com>).

3.6.2 SSR (Simple Sequence Repeats-Basit dizi tekrarları) DNA belirteçlerin seçimi ve PCR koşullarının optimizasyonu

Genetik çeşitlilik, genetik farklılaşma ve türler arası gen akışı için SSR belirteçleri kullanılmıştır. Daha önce Kavak (Rajora ve Rahman, 2003; Rahman ve Rajora, 2002; Rahman vd., 2000; Dayanandan vd.,1998) ve Söğüt (Lian, 2001;2003; Stamati vd., 2003; Barker vd., Hanley vd., 2002; Lin vd., 2009; Puschenreiter vd., 2010; Socher vd., Lauron-Moreau vd., 2013) için geliştirilmiş olan SSR belirteçlerinden yüksek polimorfizm gösteren 20 polimorfik SSR lokusu seçilmiş ve çalışılacak söğüt türleri için taranmıştır. Söğüt ve kavakta yapılan literatür çalışması sonucunda, SSR seçiminde en az 3'lü veya daha çok tekrarlı olan ve yüksek allel sayılı SSR primer çiftleri tercih edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak. 5' uçları floresan taqlı olmayan 50 adet SSR primeri seçilmiş ve sentez ettirilmiştir. Bunlardan 14 SSR lokusu kavak genomundan, geri kalanı ise söğüt genomundan geliştirilmiştir. Seçilmiş olan primerlerden, projede optimizasyonu hedeflenen 20 SSR lokusundan, genetik analiz sisteminde tespit edilebilmeleri için her lokusa ait forward primerler sentez sırasında floresans boyalarla işaretletirilmiştir (Tablo 11). Ancak bunlardan 5 tanesi popülasyonlarda örneklenen bireylerin %50'sinde çalışmadığı için analizi yapılamamıştır. Projede yer alan 15 SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, motif, bağlanma sıcaklığı,ve kaynakları Tablo 12'de detaylı olarak verilmiştir. Behiçbey Fidanlığında bulunan söğüt klonlarının toplanma

şekli ve tür tanımındaki yetersizliklerden dolayı ve gereksiz masraftan kaçınılmak için 15 SSR primerden sadece 8 kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla Tablo 11 ve 12 de işaret boyaları ve DNA dizileri verilen Sare03, Sare04, Sare08, gSIMCT052, SB24, PMGC2163,WPMS18, ve WPMS12 primerleridir.

Tablo 11 : SSR lokusları ve işaretleme boyası.

	SSR Lokus adı	İşaretleme boyası rengi
1	Sare03	Yeşil
2	Sare04	Mavi
3	Sare08	Siyah
4	SB24	Siyah
5	SB194	Siyah
6	SB196	Yeşil
7	SB233	Mavi
8	SB243	Siyah
9	SB265	Yeşil
10	SB493	Mavi
11	W293	Mavi
12	W784	Mavi
13	gSIMCT024	Mavi
14	PMGC2709*	Yeşil
15	PMGC2889*	Yeşil

* Kavak genomundan geliştirilen SSR lokusları

Tablo 12 : SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, motif, bağlanma sıcaklığı ve kaynakları.

No	SSR lokusu	Motif	Primerler (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı Ta (°C)	Kaynak
1	Sare03	(AC) ₂₈	TCATCATCCCATTCTCATTG AAATGGTAAGCCCTTGTTGTC	55	Lian vd., 2001 Lian vd., 2003
2	Sare04	(AC) ₁₆ C(AC) ₁₀	GACTTCTAGTATTTCTACCCCTC TATAATTGAGAAAGAAAAAGACG	50	
3	Sare08	(GT) ₂₇	TATACAATAGGCCCTGGTACC ACCCAGCAAAGCAATAACTGG	58	
4	SB24	[TG] ₂₁ AG[TG] ₃ AG [TG] ₃ AG[TG] ₃ AGTGAG [TG] ₃	ACTTCAATCTCTCTGTATTCT CTATTTATGGTTGGTCGATC	55	Barker vd., 2003 Lin vd., 2009 Sochor vd., 2013 Lauron vd., 2013
5	SB194		TGTGAGATAAGATTTGTCGGT CCATAAATAAAAAACGTGAAC	50	
6	SB196	[GCC] ₉	CTGTTTCTGCCACTATTACC TATAATCTGTCTCCTTTTGGC	57	
7	SB233	[TA] ₂ [TGTGCG] ₄ [TG] ₉	AAATTACCGTCCAACTAAAGA CATTAGCCATGAACAAGTAAA		
8	SB243	[GCC] ₃ ATCATTC CCC[GCC] ₄	ATTCCTTTCTTCATCAGTAGC GACAACGCCATTACATGACC	54	
9	SB265	-	ATTAGGGTTTGTGCTTGGTG AACATACGTTTCAACGAGAAG	53	
10	SB493	-	TTTCTGGATCAATGGAGCTTG CATCTTTCCTTCTTTACTCC	55	
11	W293	-	TGATTGGGCTAAAGATGAAGC AACTCAGCAACCACCAGAAAC		
12	W784	-	GCACAGATAAAAAATTGGTTG ATATGACTAGGAGGATGTGTT		
13	gSIMCT0 24	(CT) ₁₀	TCATTTGCTCGATGAGGTTG GTGGTAGTTGCAAAAGGGGA	57	
14	PMGC27 09	GA	ATTGTAATTATTGAACACATGCC GTGCAGTTCAGAGTATTGTTG	52	IPGC* SSR Kaynağı
15	PMGC28 89	GA	CCCAAGATCCGATTTTGGG CACAATGTACAAATCGCTGTC		

*The International Populus Genome Consortium (IPGC) : Uluslararası Kavak Genom Konsorsiyumu Kavak genomundan geliştirilen SSR lokusu

3.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR koşulları yakın olan primerler “fragment” analizi için aynı boya rengi ile işaretlenmiş “forward” primer olarak ilgili firmaya sentezletirilmiştir. PCR uygulaması için liyofilize şekilde sipariş edilen primerler uygun şekilde sulandırılarak öncelikle 100 pmol/μl stok primer ve daha sonra bu stok primerden devamlı kullanım için 10 pmol/μl'lik primer solüsyonu hazırlanmıştır. DNA örneklerine uygulanan PCR koşulları bağlanma ısısı, MgCl₂, ve Thermo Taq DNA Polymerase (Thermo,US) konsantrasyonlarını optimum hale getirmek için gradient

PCR uygulaması yapılmıştır. İlgili bölgenin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler Tablo 13'de, ve polimeraz zincir reaksiyonu için uygulanan koşullar Tablo 14'te verilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin PCR ile çoğaltılmasında toplam reaksiyon hacmi 25 µl olarak kullanılmıştır. Primerler yardımıyla mikrosatellit bölgelerinin çoğaltılması için Thermal cycler (Eppendorf-Mastercycler, Eppendorf, Canada and Technegenius Thermocycler, Techne, USA) kullanılmıştır. Elde edilen DNA'lar ilgilenilen bölgeye özgü floresan boya ile işaretli forward primer ve herhangi bir floresan boya ile işaretlenmemiş reverse primer kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır.

Tablo 13: Her bir primer çifti için belirlenen optimizasyon koşulları.

SSR Lokus adı	H ₂ O	10x PCR tamponu	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP karışımı (10 mM)	Primer (10 mM)	Taq DNA polimeraz (5 u/µl)	DNA (10 ng/µl)	Total hacim
Sare03	12 µl	4 µl	3 µl	0,4 µl	0,5+0,5 µl	0,5 µl	4 µl	25 µl
Sare04	11 µl	3 µl	2 µl	0,7 µl	0,8+0,8 µl	0,4 µl		
Sare08	12 µl	4 µl	3 µl	1 µl	0,8+0,8 µl	0,5 µl		
SB24								
SB194	12 µl	4 µl	3 µl	1 µl	0,8+0,8 µl	0,5 µl		
SB196								
SB233	11 µl	3 µl	2 µl	0,7 µl	0,8+0,8 µl	0,4 µl		
SB243								
SB265	13 µl	4 µl	3 µl	1,5 µl	0,8+0,8 µl	0,4 µl		
SB493								
W293	12 µl	4 µl	3 µl	0,4 µl	0,5+0,5 µl	0,5 µl		
W784	11 µl	3 µl	2 µl	0,7 µl	0,8+0,8 µl	0,4 µl		
gSIMCT024	12 µl	4 µl	3 µl	1 µl	0,8+0,8 µl	0,5 µl		
PMGC2709*	12 µl	4 µl	3 µl	0,5 µl	0,5+0,5 µl	0,5 µl		
PMGC2889*								

* Kavak genomundan geliştirilen SSR lokusu

Tablo 14: Optimize edilen PCR reaksiyon koşulları.

SSR Lokus Adı	Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Tanım
Sare03 Sare04	1	95°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	1 dak.	35	Sarmal bozulum (Denaturation)
		Ta	30 sn.		Birleşme (Annealing)
		72°C	1 dak..		Uzatma (Extension)
	3	72°C	5 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)
Sare08 SB24	1	94°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	1 dak.	35	Sarmal bozulum (Denaturation)
		Ta	45 sec.		Birleşme (Annealing)
		72°C	1 dak.		Uzatma (Extension)
	3	72°C	10 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)
SB194 SB293 SB493	1	94°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	30 sn.	30	Sarmal bozulum (Denaturation)
		Ta	45 sn.		Birleşme (Annealing)
		72°C	45 sn.		Uzatma (Extension)
	3	72°C	10 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)
SB196 SB233 W784	1	95°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	1 dak.	35	Sarmal bozulum (Denaturation)
		Ta	30 sn.		Birleşme (Annealing)
		72°C	1 dak..		Uzatma (Extension)
	3	72°C	5 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)
SB243 SB265	1	94°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	40 sn.	30	Sarmal bozulum (Denaturation)
		Ta	30 sn.		Birleşme (Annealing)
		72°C	1 sn.		Uzatma (Extension)
	3	72°C	10 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)
gSIMCT024	1	94°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	1 dak.	35	Sarmal bozulum (Denaturation)
		57°C	45 sec.		Birleşme (Annealing)
		72°C	1 dak.		Uzatma (Extension)
	3	72°C	10 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)
PMGC2709* PMGC2889*	1	94°C	3 dak.	1	İlk sarmal bozulumu (Denaturation)
	2	94°C	40 sn.	30	Sarmal bozulum (Denaturation)
		52°C	30 sn.		Birleşme (Annealing)
		72°C	30 sn.		Uzatma (Extension)
	3	72°C	10 dak.	1	SON Uzatma (Final Extension)

* Kavak genomundan geliştirilen SSR lokusu

3.6.4 Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez uygulaması için %3 yoğunlukta agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanması için kullanılacak jel büyüklüğüne göre tartılan agaroz ile tampon çözeltisi olarak kullanılan TBE kaynatma yolu ile (mikrodalga) çözdürüldü. Jel sıcaklığı yaklaşık 50-55°C olduğunda 5µg/ml etidyum bromür eklendi. PCR sonucunda elde edilen ürünler ile yükleme çözeltisi (6x loading dye) 4:1 oranında karıştırılarak mikropipet yardımı ile jele yüklendi. Elektroforez işlemi 1x TBE (Tris-Borate-EDTA) tamponunda en az 30 dakika süresince 120 volt elektrik akımı uygulanarak gerçekleştirildi. Verilerin toplanması sırasında SSR bantlarının büyüklüğünü belirlemek amacıyla 25 ile 700 baz çifti arasında bantları içeren DNA standardı (GeneRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi PCR ürünleri Alphamager Gel Documentation System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) de UV ışık altında değerlendirilmiştir.

3.6.5 Fragment analizi

Elektroforez jel sonuçlarına göre çalışılan lokuslarda kaliteli bant gözlenen bireylerin PCR ürünleri, tek tüp içerisinde üç farklı renkte olan SSR primerleri birleştirilerek analize gönderilmiştir. Bu noktada primerlerin alel büyüklükleri önemlidir. Diğer bir önemli nokta ise, bazı boya sinyalleri baskın olduğu için analiz sırasında diğerlerinin görünmesini engellemektedir. Bu nedenle, baskın boyalar PCR ürünleri karışımında daha az miktarda kullanılmıştır. PCR ürünlerinin fragment analiz basamaklarının bir kısmı REFGEN şirketine (Teknokent, ODTÜ, Ankara), geri kalan büyük bir bölümü ise BMLabosis şirketine (Çankaya, Ankara) yaptırılmıştır. Mikrosatellit analizi için, ABI 310 Genetik Analiz (PE Applied Biosystem) dizi analiz programı kullanılmıştır.

Alel büyüklükleri, analiz programında (Peak Scanner™ Software v 1.0. Applied Biosystems, CA, ABD) bilinen "standart fragment" büyüklükleri esas alınarak belirlenmiştir. Homozigot ya da heterozigot örnekler analiz programı yardımıyla elde edilen piklerden yararlanılarak ortaya konmuştur. Yazılımda, analiz metodu için "Sizing Default NPP (NPP: No Primer Peaks)" ve "size standart GS400" olarak belirlenmiştir.

3.6.6 Genetik veri analizleri

Nehirlerde doğal olarak yayılış gösteren *Salix alba* türünün populasyonları arasındaki mevcut genetik yapıyı açığa çıkarmak populasyonlar arasındaki genetik farklılıkları belirleyebilmek

için lokusların pikleri değerlendirilerek istatistiksel analiz için ham veriler oluşturuldu. Fragment analizi sonuçları genetik data analizi programı olan GDA (Genetic Data Analysis, Lewis ve Zaykin, 2002) ile değerlendirilmiştir. Her primer için özgün allel sayıları, polimorfizm oranı (P), polimorfik lokus başına ortalama allel sayısı (Ap), beklenen genetik çeşitlilik (He), gözlenen genetik çeşitlilik (Ho), kendileme katsayısı/ populasyon (Fis), kendileme katsayısı/ genotip (Fit) ve Genetik farklılaşma (Fst) değerleri hesaplanmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre populasyonların birbirlerine olan akrabalık dereceleri, genetik uzaklıkları ve genetik yapılarında olan farklılıklar (genetik çeşitlilik) saptanmıştır. Behiçbey fidanlığındaki klon bankasındaki materyallerdeki genetik çeşitlilik parameterlerinin bulunmasında daha önce de belirtildiği gibi sadece Sare03, Sare04, Sare08, gSIMCT052, SB24, PMGC2163, WPMS18, ve WPMS12 primer verileri kullanılmıştır.

Heterozigotluk, soy içi eşleşmenin (inbreeding) 3 seviyede tespitinde kullanılmaktadır (Nei, 1987). Fis her bir alt-populasyon içindeki fiksasyon endeksini yani her bir altpopulasyondaki heterozigotluğun Hardy-Weinberg dengesinden sapmasını göstermektedir. Fis değeri -1 ile +1 arasında değişir. Negatif değerler populasyon içindeki heterozigot bireylerin fazlalığına, pozitif değerler ise homozigot bireylerin fazlalığına işaret eder. Fit, ana populasyon içindeki tüm bireylerin Hardy-Weinberg dengesinden sapmasının ölçütüdür. Fst ise genetik farklılaşmanın göstergesidir. Başka bir ifade ile populasyonlar arasındaki allel frekansları farklılıkları nedeniyle meydana gelen fiksasyon endeksindeki azalmayı göstermektedir. Ayrıca, populasyonlar arası genetik farklılaşmayı gösteren en kapsamlı ölçütlerden biridir. Daima 0 ile +1 arasında değişen pozitif değerler almaktadır. Populasyonlar genetik izolasyonla birbirlerinden farklılaşmışsa ve aralarında gen alışverişi yoksa, Fst değeri 1 e yakın olmaktadır. Fst değeri 0,05 ve daha azsa populasyon içi genetik farklılaşma ihmal edilebilir düzeydedir. Bu değer, 0,25'den büyükse ciddi ölçüde genetik farklılaşmadan söz edilebilmektedir.

Genetik çeşitliliğin ölçülmesinde; heterozigotluk, polimorfik lokuslara sahip olan bireylerin ortalama değeridir. Bir populasyondaki genetik varyasyonun en yaygın kullanılan ölçütü heterozigotluktur. Genetik varyasyonun bir diğer göstergesi de lokus başına düşen allel sayısıdır (A). Alelik zenginlik olarak da bilinen bu ölçüt örnek sayısından etkilenmektedir. Lokus başına düşen allel sayısı da genetik çeşitliliği göstermek için kullanılır.

Moleküler coancestry katsayısından elde edilen genetik mesafelere göre UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile genetik ilişki ağacı oluşturulmuştur.

Türkiyede varolan ve her coğrafik bölgeyi temsil edecek şekilde seçilen 10 nehirden örneklenen (Göksu, Kızılırmak, Ceyhan, Seyhan, Aksu, İhlara, Aras, Fırat, Susurluk, Çoruh)

23 *Salix alba* populasyonunun mevcut genetik yapısını incelemek, populasyonlar arasındaki genetik farklılıkları belirleyebilmek. çalışılan bireylerin (genotiplerin) farklı genetik gruplara atanmasını yapabilmek ve genetik yapı bakımından karışmış olan melez bireyleri belirleyebilmek için STRUCTURE 2.3.4 (Hubisz vd., 2009; Falush vd., 2003; Falush vd., 2007) kullanılarak genetik yapılaşma analizi gerçekleştirilmiştir. Genetik yapılaşma analiz yönteminde (Structure test method) varsayılan farklı genetik gruplar (K) her bir populasyonda yer alan bütün bireylerin herbir lokusundaki alel frekansı setleri ve aleller arasındaki farklılıklar dikkate alınarak bireyler farklı genetik gruplara yerleştirilir. Alel frekansları dikkate alınarak yapılan bu ayırimda, örneklenen genotipler tek bir gruba yüksek bir ihtimal ile tayin edilebildiği gibi eğer bireylerde çalışılan lokuslar açısından genetik karışım (admixture) söz konusu ise iki yada daha fazla gruba da tayin edilebilmektedir. Genetik yapılaşma analiz yönteminde, Bayesian yaklaşımı ve Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metodu kullanılmaktadır. 10 nehirden örneklenen 23 populasyonun genetik çeşitliliğini belirlemek için toplamda 643 ağaç 15 mikrosatellite (SSR) DNA markörü kullanılarak analiz edilmiştir. Örneklenen populasyonların kaç genetik gruba ayrıldığını bulmak için hem bütün nehirlerden örneklenen populasyonları bir bütün olarak kabul edilip değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca her nehir kendi içindeki populasyonları gözönüne alınarak nehir bazında değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Analizler programın genetik karışım (admixture) modelini kullanarak 20000 Burn-in tekrarı ve 100000 MCMC tekrarları ile yapılmıştır. Olası genetik grupların (K) aralığı 1 den 10'a kadar 10 tekrar ile test edilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak farklı genetik grup sayısı (K değeri) STRUCTURE HARVESTER (Earl vd., 2012) adlı program kullanılarak hesaplanmıştır. Bireylerin belirlenen genetik gruplardan herhangi birinde yer alması o gruba ait olma katsayısının 0,5 ten büyük olmasına bağlıdır. CLUMPP (Jakobsson ve Rosenberg, 2007) programı kullanılarak 10 tekrarlı genetik yapılaşma analizinde belirlenen K değerine göre genotiplerin belirlenen genetik gruplara ait olma katsayılarının ortalaması alınmıştır. CLUMPP programından elde edilen ortalama değerler POPHELPER (Francis, 2016) programı kullanılarak bireylerin belirlenen genetik gruplara dağılımının grafiği elde edilmiştir. Populasyonlarda aynı genotipe sahip bireylerin var olup olmadığının belirlenmesi için GenClone2.0 programı kullanılmıştır (Arnaud-Haond ve Belkhir, 2007).

4. BULGULAR

4.1 Türkiye söğüt türlerinin moleküler filogenetiği

Kloroplastın kodlanmayan t-RNA (*trnT-F*) bölgesi 24 adet Söğüt türü ve bir adet melezde 3 primer yardımıyla elde edilmiştir. Bu diziler Mega programında birbiri ucuna eklenerek 1338 bç uzunluğuna ulaşmıştır (Tablo 15). Söğüt türlerinde *trn T-F* bölgesinin en fazla varyasyon gösteren bölgesi *trn L* intronu olarak tespit edilmiştir. Bu bölgede hiçbir baz kaybı (deletion) veya eklenmesi (insertion) (“deletion” ve insertion” birlikte indels olarak kullanılmaktadır) görülmemiştir. *Trn T-F* gen bölgesindeki varyasyonların çoğu parsimony bilgilendirici bölgedir (49 baz pozisyonu). Bu gen bölgesinin GC içeriği genel olarak %30 civarındadır. Bir pürin bazının diğer bir pürin ile (Adenin ve Guanin) veya bir pirimidinin diğer bir pirimidin (Timin ve Sitozin) ile yer değiştirmesine tranzisyon olarak değerlendirilirken, bir pürinin pirimidin ile yer değiştirmesi (Adenin ve Timin) veya tersine (Sitozin ve Guanin) transversiyon adı verilmektedir. *Trn T-F* bölgesinde bu değerler 50,1 ve 49,29 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin birbirine oranı ise R değeri olarak bilinmektedir (0,85). Bir gen bölgesini nükleotid çeşitliliği ise bir gen dizisinin polimorfizm ölçüsüdür ve *trn T-F* bölgesi için bu değer 0,017 olarak kloroplast gen bölgeleri içinde en yükseği olarak ifade bulmuştur.

Türk söğüt türlerinde *matK* gen bölgesinin 23 adet Söğüt türü ve bir melez için çoğaltılması ile uzunluk 1731 bç olarak belirlenmiştir. Herbarium örneği olan *S. myrsinifolia*'nın *matK* gen bölgesinin çoğaltılmasında zorluklar yaşandığı için, bir istisna olarak analizden çıkarılmıştır. Varyasyonun *matK* 'nın *matK-1* primeri ile çoğaltılan 5' ucunda daha çok bulunduğu ve *matK-2* primeri ile çoğaltılan 3' ucunun daha konservatif olduğu görülmüştür. *MatK* geninin GC içeriği *trn T-F* bölgesi gibi % 35 civarındadır. Tranzisyon ve transversiyon çiftleri sırasıyla 60,78 ve 39,22 olarak bulunmuştur. R değeri de *Salix* türlerinde 1,36 olarak belirlenmiştir. Tek bir insersiyon (indel) olduğu görülmüştür. Nükleotid çeşitliliği söz konusu olduğunda ise 0,006 değeri ile diğer gen bölgeleri arasında en düşük değere sahiptir.

Kloroplast genomunun çalışılan son bölgesi *rbcL* geni 24 adet Söğüt türü ve bir melez için 1480 bç olarak çoğaltılmıştır. Bunun için iki adet küçük uzunluklarda *rbcL1-2* primeri kullanılmıştır. Kloroplast gen bölgeleri içerisinde en düşük nükleotid çeşitliliği gösteren bölge *rbcL* gen bölgesidir (22 baz pozisyonu). İnsersiyon ve delesyon (indel) görülmemiştir. GC içeriği diğer kloroplast gen bölgeleri arasında en yükseğidir (%43,4). Tranzisyon çiftlerinin transversiyona oranı (R) 1,39'dur. Nükleotid çeşitlilik sayısı ise 0,005'tir.

Kloroplast gen bölgelerinin birleştirilerek filogenetik ağaç oluşturulacağı için moleküler parametreler bütün kloroplast gen bölgelerini birleştirilerek (toplam) de hesaplanmıştır (Tablo 16). 113 adet Söğüt kloroplast genom bölgelerine ait DNA dizisi ile yapılan analizlerinde

toplam uzunluk 4552 bç'ne çıkmıştır. Korunmuş bölge 4420 iken toplam varyasyon gösteren bölge 123 baz pozisyonu olarak ifade edilmiştir. Bunlardan 89'u ise "parsimony" olarak bilgilendiricidir. Kloroplast bölgeleri toplam moleküler analizlerinde tek bir insersiyon görülmüştür ki bu *matK* gen bölgesinden kaynaklanmaktadır. GC içeriği ayrı ayrı bütün kloroplast gen bölgelerinde olduğu gibi % 35,5 çıkmıştır. Ortalama R değeri 0,90 olarak belirlenmiştir.

Çekirdek *ITS* gen bölgesi tek primer ile 24 adet Söğüt türü ve bir melez için çoğatılmıştır. Toplam çekirdek *ITS* gen bölgesinin uzunluğu 657bç olarak bulunmuştur. GC içeriği diğer kloroplast bölgelerine göre çok daha % 64,5'tir. Yüksek GC içeriği DNA sekansında yüksek genomik çeşitliliğin göstergesidir (Serres Giardi vd., 2012). Varyasyon gösteren nükleotid sayısı 657'de 17baz pozisyonu olarak bulunmuştur. Çoğu bilgilendiricidir. Çekirdek gen bölgesi *ITS* varyasyon oranı (17/657), toplam kloroplast gen bölgesi varyasyon içeriğine göre oranı (123/4452) daha yüksektir. *ITS* gen bölgesinde bir tane indel (insersiyon/delesyon) kaydedilmiştir. R değerine (tranzisyonel çiftler/ transversiyonel çiftler) baktığımızda, tranzisyonların (74,88) sayısının çok olmasından kaynaklanan değer 2,73'tür ve diğer bütün kloroplast bölgelerinden fazladır. Nükleotid çeşitlilik parametresi 0,013 gibi yüksek bir değer bulunmuştur.

Tablo 15: Çalışan kloroplast genomu gen bölgelerinde belirlenen moleküler çeşitlilik parametreleri.

<u>Moleküler Parametreleri</u>	<u>Çeşitlilik</u>	<u>trn T-F</u>	<u>matK</u>	<u>rbcl</u>	<u>Toplam cpDNA (trn T-F+ matK + rbcl)</u>
Kullanılan Tür sayısı		24+1 Melez	23+1 Melez	24+1 Melez	24+1 melez
Kullanılan DNA dizi sayısı		126	113	121	113
Toplam uzunluk (bç)		1339	1731	1480	4552
GC içeriği (%)		30,4	32,4	43,4	35,5
Korunmuş bölge uzunluğu (bç)		1281	1683	1457	4420
Çeşitlilik gösteren baz pozisyonu sayısı		56	45	22	123
Parsimony bilgilendirici pozisyon sayısı		49	33	15	89
Tranzisyonal çiftler		50,71	60,78	56,72	49,14
Transversiyonal çiftler		49,29	39,22	43,28	50,86
Tranzisyon /Transversiyon (R) Bias (R)		0,91	1,36	1,29	0,90
Indel		0	1	0	1
Nükleotid Çeşitliliği		0,017	0,006	0,005	0,011

Tablo 16: Çalışan çekirdek gen bölgesinde (ITS) belirlenen moleküler çeşitlilik parametreleri.

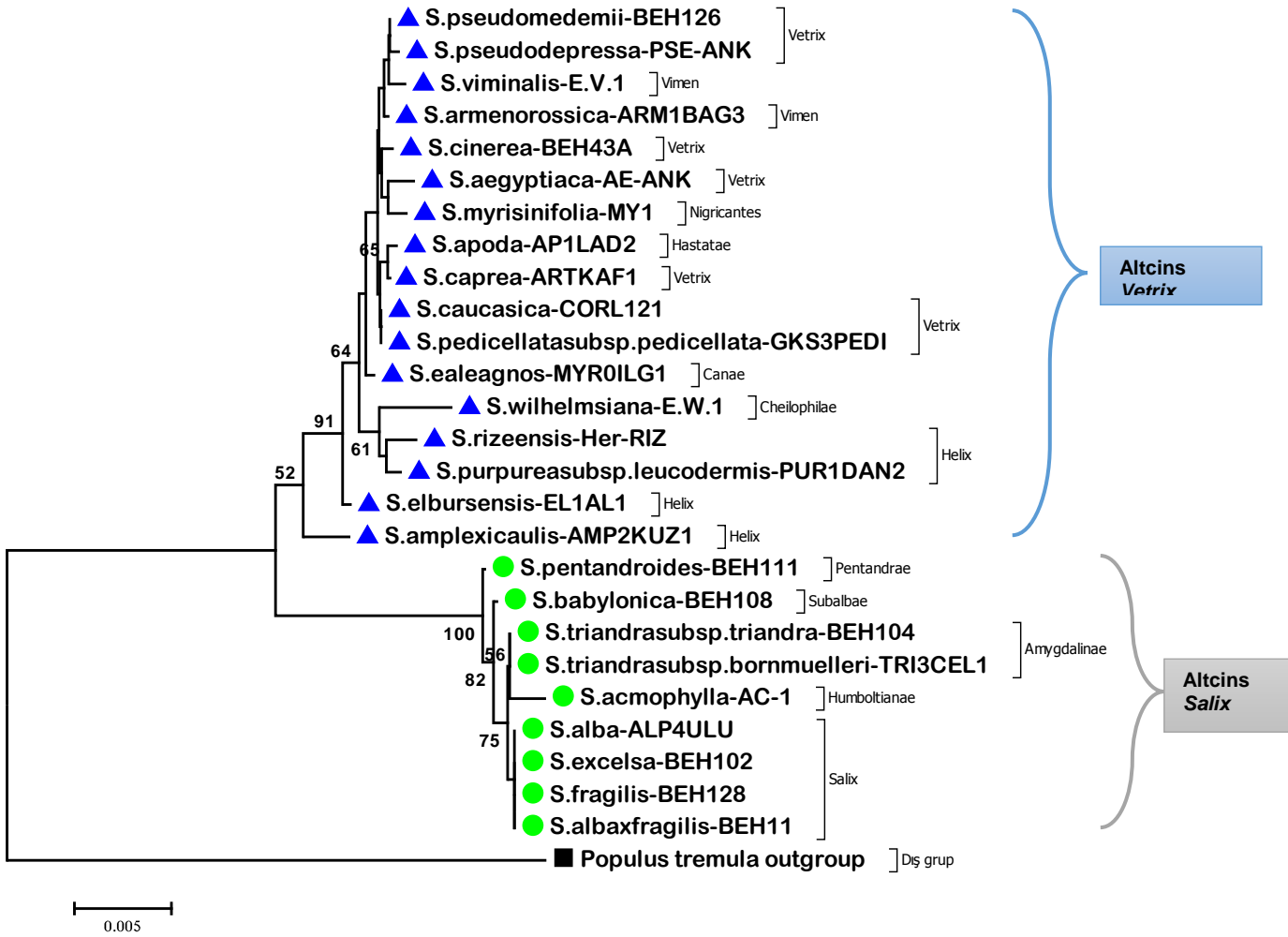
<u>Moleküler Parametreleri</u>	<u>Çeşitlilik</u>	<u>rDNA ITS</u>
Kullanılan Tür sayısı		24+1 melez
Kullanılan Dizi sayısı		117
Toplam uzunluk		657
GC içeriği (%)		64,5
Korunmuş bölge		640
Çeşitlilik gösteren bölge		17
Parsimony bilgilendirici bölge		14
Tranzisyonal çiftler		74,88
Transversiyonal çiftler		25,12
Tranzisyon /Transversiyon Bias (R)		2,73
Indel		1
Nükleotid Çeşitliliği		0,013

4.2 Filogenetik Ağaçların Değerlendirilmesi (*trn* T-F, *matK*, *rbcL* ve rDNA ITS)

Bütün kloroplast genlerine (*trn*T-F, *matK*, *rbcL*) göre Mega programında (7.0) neighbor joining (NJ) ile çizdirilen kloroplast ağacında iki ana grup olduğu göze çarpmaktadır. *Populus tremula* (titrek kavak)' ya ait kloroplast dizileri dış grup olarak analizde kullanılmıştır. Altains *Salix* ve altains *Vetrix* üyeleri kloroplast dizi analizlerine göre yüksek yüksek tekrarlı (bootstrap) değerleri ile filogenetik ağaçta iki ayrı gruba ayrılmışlardır. Buna sebep olan substitüsyonlar (baz değişimleri) özellikle *trn* T-F geninde 39 baz değişimden kaynaklanmaktadır. Bu substitüsyonlar *rbcL* geninde ise 114, 264, 342, 603, 671, 690, 772, 952, 1120, 1156, 1243, 1261 ve 1457^{inci} baz pozisyonlarındaki değişimlerden kaynaklanmaktadır.

Altains *Salix*'in üyelerinin oluşturduğu grupta *Salix* seksiyonu üyeleri (*S.alba*, *S. excelsa*, *S. fragilis* ve *S. albaxfragilis*) birbirine çok yakın çıkmıştır (öz yazılım-bootstrap; 100). Morfolojik olarak melez olduğunu düşündüğümüz tür *S. albaxfragilis*, *S. alba*'dan çok *S. fragilis*'e yakın pozisyon aldığı görülmektedir. *İş paketi-2* için çalışılan *S. alba* ve *S. excelsa*'nın çok yakın olduğu ve çok fazla ayırım teşkil etmediği görülmektedir. *S. triandra* subsp. *triandra* ve *S. triandra* subsp. *bornmuelleri* alttürleri beklenildiği üzere birbirine çok yakın bulunmaktadırlar.

Altains *Vetrix*'te ise altains *Salix*'teki gibi aynı seksiyonu paylaşan üyeler çok yanyana konumlanmaktan çok daha dağınık bulunmaktadırlar. Yine de seksiyon *Helix*, *Vetrix* ve *Vimen* üyeleri kloroplast verilerine göre çizdirilen ağaçta genel olarak birarada bulunmaktadır. Altains *Vetrix* içerisinde 2 adet grup bulunmaktadır. Bunlardan birinci grup üç adet alt kol ihtiva etmektedir. Bunlar; *S. pseudomedemii*-*S. pseudodepressa*-*S. viminalis*-*S. armenorossica* (1.alt grup), *S. cinerea*-*S. aegyptiaca*-*S. myrsinifolia* (2. alt grup), *S. apoda*-*S. caprea*-*S. caucasica*-*S. pedicellata* subsp. *pedicellata* (3. alt grup). Bu ana gruba dışarıdan *S. elaeagnos* kardeş grup olarak bağlanmıştır. Altains *Vetrix*'in ikinci ana grubu ise bir alt grup içermektedir. *S. wilhelmsiana*-*S. rizeensis*-*S. purpurea* subsp. *leucodermis*. Bu alt gruba en dışarıdan iki tür kardeş grup olarak eklenmektedir. *S. amplexicaulis* ve *S. elbursensis*, *S. amplexicaulis* türünün altains *Vetrix*'in tabanında ve altains *Salix*'e bu kadar yakın olması özellikle *matK* gen bölgesindeki 370, 533, 780 ve 1634'ncü bazlarındaki substitüsyonlardan kaynaklanmaktadır.



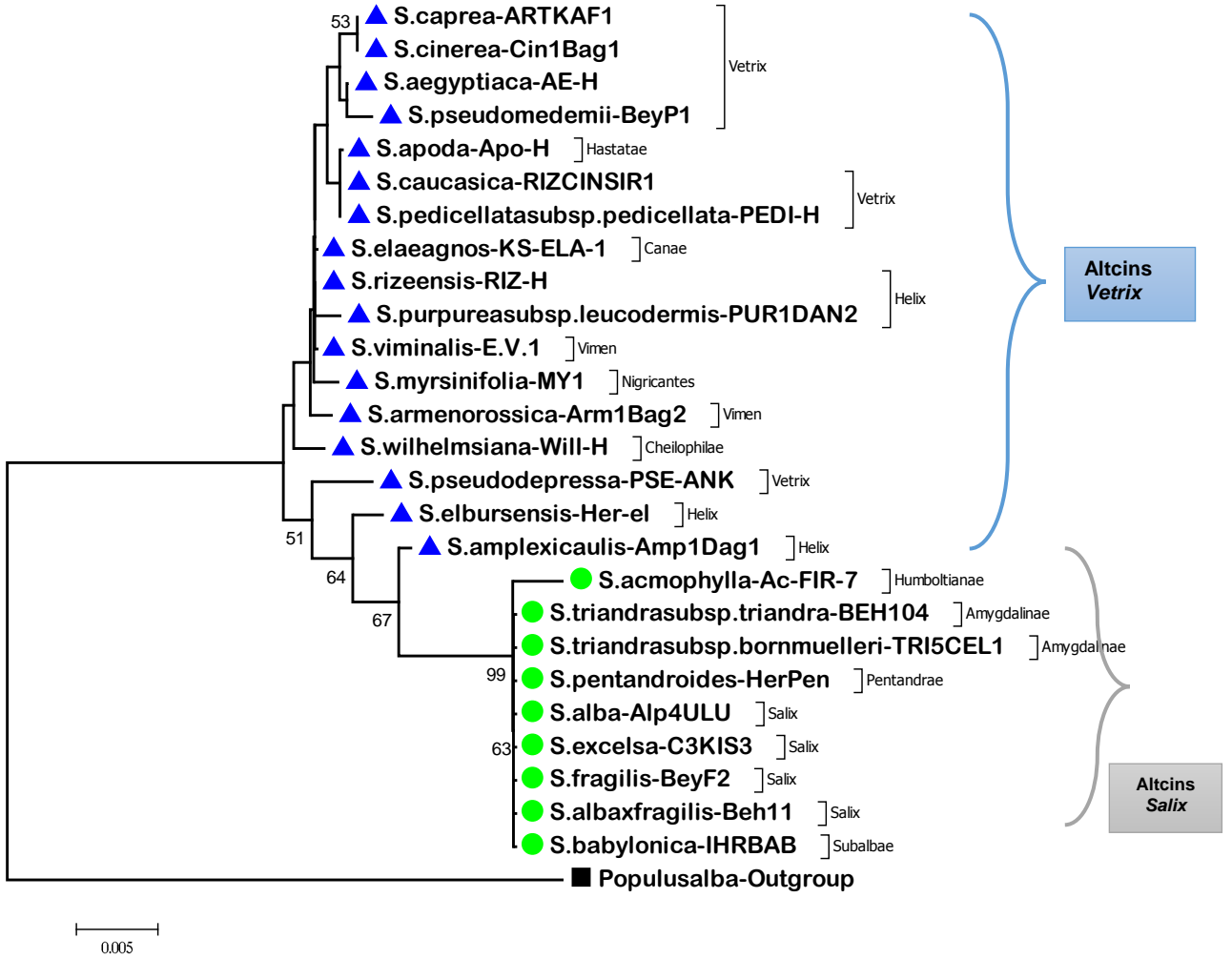
Şekil 14: Kloroplastın *trn* T-F, *matK* ve *rbcL* bölgelerine göre 24 *Salix* türü ve 1 *Salix* melezi için NJ ile elde edilen Filogenetik Ağaç. Filogenetik ağaç dalları üzerindeki numaralar: öz yazılım (bootstrap) değerleri. ●: Altains *Salix*. ▲: Altains *Vetrix*. ■; Dış grup (outgroup).

Çekirdek genomu *ITS* gen bölgesi verilerine göre oluşan filogenetik ağaçta altains *Salix* üyeleri %99 öz yazılım (bootstrap) değeri ile bir grup oluşturmaktadır. Altains *Vetrix* üyeleri ise bu gruba dışarıdan eklenmekte ve kendi içinde küçük gruplar oluşturarak ağaçta yerlerini almaktadırlar. Bu ayırmadan sorumlu substitüsyonlar; 57, 99, 125, 128, 143, 181, 188, 246, 391, 421, 501 ve 564' üncü baz pozisyonları ile 576'ıncı baz pozisyonundaki delesyondur (indel). Çekirdek *ITS* diğer kloroplast gen bölgelerine göre çok daha kısa olmasına rağmen altainsleri sınıflandırması açısından en çok bilgilendirici bölgeye sahiptir.

En yakın türler: *S. alba*, *S. excelsa*, *S. fragilis*, *S. albaxfragilis*, *S. triandra* subsp. *triandra*, *S. triandra* subsp. *bornmuelleri* ve *S. babylonica* türleri yüksek öz yazılım (bootstrap) değeri ile beraber bir ana grup oluşturmaktadırlar. *S. babylonica* bu gruptaki en alt pozisyonu

almaktadır. *S. acmophylla* 54'üncü baz pozisyonundaki spesifik substitüsyon ile bu gruptaki (altcins *Salix*) en uzak konuma sahiptir.

Altcins *Vetrix* üyelerinin tek bir ana grup oluşturduğu görülmemektedir. Bundan çok altcins *Vetrix* altındaki seksiyon *Vetrix* üyeleri *S. caprea*-*S. cinerea*-*S. aegyptiaca*-*S. pseudomedemii* türlerinin bir alt grup oluşturduğu söylenebilir. Özellikle *S. caprea* ve *S. cinerea* çekirdek ITS gen bölgesindeki 605. bazdaki değişime bağlı olarak ağaçtaki en yakın türlerdir. Diğer altcins *Vetrix* üyeleri, *S. pseudodepressa*, *S. elbursensis* ve *S. amplexicaulis* çok uzakta yer alıp, altcins *Salix*'e yakın oldukları gözlenmiştir. Özellikle *S. amplexicaulis* türünün altcins *Salix*'e altcins *Vetrix*'ten daha yakın olmasına sebep olan substitüsyonlar 57, 99, 145, 421, 501 ve 564^{üncü} baz pozisyonlarıdır.



Şekil 15: Çekirdek rDNA ITS bölgesine göre 24 *Salix* türü ve 1 *Salix* melezi için NJ ile elde edilen Filogenetik Ağaç (Dallardaki numaralar: öz yazılım (bootstrap) değeri. ●: Altcins *Salix* ▲: Altcins *Vetrix*, ■: Dış grup (outgroup),]; Seksiyon.

4.3 Türkiye nehir sistemlerinde *Salix alba*-*S. excelsa* teşhisi (İş paketi 1-ek)

Bu ilave iş paketinde her popülasyondan alınan söğüt örneklerde (69) *matK* gen bölgesine ait dizi analizi ancak 62 tanesinde gerçekleştirilebilmiştir. Bunun sebebi kloroplast *matK* gen bölgesinin uzun olmasından kaynaklanan PCR çalışmalarında istenilen bölgenin çoğaltılmasında sıkıntı yaşanabilmektedir. Bu ilave iş paketinde *S. alba* / *S. excelsa* tayini yapabilmek için sadece bir adet kloroplast gen bölgesine bakılmıştır. Diğer çekirdek gen bölgelerine kıyasla (*ITS* ve *ETS*) *matK* gen bölgesinin moleküler parametrelerinden GC içeriği düşük çıkmıştır (%31,5). 1093 bç'nden 2 tanesi *S. alba/excelsa* örnekleri için çeşitlilik göstermekte ve her ikisi de bilgilendiricidir. Tranzisyonel çiftlerin sayısı çok olduğu için (69,88). R değeri 2,0 olduğu gözlenmiştir. Nükleotid çeşitlilik parametresi *matK* geni kodlanan

bir kloroplast geni olduğu için çok düşüktür (0,001). *matK* geninde lharadan toplanan populasyonlara bağlı olarak 2 insersiyon (indel) bulunmaktadır.

Çekirdek *ETS* gen bölgesi küçük (343bç) olduğu için PCR çalışmaları daha kolay olmuş ve 69 söğüt örneğinden genin çoğlatılmasında hiçbir sorun yaşanmamıştır. Her iki çekirdek gen bölgesinde de (*ITS* ve *ETS*) GC içeriği yüksek çıkmıştır. Bu değer *ITS* gen bölgesinde en yüksek sayıya ulaşır (64,9). Çekirdek genlerinde *S. alba/excelsa* ayrımı için varyasyon gösteren *ITS* için 3, *ETS* için ise 5 adet bulunmaktadır. Bunların her biri bilgilendiricidir. *ITS* gen bölgesinde tranzisyonel ve transversiyonel çiftlerin eşit olarak dağılmasından dolayı R değeri 1,0 olarak hesaplanmıştır. *ETS* bölgesinde ise transversiyonel çiftlerin sayısının çok yüksek olması (77,10) bu değer 0,28'e düşmesine sebep olmuştur. Nükleotid çeşitliliği parametresine göre *ETS* gen bölgesi diğer iki bölgeye göre (*matK* ve *ITS*) en polimorfik gen bölgesidir (0,005).

Tablo 17: *S.alba* ve *S.excelsa*'ya yönelik çalışılan kloroplast ve çekirdek gen bölgelerinde belirlenen moleküler çeşitlilik parametreleri.

<i>Moleküler Çeşitlilik Parametreleri</i>	<i>matK</i>	<i>ITS</i>	<i>ETS</i>
Kullanılan Dizi sayısı	62	64	69
Toplam uzunluk (bç)	1093	656	343
GC içeriği (%)	31,5	64,9	60,3
Korunmuş bölge (bç)	1091	653	338
Çeşitlilik gösteren baz pozisyon sayısı	2	3	5
Parsimony bilgilendirici baz pozisyon sayısı	2	3	5
Tranzisyonal çiftler	69,88	52,38	22,90
Transversiyonal çiftler	30,12	47,62	77,10
Tranzisyon /Transversiyon (R) Bias (R)	2,0	1,0	0,28
Indel	2	-	-
Nükleotid Çeşitliliği	0,001	0,002	0,005

4.4 *S. alba*-*S.excelsa* filogenetik ağaçlarının değerlendirilmesi

Morfolojik olarak tür tayini yapılamayan söğüt türlerinde (23 Popülasyonx3=69) belirlenen sekans dizileri (markörler) ile moleküler filogenetik analiz yapılmıştır. Kloroplast *matK* gen bölgesine göre filogenetik ağaç çizdirilmiştir (Şekil 16). Daha önceki verilerimize göre, *S.alba* ve *S.excelsa* olduğu düşünülen şablon türlerde analize eklenmiştir. Tablo 18 'de kloroplast (*matK*) ve çekirdek (*ITS* ve *ETS*) gen bölgelerindeki substitüsyonların *S.alba* ve *S.excelsa*

olma durumuna göre değişim göstermektedir. *matK* gen bölgesinde 2 adet baz değişimi, *ITS* gen bölgesinde 3 adet, *ETS* bölgesinde ise en kısa çekirdek bölgesi olmasına rağmen 5 adet baz değişimi olarak *S.alba* ve *S.excelsa* türlerinde farklılıklar görülmektedir. Her gen bölgesindeki bu substitüsyonlar 2 türü ayırırda bilgilendirici iken *ETS* gen bölgesinin 53'üncü baz pozisyonunda *S.alba/excelsa* değişiminden çok, tür içerisinde coğrafik izolasyona bağlı olan bir baz değişimi söz konusudur (Tablo 18).

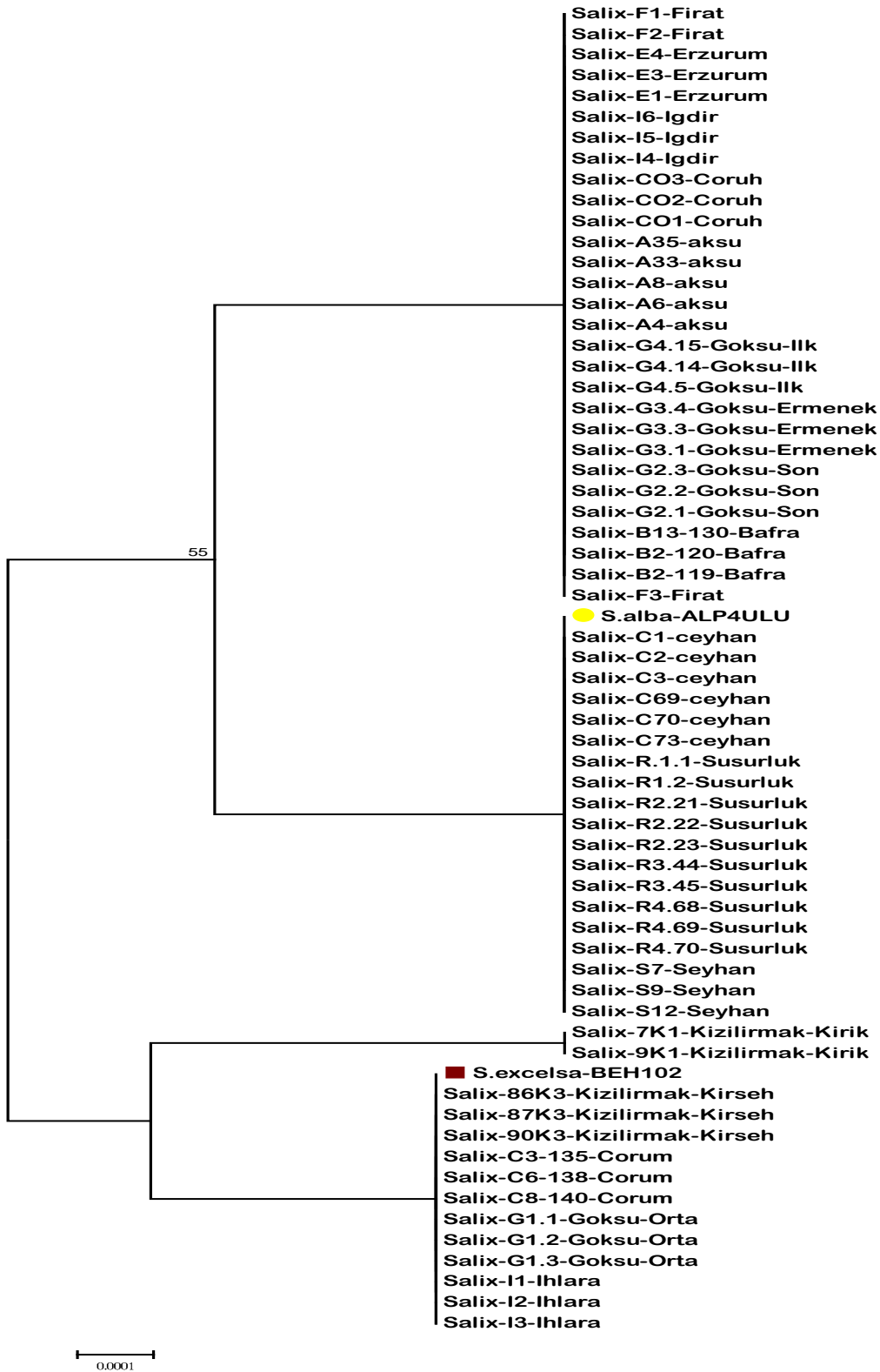
Tablo 18 : *S.alba/S. excelsa* tür tayinini belirleyen 3 gen bölgesine (*matK*, *ITS* ve *ETS*) ait substitüsyon bazları ve pozisyonları (A: adenin, G: guanin, C: sitozin, T: timin)

Gen	<i>matK</i>		<i>ITS</i>			<i>ETS</i>				
Substitüsyon No	211	469	139	465	651	9	34	47	53*	297
<i>S.alba</i>	G	A	C	G	G	A	T	T	T	C
<i>S.excelsa</i>	A	C	T	T	A	T	G	G	T	T

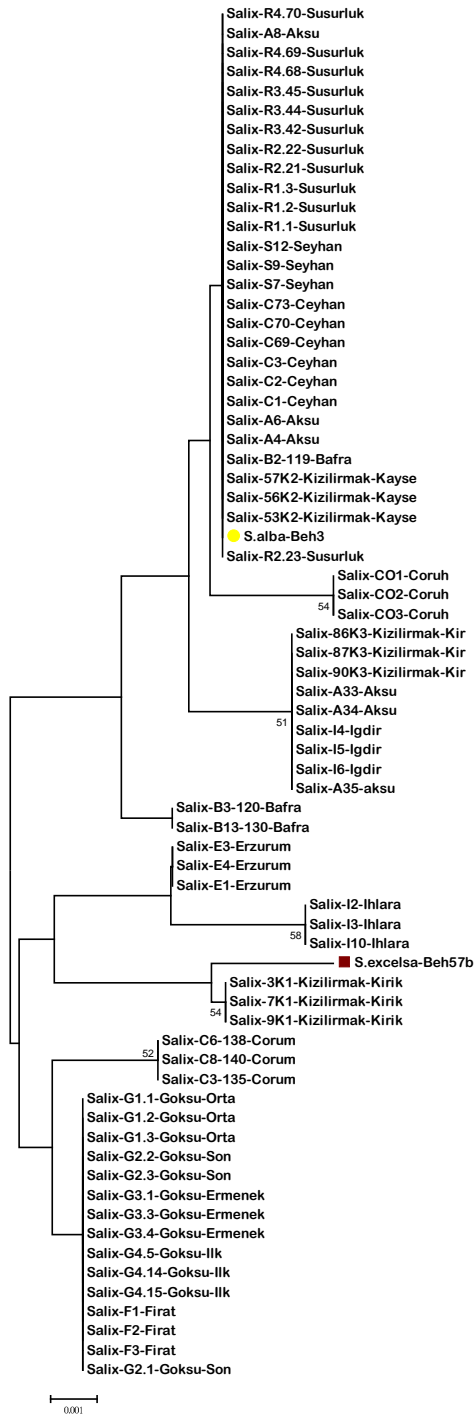
**Salba/excelsa* tayini açısından bilgilendirici olmasa da coğrafik olarak tür içi varyasyonlar için bilgilendiricidir.

Gen bölgelerindeki değişimlere bağlı olarak dizi analizlerinde NJ metodu ile MEGA programında (7.0) filogenetik ağaçlar çizdirilmiştir. Kloroplast *matK* bölgesi dizilerine göre çizdirilen ağaçta popülasyonlar iki şablon türün (*S. alba/excelsa*) etrafında yayılım göstermiştir. Daha detaylı olarak, ana gruplardan bir tanesinde Erzurum, İğdır, Fırat, Çoruh, Aksu 1-2, Göksu ilk, Göksu Ermenek, Göksu Son, Bafra, Ceyhan1-2, Susurluk R1-2-3-4 ve Seyhan popülasyonlarına ait bireyler filogenetik ağaçta net bir şekilde *S.alba* etrafına konuşlanmışlardır (Şekil 16). Kızılırmak Kırşehir, Kızılırmak Kırıkkale, Çorum, Göksu Orta ve Ihlara popülasyonu bireyleri ise birkaç dallanma yapsa da genel olarak *matK* filogenetik ağacında *S.excelsa* türü etrafında bulunmaktadırlar. Çekirdek *ITS* ve *ETS* dizilerinin birleştirilerek oluşturulan NJ filogenetik ağacında ise *matK* ağacından daha fazla gruplara ayrılması göze çarpmaktadır. Yine de genel olarak iki ana grup etrafında popülasyona ait bireyler toplanmıştır. İlk ana kolda, Susurluk R1-2-3-4, Seyhan, Ceyhan 1-2, Aksu 1, Kızılırmak Kayseri *S. alba*'ya yakın konumlanmışken, Çoruh, Kızılırmak Kırşehir, Aksu 2, İğdır ve Bafra popülasyonları alttan kollar ile *S. alba* ana grubuna eklenmektedirler. Diğer ana grupta ise Göksu orta, Göksu son, Göksu Ermenek, Göksu ilk ve Fırat *S.excelsa*'ya yakın konumlanırken, Erzurum, Ihlara, Kızılırmak Kırşehir ve Çorum popülasyonları ise dışardan dallanma yaparak ve filogenetik ağaçta *S. excelsa* ana koluna yakın bir pozisyon almışlardır.

Tür tayini (*S.alba/excelsa*) yapılmak istenen popülasyonların kloroplast ve çekirdek filogenetik ağaçtaki konumları net bir taksonomik ayırım yapamazken, popülasyonların türlere olan yakınlığını ifade edebilmektedir. Çekirdek ve kloroplast filogenetik ağaçlarında popülasyonların türlere yakınlığı farklılık göstermektedir (Tablo 18). Bazı popülasyonlar her iki bölgeye göre aynı tür (*S.alba-alba*) çıkarken bazı popülasyonlarda iki bölge farklı ayırım (*S.alba-excelsa*) yaptığı görülmüştür. Bu durum Söğüt türlerin dioik yapısından kaynaklanan döllenmeyi sağlayacak dişi bireyin bir ağaçta ve erkek çiçeğin farklı bir ağaçta olmasıyla açıklanmaktadır. Anneye ait kalıtım materyali kloroplast DNA'sı tek bir atadan soy ağacında devam etmekte iken çekirdek DNA'sı hem anne hem babaya ait genleri ifade eden rekombinasyon ürünüdür (Allendorf ve Luikart, 2007). Tür tayinin yapılırken çekirdek ve kloroplast DNA'sına göre iki farklı sonucun görüldüğü durumlarda, ilave değerlendirmeler yapılabilir. Dişi çiçek yumurta hücresi annesel kloroplast DNA'sını içerirken, melezlenme sonucu polenini farklı tür erkek bireyden alan bireylerde çekirdek DNA'sı, kloroplast DNA'sından farklı tür olarak belirlenebilmektedir (Tablo 19). Bu melezlenme durumu, Kızılırmak Kırşehir, Göksu ilk, Göksu Ermenek, Göksu son, Fırat ve Erzurum popülasyonlarında gözlenmiştir. Melezlenmeler ve her iki filogenetik ağaçta popülasyonların farklı bir türe yakın durması tam bir taksonomik ayırım yapmayı zorlaştırmaktadır.



Şekil 16: *S.alba* ve *S.excelsa*'ya yönelik. Kloroplast *matK* gen bölgesine göre NJ ile elde edilen Filogenetik Ağaç.



Şekil 17: *S.alba* ve *S.excelsa*'ya yönelik çekirdek ITS ve ETS gen bölgelerine göre NJ ile elde edilen filogenetik ağaç.

Tablo 19: Her popülasyondan alınan söğüt türlerinin çekirdek (*ITS* ve *ETS*) ve kloroplast (*matK*) gen bölgesi ağaçlarına göre *S.alba* / *S.excelsa* tayini ve değerlendirilmesi.

No	Popülasyon İsmi	cpDNA <i>matK</i>	rDNA <i>ETS-ITS</i>	Değerlendirme
1	K1 (3-7-9)KIRIKKALE	Excelsa	Excelsa	Excelsa
2	K2(53-56-57)KAYSERİ	Alba	Alba	Alba
3	K3(86-87-90) KIRŞEHİR	Excelsa	Alba	Melezlenme (excelsa ♀ X alba ♂)
4	B2-3 (2-3-13)BAFRA	Alba	Alba (ex!)*	Alba *
5	C (3-6-8) ÇORUM	Excelsa	Excelsa	Excelsa
6	G1(1-2-3)ORTA	Excelsa	Excelsa	Excelsa
7	G2(1-2-3)SON	Alba	Excelsa	Melezlenme (alba ♀ X excelsa ♂)
8	G3(1-3-4)ERMENEK	Alba	Excelsa	Melezlenme (alba ♀ X excelsa ♂)
9	G4(5-14-15)İLK	Alba	Excelsa	Melezlenme (alba ♀ X excelsa ♂)
10	A1 (4-6-8)AKSU	Alba	Alba	Alba
11	A2 (33-34-35)AKSU	Alba	Alba (ex!)*	Alba
12	F(1-2-3)FIRAT	Alba	Excelsa	Melezlenme (alba ♀ X excelsa ♂)
13	I (4-5-6)İğdir	Alba	Alba	Alba
14	I (2-3-10)İhlara	Excelsa	Excelsa	Excelsa
15	E(1-3-4)Erzurum	Alba	Excelsa	Melezlenme (alba ♀ X excelsa ♂)
16	C1 (1-2-3)Ceyhan	Alba	Alba	Alba
17	C2 (69-70-73)Ceyhan	Alba	Alba	Alba
18	S (7-9-12)Seyhan	Alba	Alba	Alba
19	Co (1-2-3)Çoruh	Alba	Alba (ex!)*	Alba
20	R1 (1-2-3)Susurluk	Alba	Alba	Alba
21	R2 (21-22-23)Susurluk	Alba	Alba	Alba
22	R3 (42-44-45)Susurluk	Alba	Alba	Alba

*Popülasyonda genel bir türe yakınlık hakimken 1 bireyde diğer türe yakınlık gözlenmektedir.

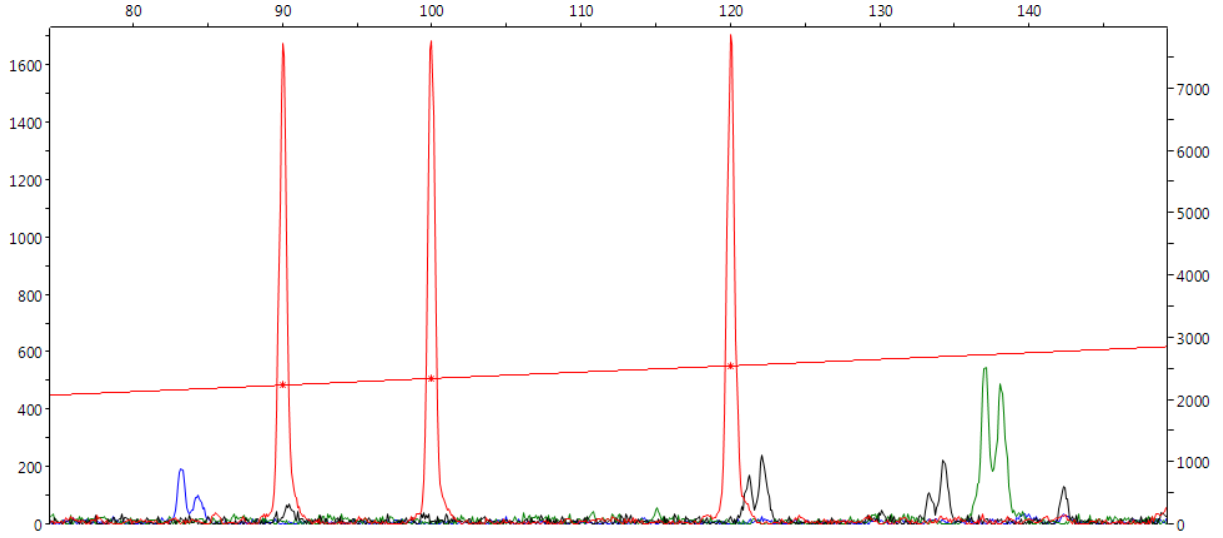
4.5 *Salix alba* populasyonlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve genetik yapılarının karakterizasyonu (İş Paketi 2)

4.5.1 DNA İzolasyonu ve PCR

Gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi. 10 nehirden örneklenen 23 popülasyona ait 643 *Salix alba* genotipinin DNA'ları "fenol kloroform oktonol" yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığını görmek için örnekler %1'lik agaroz jelde 30 dakika elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Ayrıca elde edilen DNA'lar. DNA konsantrasyonları ve saflığı spektrofotometre ile ölçülmüştür. DNA konsantrasyonlarının ölçüm sonuçlarının 50-100ng/μl arasında ve DNA saflık oranlarını gösteren A260/280nm değerlerinin 1.8-1.9 arasında olması göz önünde bulundurulmuştur. DNA konsantrasyonu ölçümü sonuçlarına göre stok DNA'lar PCR uygulaması için 10-20 ng/μl olacak şekilde sulandırılıp. uygun PCR koşulları uygunlanmıştır.

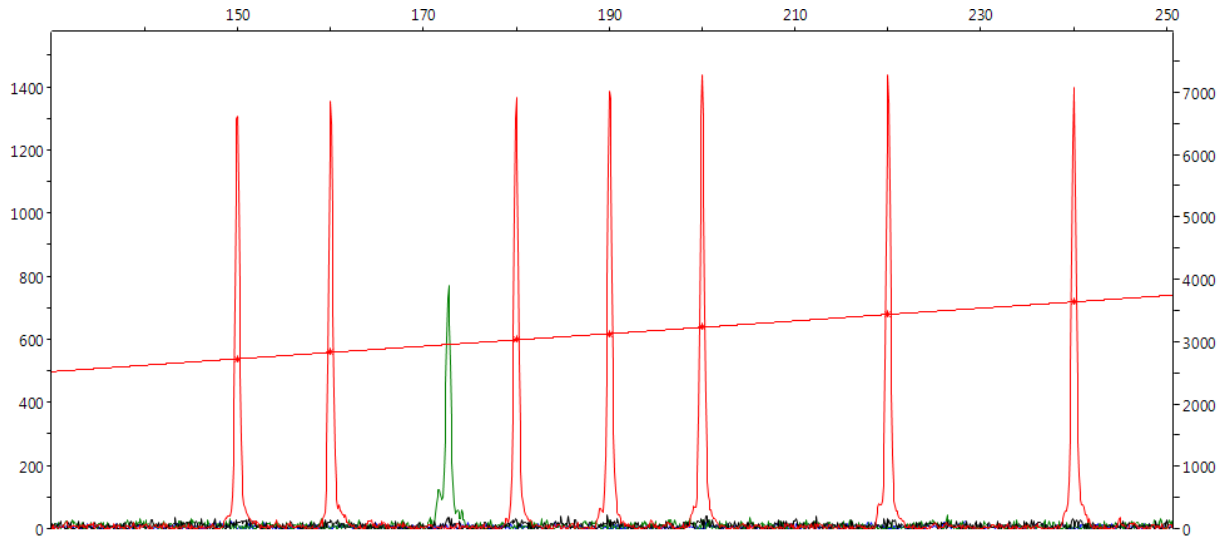
4.5.2 Fragment Analizi

Analiz programı ile (Peak Scanner software v1. Applied Biosystems. CA. ABD) elde edilen pikler her örnek için ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Şekil 18). Her örneğin fragment uzunluğu ve elde edilen pik sayısına göre homozigot ya da heterozigot olma durumu belirlenmiştir (Şekil 19). SSR lokusların ait çoğaltılan DNA'lara ilgili fragment uzunluklarının dağılımı Tablo 20'de verilmiştir.

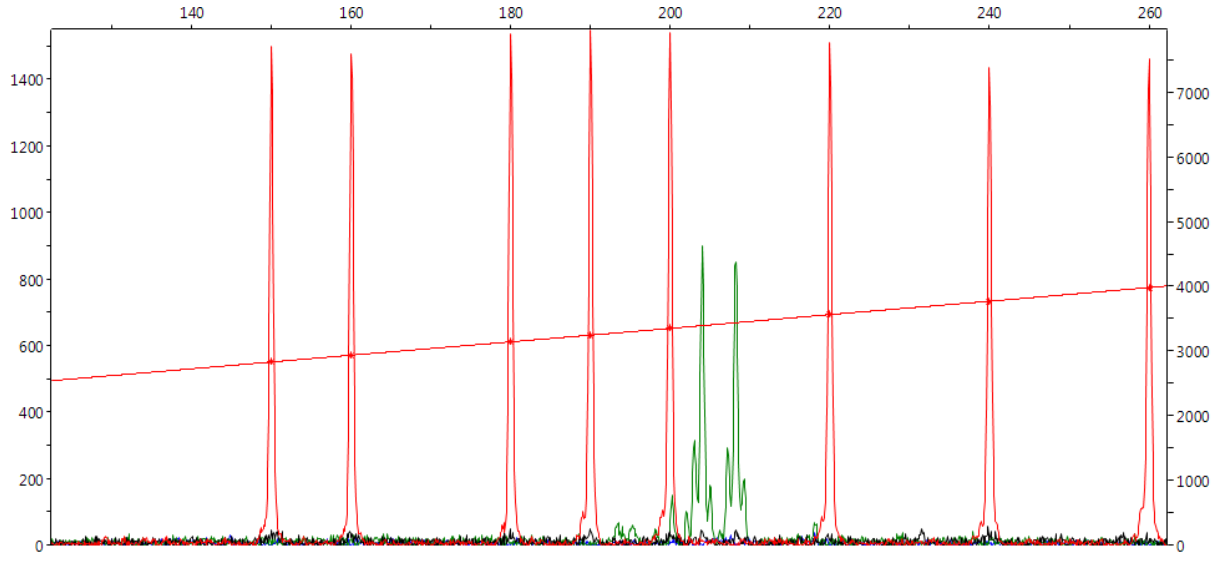


Şekil 18: Farklı renkte boyanan SSR primerlerini analiz programı ile (Peak Scanner software v1.0) değerlendirme. Mavi, siyah ve yeşil pikler farklı SSR lokuslarını kırmızı pik ise kontrolü temsil etmektedir.

A)



B)



Şekil 19: Pik profiline göre örneklenen her genotipin homozigot (A) ya da heterozigot (B) olma durumunun belirlenmesi.

Tablo 20: Fragment analizi yöntemi ile örneklerin fragment (alel) uzunluklarının dağılımı.

No	SSR lokusu	Alel Aralığı	Alel Sayısı	Aleller
1	Sare03	72-213	24	72, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 115, 117, 119, 153, 213
2	Sare04	73-180	29	73, 76, 80, 83, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 130, 132, 134, 180
3	Sare08	107-190	25	107, 120, 125, 127, 131, 134, 136, 139, 141, 143, 145, 147, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 167, 173, 176, 180, 184, 190
4	SB24	113-160	17	113, 116, 118, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 158, 160
5	SB194	104-118	6	104, 108, 111, 113, 115, 118
6	SB196	150-185	11	150, 153, 158, 160, 164, 167, 170, 173, 177, 180, 185
7	SB233	170-259	34	170, 172, 176, 178, 181, 184, 186, 190, 193, 195, 197, 200, 202, 204, 207, 209, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 228, 234, 236, 240, 243, 245, 247, 251, 253, 255, 259
8	SB243	81-126	9	81, 84, 100, 102, 104, 108, 110, 113, 126
9	SB265	110-139	5	110, 132, 135, 137, 139
10	SB493	206-245	13	206, 208, 210, 212, 214, 216, 220, 223, 226, 233, 238, 242, 245
11	W293	107-160	20	107, 111, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 131, 133, 135, 137, 141, 143, 146, 151, 154, 160
12	W784	144-169	10	144, 147, 150, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 169
13	gSIMCT024	266-304	13	266, 276, 278, 280, 284, 287, 289, 293, 296, 298, 300, 302, 304
14	PMGC2709	160-224	22	160, 166, 174, 180, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 224
15	PMGC2889	174-222	19	174, 178, 182, 184, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 222
TOPLAM			257	

4.5.3 Genetik verilerin değerlendirilmesi

4.5.3.1 Genetik çeşitliliğin nehirler arası yapılanması

10 nehirden örneklenen 643 *Salix alba* genotipi için toplanan SSR verileri GDA programında analiz edilip sonuçlar Tablo 21' de, lokuslar için hesaplanan Fis, Fit ve Fst değerleri ise Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 21: Tüm *Salix alba* populasyonlarında lokuslara ait genetik çeşitlilik parametreleri (Polimorfizm oranı (P), gözlenen alel sayısı (Ap), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho) kendileme katsayısı/ populasyon (Fis), kendileme katsayısı/ populasyon (Fit) ve Genetik farklılaşma (Fst)).

Lokus	Özgün Alel	P	Ap	Ho	He	Fis
Sare03	7	1	25	0,74	0,92	0,20
Sare04	6	1	30	0,75	0,93	0,20
Sare08	7	1	25	0,70	0,90	0,22
SB24	4	1	18	0,54	0,85	0,37
SB194	1	1	7	0,56	0,55	-0,02
SB196	3	1	11	0,13	0,16	0,19
SB233	5	1	35	0,75	0,82	0,09
SB243	1	1	8	0,63	0,68	0,08
SB265	-	1	6	0,26	0,36	0,26
SB493	4	1	14	0,54	0,63	0,15
W293	4	1	21	0,76	0,64	-0,18
W784	6	1	10	1,00	0,56	-0,77
gSIMCT024	-	1	11	0,91	0,75	-0,21
PMGC2709	4	1	23	0,63	0,83	0,25
PMGC2889	3	1	20	0,77	0,82	0,07
Ortalama		1	17,6	0,69	0,64	0,07

Tablo 22: Lokuslar için hesaplanan Fis, Fit ve Fst değerleri.

Lokus	Fis	Fit	Fst
Sare03	0,15	0,21	0,08
Sare04	0,15	0,21	0,07
Sare08	0,17	0,23	0,07
SB24	0,28	0,38	0,14
SB194	-0,03	-0,02	0,02
SB196	0,14	0,19	0,07
SB233	0,05	0,10	0,05
SB243	0,02	0,08	0,06
SB265	0,23	0,27	0,05
SB493	-0,01	0,17	0,18
W293	-0,22	-0,17	0,04
W784	-0,79	-0,76	0,01
gSIMCT024	-0,25	-0,20	0,04
PMGC2709	0,14	0,26	0,14
PMGC2889	0,00	0,08	0,08
Ortalama	0,01	0,08	0,08

10 nehir birlikte değerlendirildiğinde, Tablo 21’de lokusların istatistiksel sonuçlarına göre polimorfik lokus başına düşen ortalama allel sayısı 17.6 bulunmuştur. En düşük ortalama allel sayısı olan 6, 7 ve 8 olarak sırasıyla SB265, SB194 ve SB243 lokuslarında tespit edilmiştir. Her lokus için beklenen heterozigotluk (genetik çeşitlilik) 0,16 ile 0,93 arasında değişmiş ve ortalaması 0,69 olarak hesaplanmıştır. Ortalama gözlenen heterozigotluk (genetik çeşitlilik) 0,64 tür. En düşük H_o değeri (0,13) SB196 lokusunda gözlenmiştir. SB194, W293, W784 ve gSIMCT024 lokuslarında gözlenen heterozigotluk değerlerinin beklenenden yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Salix alba populasyonları için kendileşme katsayısı (inbreeding coefficients. F_{is}) 0,01’dir; bu değer populasyon içerisinde homozigot bireylerin az olduğunu göstermektedir. F_{it} ve F_{st} değerleri 0,08 olarak hesaplanmıştır.

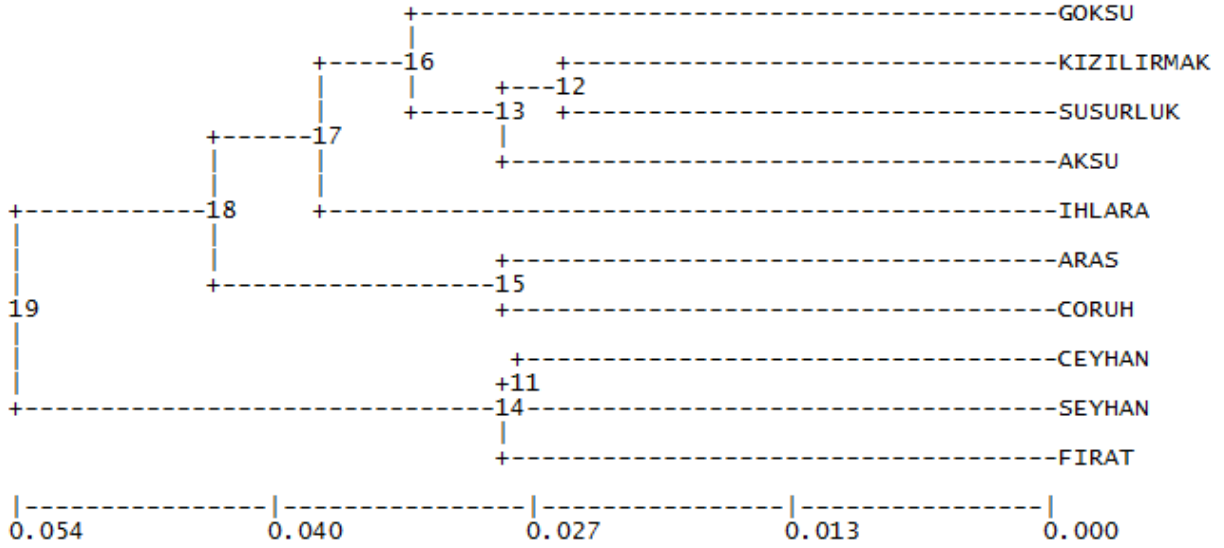
Tablo 23: Tüm nehirlerdeki *Salix alba* türüne ait populasyonlarında bulunan genetik çeşitlilik parametreleri. örnek Sayısı (N), ortalama Allel Sayısı (A), beklenen heterozigotluk (H_e), gözlenen heterozigotluk (H_o) kendileme katsayısı/ populasyon (F_{is}), kendileme katsayısı/ populasyon (F_{it}) ve Genetik farklılaşma (F_{st}).

Populasyon	N	Özgün Allel	(A)	H_o	H_e	f_{is}	f_{st}
GÖKSU	112	11	10	0,75	0,67	-0,12	
KIZILIRMAK	147	19	12	0,72	0,68	-0,05	
CEYHAN	74	1	6	0,50	0,56	0,10	
SEYHAN	29	1	5	0,50	0,57	0,12	
AKSU	58	8	8	0,54	0,64	0,16	
IHLARA	30	2	6	0,62	0,65	0,05	
ARAS	55	2	8	0,60	0,63	0,06	
FIRAT	25	-	5	0,52	0,54	0,04	
SUSURLUK	86	1	10	0,67	0,68	0,02	
ÇORUH	27	9	8	0,63	0,73	0,14	
Ortalama	64,3			0,60	0,64	0,05	0,08

Tanımlayıcı genetik çeşitlilik parametrelerine göre (Tablo 23), toplam özgün allel sayısı 54 olarak tespit edilmiştir. Lokus başına düşen ortalama allel sayısı en yüksek (19) Kızılırmak Nehri’nden örneklenen populasyonlarda en düşük değer ise Ceyhan, Seyhan, Fırat ve Susurluk Nehir’lerine ait populasyonlarda görülmüştür. Elde edilen bu veri Kızılırmak Nehri’nde genetik açıdan daha farklı genotiplerin olduğunu göstermektedir.

Ortalama beklenen heterozigotluk 0,64 ve gözlenen ise 0.60 tır. Projede kullanılan 15 lokus ve tüm nehirlerde bulunan populasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, Fst değeri 0,08 olarak hesaplanmıştır.

UPGMA phenogram



Şekil 20 : UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile oluşturulan genetik ilişki ağacı.

Genetik benzerliği ölçmenin yollarından bir başkası da genetik mesafe populasyon (ya da tür) çiftleri arasındaki genetik farklılıklarının büyüklüğünün (genetik mesafe) ölçülmesidir. Populasyonlar arasındaki genetik mesafeyi belirlemek için, 15 SSR lokusuna göre matrix oluşturulmuş ve bu matrix ile moleküler coancestry katsayısı kullanılarak UPGMA yöntemiyle genetik ağaç (dendrogram) çizdirilmiştir (Şekil 20). Tüm nehirlerde bulunan populasyonları birlikte değerlendirdiğimizde, dendrogram önce biri küçük diğeri büyük olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Büyük ana grup kendi icinde Aras-Çoruh Nehirleri ve Göksu-Kızılırmak-Susurluk-Aksu-Ihlara Nehirleri olarak iki gruba ayrılmıştır. Küçük ana grup ise Ceyhan-Seyhan-Fırat Nehirlerinden oluşmaktadır.

4.5.3.2 Genetik çeşitliliğin nehir bazında yapılanması

Birden fazla popülasyonu olan nehirlerde özgün alel sayısı, nehrin kendi popülasyonları değerlendirilerek belirtilmiştir. Tek popülasyon olan nehirlerde bu değer verilmemiştir. Özgün allel sayısı Göksu Nehri'nin yukarı ve aşağı popülasyonlarında, Kızılırmak Nehri'nin ise orta popülasyonunda, Ceyhan ve Aras Nehirlerinin yukarı popülasyonlarında, Aksu Nehri'nin son popülasyonunda ve Susurluk Nehri'nin Manyas popülasyonunda en fazla görülmüştür (Tablo 24).

Çalışılan tüm popülasyonlarda gözlenen heterozigotluk oranı yüksek ($H_o = 0,48-0,78$) ve benzer bulunmuştur. Göksu, Kızılırmak ve Susurluk Nehir'lerine ait popülasyonlar yukarı, orta ve aşağı popülasyon olarak dikkate alındığında Fis değerleri sırasıyla -0,18, -0,16, -0,03 olarak hesaplanmıştır. Yukarı ve orta nehir popülasyonlarında heterozigot fazlalığı olduğu görülmüştür.

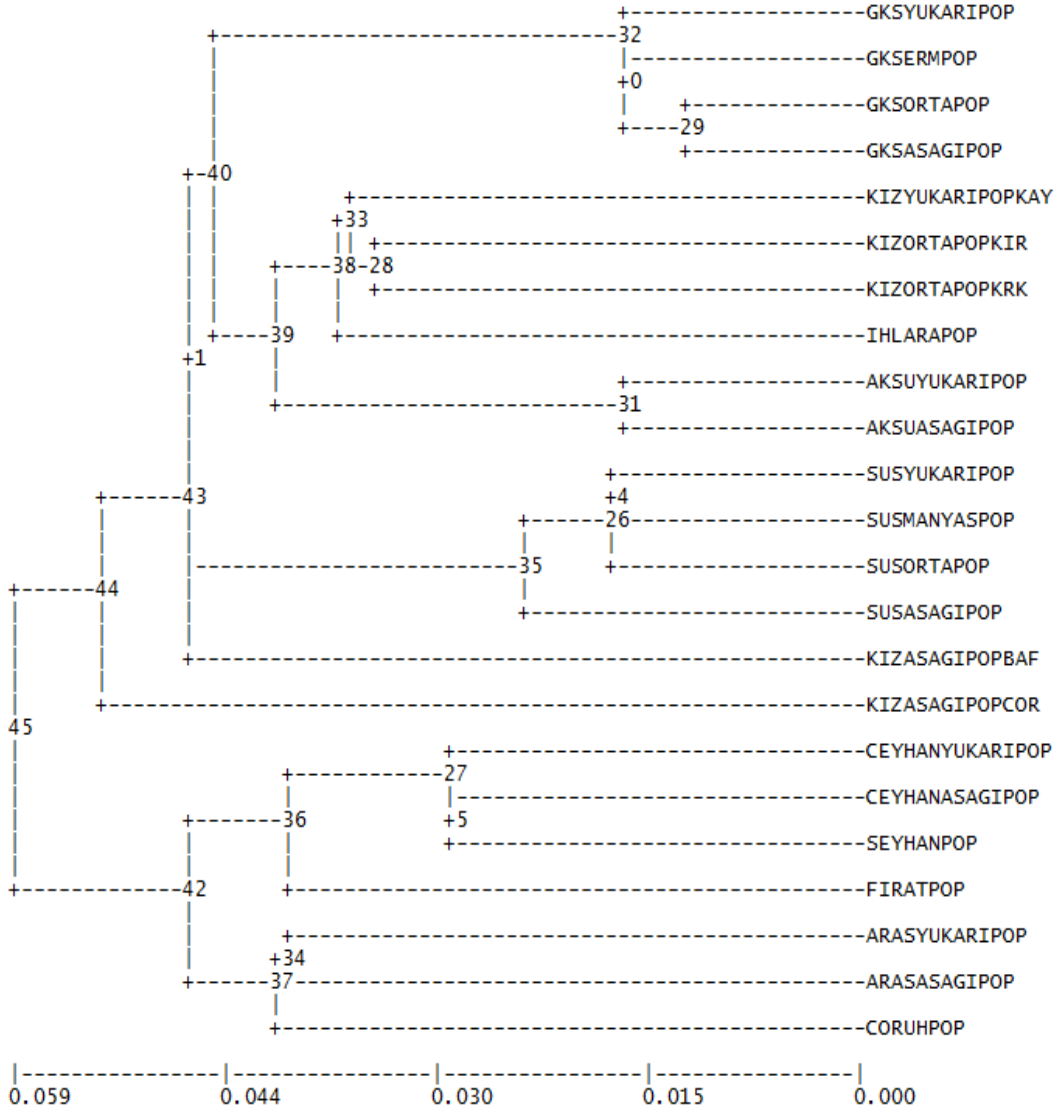
İki popülasyon ile temsil edilen Aras ve Ceyhan nehirlerinde ise aşağı popülasyonlarda genetik çeşitliliğin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aksu nehrinde ise, yukarı ve aşağı popülasyonlarda aynı oranda genetik çeşitlilik görülmüştür.

Genetik çeşitlilik nehir bazında değerlendirildiğinde, Göksu ve Kızılırmak popülasyonlarının sırasıyla ortalama Fis değerleri -0,13 ve -0,07 olarak bulunmuştur. Bu değer, Göksu ve Kızılırmak nehirlerinde daha fazla heterozigot birey olduğunu göstermektedir. Seyhan, Ceyhan, Ihlara, Aras, Fırat, Susurluk, Çoruh ve Aksu popülasyonlarının pozitif Fis değerleri bu nehirlerdeki homozigot bireylerin daha çok olduğunun göstergesidir. Nehir içindeki popülasyonların genetik farklılaşmaları incelendiğinde, çok büyük bir farklılaşmanın olmadığı görülmektedir. Çünkü tüm popülasyonların F_{st} değerleri 0,05'ten küçüktür (Tablo 24).

Tablo 24: Tüm nehirlerdeki *Salix alba* türüne ait populasyonlarında hesaplanan genetik çeşitlilik parametreleri.

Populasyon	N	Özgün Alel	A	Ho	He	Fis	Fst
GKSYUKARİPOP	31	10	8	0,71	0,66	-0,09	
GKSERMPOP	23	4	7	0,75	0,67	-0,12	
GKSORTAPOP	30	3	7	0,78	0,66	-0,18	
GKSAŞAĞİPOP	28	10	8	0,75	0,66	-0,13	
Ortalama	28			0,75	0,66	-0,13	0,02
KIZYUKARİPOP	33	8	8	0,70	0,67	-0,06	
KIZORTAPOP	32	6	8	0,72	0,69	-0,05	
KIZORTAPOP	52	11	9	0,75	0,65	-0,16	
KIZAŞAĞİPOP	15	4	6	0,67	0,61	-0,10	
KIZAŞAĞİPOP	15	7	6	0,68	0,69	0,00	
Ortalama	29			0,71	0,66	-0,07	0,05
CEYHANYUKARİPOP	40	14	5	0,48	0,55	0,13	
CEYHANAŞAĞİPOP	34	11	5	0,53	0,56	0,05	
Ortalama	37			0,50	0,55	0,09	0,004
SEYHANPOP	29	-	5	0,50	0,57	0,12	
AKSUYUKARİPOP	26	18	7	0,55	0,64	0,15	
AKSUAŞAĞİPOP	32	23	7	0,53	0,63	0,15	
Ortalama	27			0,54	0,64	0,15	0,02
IHLARAPOP	30	-	6	0,62	0,65	0,05	
ARASYUKARİPOP	27	19	7	0,58	0,62	0,07	
ARASAŞAĞİPOP	28	11	6	0,61	0,63	0,02	
Ortalama	27,5			0,60	0,63	0,05	0,02
FIRATPOP	25	-	5	0,52	0,54	0,04	
SUSYUKARİPOP	27	7	7	0,68	0,69	0,02	
SUSMANYASPOP	21	12	7	0,63	0,69	0,08	
SUSORTAPOP	18	3	6	0,69	0,67	-0,03	
SUSAŞAĞİPOP	20	8	6	0,62	0,62	0,00	
Ortalama	21,5			0,65	0,66	0,02	0,006
CORUHPOP	27	-	8	0,63	0,73	0,14	

UPGMA phenogram



Şekil 21 : Nehir bazında UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile oluşturulan genetik ilişki ağacı.

Nehir bazında, 15 SSR lokusuna göre matrix oluşturulmuş ve bu matrix ile moleküler coancestry katsayısı kullanılarak UPGMA yöntemiyle genetik ağaç (dendrogram) çizilmiştir (Şekil 21). Kızılırmak Nehri hariç, her nehirde bulunan popülasyonlar kendi içinde bir grup oluşturmuştur. Kızılırmak Nehri'nin aşağı kısmını oluşturan Çorum ve Bafra popülasyonları, aynı nehrin diğer kısımdaki popülasyonlarından ayrılmaktadır. Tüm nehirlerde bulunan popülasyonları birlikte değerlendirildiğinde, dendrogram yine önceki gibi biri küçük diğeri

büyük olmak üzere iki ana gruba ayırmıştır. Küçük ana grup kendi içinde Aras, Çoruh nehirlerine ait populasyonlar ve Ceyhan, Seyhan, Fırat nehirleri ait populasyonlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Büyük ana grup ise Göksu, Kızılırmak, İhlara, Aksu ve Susurluk nehirlerine ait populasyonlardan oluşmaktadır.

GenClone2.0 programı kullanılarak (Arnaud-Haond ve Belkhir, 2007) 643 örnekten sadece 2 bireyin aynı genotipe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu genotipler, İhlara (441-442 nolu genotipler) ve Aras nehrinin aşağı populasyonunda (453-454 nolu genotipler) bulunmuştur.

4.5.3.3 Türkiye bazında *Salix alba* populasyonların genetik yapılanması

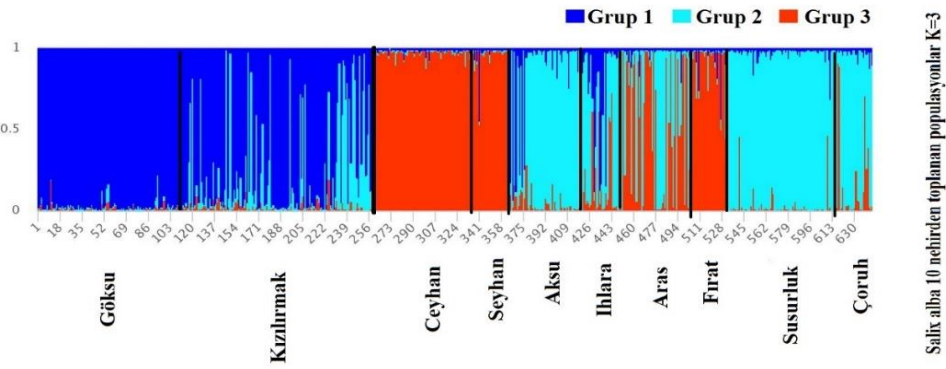
Genetik yapılanma analizi sonuçlarına göre 10 nehirden örneklenen 643 *Salix alba* genotipi 3 farklı genetik gruba (K=3) yerleştirilmiştir. Göksu ve Kızılırmak'tan örneklenen genotipler birinci grupta yer alırken; Ceyhan, Seyhan, Aras ve Fırat Nehir'lerinden örneklenen genotipler ikinci grubu meydana getirmişlerdir. Aksu, İhlara, Susurluk ve Çoruh Nehir'lerini temsil eden genotipler üçüncü grubu oluşturmuşlardır (Tablo 25, Şekil 22). Göksu, Ceyhan, Seyhan ve Susurluk Nehir'lerinden toplanan bireyler %100 gibi bir aitle kendi gruplarına yerleştirilmiştir. Kızılırmak nehrinden toplanan örneklerin %79'u Göksu Nehri ile aynı grupta, %21'i ise Aksu, İhlara, Susurluk ve Çoruh Nehri'nden toplanan örneklerin de dahil olduğu ikinci grupta yer almaktadır. Aksu Nehri'nden örneklenen ağaçların %86'sı, İhlara'dan örneklenenlerin %66'sı ve Çoruh'tan örneklenen bireylerin %89'u ikinci grupta yer almaktadır. Üçüncü grupta Ceyhan ve Seyhan ile birlikte yer alan Fırat ve Aras Nehir'lerinden toplanan örneklerin bu grupta olma oranları sırası ile %96 ve %56'dır. En düşük yüzde ile üçüncü gruba yerleştirilen Aras Nehri'nden örneklenen bireylerin %44'ü de ikinci grupta yer almaktadır. Şekil 22 ile 10 nehirden toplanan 643 *Salix alba* bireyinin 3 farklı genetik gruba ne oranda dağıldığını gösteren bilgiler verilmiştir. Mavi renk grup 1, turkuaz renk grup 2, ve kırmızı renk grup 3'ü göstermektedir. Nehirler birbirlerinden siyah kalın çizgilerle ayrılmıştır. Nehir bazında yapılan değerlendirmelerde Göksu ve Seyhan Nehri için K değeri 3 olarak belirlenmiştir. Geriye kalan 8 nehir için ise K=2 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 25 : 10 nehirde örneklenen 643 *Salix alba* genotipinin STRUCTURE genetik yapı analizi programı ile belirlenen 3 farklı genetik gruba ait olma sayısı ve yüzdeleri.

Nehir adı	Örneklenen ağaç sayısı			
		Grup1	Grup2	Grup3
Göksu	112	112(%100)		
Kızılırmak	147	117(%79)	30(%21)	
Ceyhan	74			74(%100)
Seyhan	29			29(%100)
Aksu	58	8(%14)	50(%86)	
Ihlara	30	5(%17)	20(%66)	5(%17)
Aras	55		24(%44)	31(%56)
Fırat	25		1(%4)	24(%96)
Susurluk	86		86(%100)	
Çoruh	27		24(%89)	3(%11)

Tablo 26 : 10 nehirde örneklenen 643 *Salix alba* genotipinin 3 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları

Nehir adı	Örneklenen ağaç sayısı	Grup1		Grup 2		Grup 3	
		0,8-0,9	<0,8	0,8-0,9	<0,8	0,8-0,9	<0,8
Göksu	112	112					
Kızılırmak	147	96	21	16	14		
Ceyhan	74					74	
Seyhan	29					28	1
Aksu	58	6	2	46	4		
Ihlara	30	4	1	14	6		5
Aras	55			17	7	24	7
Fırat	25				1	19	5
Susurluk	86			82	4		
Çoruh	27			21	3	2	1



Şekil 22 : Türkiye’de ki farklı coğrafik bölgeleri temsil eden 10 nehirden örneklenen 643 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizi testi sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler nehirleri birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 ‘i, turkuaz renk grup 2’yi kırmızı renk grup 3’ü temsil etmektedir.

4.5.3.4. Nehir bazında *Salix alba* populasyonlarının genetik yapı analizi

Türkiye’nin en uzun nehri olan Kızılırmak’tan 147 bireyden oluşan 5 populasyon örneklenmiştir. Structure genetik yapı analizi programına göre Kızılırmak Nehri’nden toplanan 5 populasyon iki farklı genetik gruba dahil olmaktadır. (Tablo 27, 28, Şekil 23). Örneklenen 147 bireyin 114’ ü birinci grupta 33’ ü ikinci grupta yer almaktadır. Bafra ve Çorum’dan örneklenen nehir aşağısı populasyonlardaki bireylerin hepsi birinci gruba aittir. Nehrin yukarisından örneklenen Kayseri populasyonundaki bireylerin %91’i i birinci grupta %9’ u ikinci grupta yer almaktadır. Orta populasyonu temsil eden Kırşehir ve Kırıkkale populasyonlarından Kırşehir’den örneklenen bireylerin çoğu birinci grupta yeralsada Kırıkkale populasyonunda bireyler çok yakın yüzdeler ile iki gruba ayrılmıştır(%56 ile birinci grup, %44 ile ikinci grup).

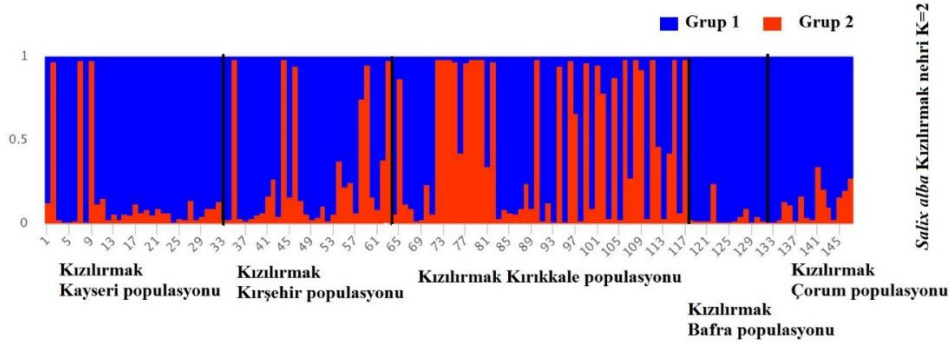
Tablo 27 : Nehirlerin bireysel olarak STRUCTURE genetik yapı analizi programı ile belirlenen farklı genetik gruplara ait olma sayısı ve yüzdeleri.

Nehir ismi	GÖKSU			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	Grup3
Yukarı populasyon	31	15(%48)	10(%32)	6(%20)
Ermemek populasyonu	30	11(%37)	6(%20)	13(%43)
Orta populasyon	23	6(%26)	6(%26)	11(%48)
Aşağı populasyon	28	9(%32)	14(%50)	5(%18)
Nehir ismi	KIZILIRMAK			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	
Kayser(Yukarı) populasyonu	33	30(%91)	3(%9)	
Kırşehir (Orta) populasyonu	32	25(%78)	7(%22)	
Kırıkkale (Orta) populasyonu	52	29(%56)	23(%44)	
Çorum (Aşağı) populasyonu	15	15(%100)		
Bafra (Aşağı) populasyonu	15	15(%100)		
Nehir ismi	CEYHAN			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	
Yukarı populasyon	40	22(%55)	18(%45)	
Aşağı populasyon	34	18(%53)	17(%47)	
Nehir adı	SEYHAN			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	Grup3
Seyhan populasyonu	29	9(%31)	12(%41)	8(%28)
Nehir	AKSU			
Örneklenen		Grup1	Grup2	

Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı			
Yukarı populasyon	26	16(%62)	10(%38)	
Aşağı populasyon	32	30(%94)	2(%6)	
Nehir adı	IHLARA			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	
Ihlara populasyonu	30	9(%30)	21(%70)	
Nehir adı	ARAS			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	
Erzurum populasyonu (Yukarı)	28	6(%21)	22(%79)	
İğdir populasyonu (Aşağı)	27	13(%48)	14(%52)	
Nehir adı	FIRAT			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	Grup3
Fırat populasyonu	25	13(%52)	12(%48)	
Nehir adı	SUSURLUK			
Örneklenen Populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	Grup3
Yukarı populasyon	27	16(%59)	11(%41)	
Manyas populasyonu	21	11(%52)	10(%48)	
Orta populasyon	18	8(%44)	10(%56)	
Aşağı populasyon	20	8(%40)	12(%60)	
Nehir adı	ÇORUH			
Örneklenen populasyonların isimleri	Toplam ağaç sayısı	Grup1	Grup2	
Çoruh populasyonu	29	14(%48)	13(%52)	

Tablo 28 : Kızılırmak Nehri'nden örneklenen 147 Salix alba genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları.

Örneklenen popülasyonların isimleri	Kızılırmak						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Kayseri (Yukarı) popülasyonu	33	30			3		
Kırşehir (Orta) popülasyonu	32	20	3	2	6	1	
Kırıkkale (Orta) popülasyonu	52	22	2	5	20	1	2
Çorum (Aşağı) popülasyonu	15	14	1				
Bafra (Aşağı) popülasyonu	15	11	3	1			

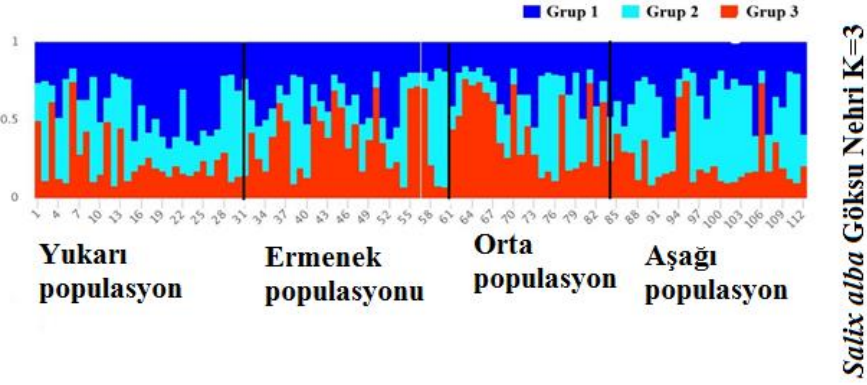


Şekil 23: Kızılırmak Nehri'nden 5 popülasyon olarak örneklenen 112 Salix alba genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizi testi sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler popülasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Türkiye'nin ikinci uzun nehri olan Göksu'dan 112 bireyden oluşan 4 populasyon örneklenmiştir. Nehrin yukarı, orta ve aşağısını temsilen 4 populasyon olarak örneklenmiştir. Örneklenen 112 bireyin 41' i birinci grupta 36' sı ikinci grupta ve 35' i de üçüncü grupta yer almaktadır. Yukarı populasyondaki bireylerin %48' i en yüksek aitlik oranıyla birinci grupta yer alırken, Ermenek ve orta populasyondaki bireylerin sırasıyla %43' ü ve %48' i en yüksek oranla üçüncü grupta yer almaktadır. Aşağı populasyonda yer alan bireylerin %50' i ikinci grubu teşkil etmektedir (Tablo 29, Şekil 24).

Tablo 29 : Göksu Nehri'nden örneklenen 112 *Salix alba* genotipinin 3 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.

Örneklenen Populasyonların isimleri	GÖKSU									
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2			Grup3		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Yukarı populasyon	31			15		1	9		1	5
Ermenek populasyonu	30			11		3	3		4	9
Orta populasyon	23			6			6		5	6
Aşağı populasyon	28			9		3	11		2	3

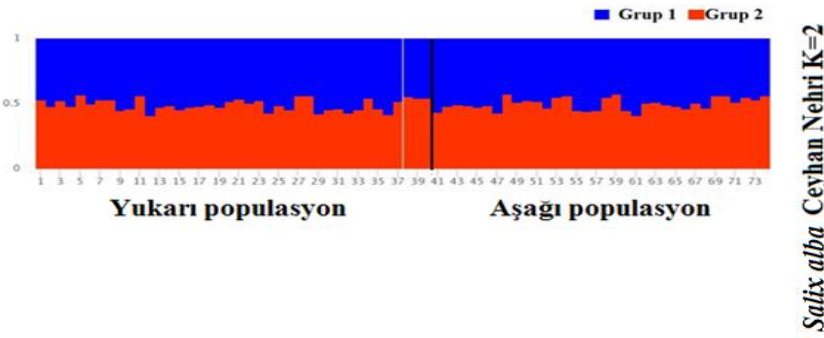


Şekil 24: Göksu Nehri'nden 4 populasyon olarak örneklenen 112 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, turkuaz renk grup 2'yi kırmızı renk grup 3'ü temsil etmektedir.

Ceyhan Nehri'nden örneklenen yukarı ve aşağı populasyonlar 2 genetik gruba ayrılmıştır. Yukarı populasyondan örneklenen bireylerin %55' i birinci grupta %45' i ikinci grupta yer alırken aşağı populasyondaki bireylerin %53' ü birinci grupta % 47'si de ikinci grupta yer almıştır (Tablo 27). Örneklenen populasyonlardaki bütün bireyler her iki genetik grubun özelliklerini taşımaktadır. Bireylerin gruplara ait olma katsayıları genellikle 0,5 e yakındır (Tablo 30, Şekil 25).

Tablo 30 : Ceyhan Nehri'nden örneklenen 74 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları.

Örneklenen populasyonların isimleri	CEYHAN						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Ceyhan yukarı populasyon	40			22			18
Ceyhan aşağı populasyon	34			18			17

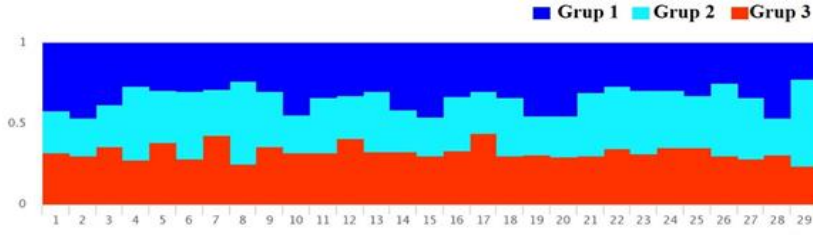


Şekil 25 : Ceyhan Nehri'nden 2 populasyon olarak örneklenen 74 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Seyhan Nehri'nden toplam 29 birey örneklenebilmiştir. Birey sayısının azlığına rağmen genetik yapı analizi ile 3 farklı grup bulunmuştur. Bireylerin %41' i ikinci grupta, %31' i birinci grupta %28' i de üçüncü grupta yer almıştır (Tablo 31, Şekil 26).

Tablo 31 : Seyhan Nehri'nden örneklenen 29 *Salix alba* genotipinin 3 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.

Örneklenen Populasyonların isimleri	SEYHAN									
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2			Grup3		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Seyhan populasyonu	29			9			12			8



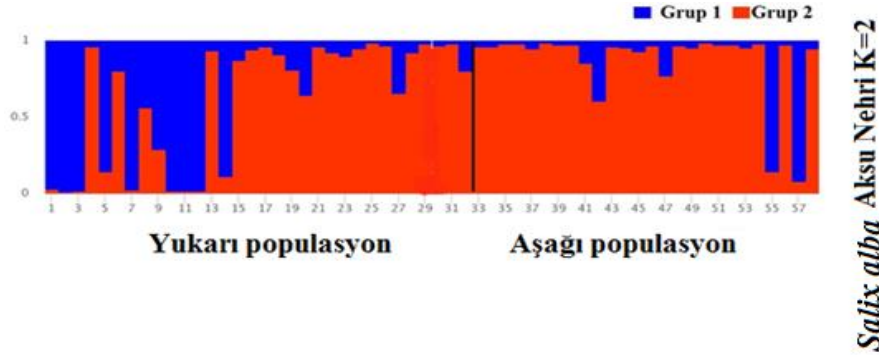
***Salix alba* Seyhan Nehri popülasyonu K=3**

Şekil 26 : Seyhan Nehri'nden bir popülasyon olarak örneklenen 29 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler popülasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, turkuaz renk grup 2'yi kırmızı renk grup 3'ü temsil etmektedir.

Aksu Nehri'nden 58 bireyden oluşan 2 popülasyon örneklenmiştir. Nehrin yukarisından örneklenen popülasyondaki genotiplerin %31'i birinci grupta %69'u ikinci grupta yer almaktadır. Nehir aşağısından örneklenen popülasyondaki genotiplerin birinci gruba ait olma oranı %8, ikinci gruba ait olma oranı da %92 olarak hesaplanmıştır (Tablo 32, Şekil 27).

Tablo 32 : Aksu Nehri'nden örneklenen 58 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.

Örneklenen popülasyonların isimleri	58 <i>Salix alba</i> genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Yukarı popülasyon	26	14		2	9		1
Aşağı popülasyon	32	27	1	2	2		

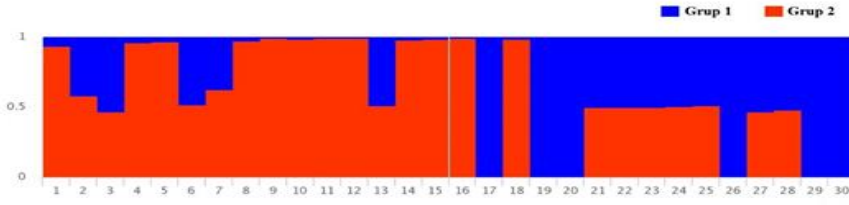


Şekil 27 : Aksu Nehri'nden 2 populasyon olarak örneklenen 58 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analiz sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Ihlara Melendiz çayından örneklenen 30 genotipli Ihlara populasyonu genetik olarak iki farklı gruptan oluşmuştur. Genotiplerin %30' u birinci grupta %70'i de ikinci grupta yer almaktadır. Bu populasyon içerisinde 4 birey her iki grup için de eşit gruba ait olma katsayısına sahiptir (Tablo 33, Şekil 28).

Tablo 33 : Ihlara, Melendiz çayından örneklenen 30 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.

Örneklenen populasyonların isimleri	IHLARA						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Ihlara populasyonu	30	6		3	12		9



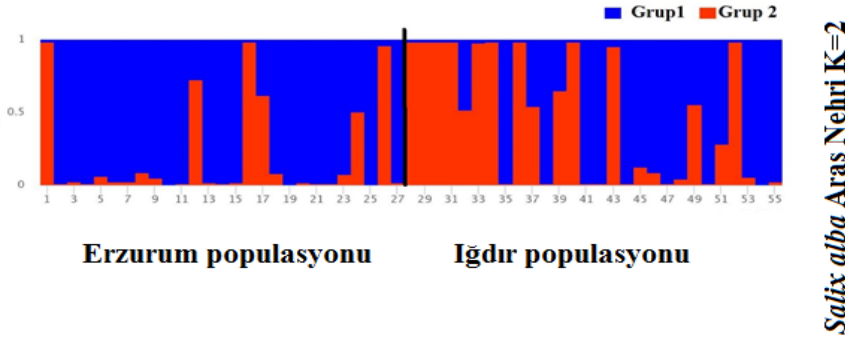
***Salix alba* Ihlara popülasyonu K=2**

Şekil 28 : Ihlara, Melendiz çayından bir popülasyon olarak örneklenen 30 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin testi sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler popülasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Doğu anadolu bölgesinde bulunan Aras Nehri'nden örneklenen 55 genotip genetik olarak farklı iki gruba ayrılmıştır. Erzurumdan örneklenen 28 genotipin %82' si birinci grupta %18' i ikinci grupta yerlirken, Iğdırdan örneklenen 27 genotipin %48' i birinci grupta %52'si de ikinci grupta yeralmaktadır (Tablo 34, Şekil 29).

Tablo 34 : Aras Nehri'nden örneklenen 55 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.

Örneklenen popülasyonların isimleri	ARAS						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0.8-0.9	0.7-0.8	<0.6	0.8-0.9	0.7-0.8	<0.6
Erzurum (Yukarı) popülasyonu	28	4	1	1	21		1
Iğdır (Aşağı) popülasyonu	27	9		4	13	1	

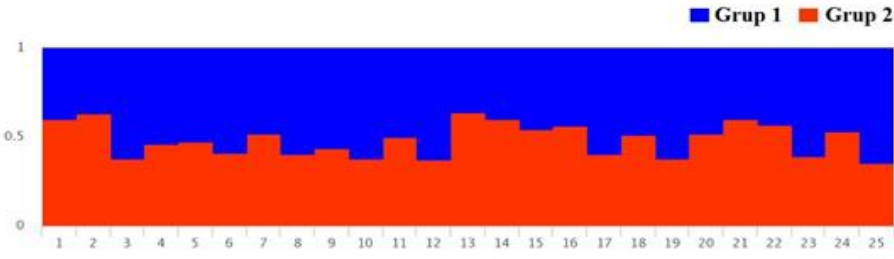


Şekil 29 : Aras Nehri'nden 2 popülasyon olarak örneklenen 55 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler popülasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Fırat Nehri'nden örneklenen 25 genotipin %52' si birinci grupta %48'i de ikinci grupta yer almıştır (Tablo 35, Şekil 30).

Tablo 35 : Fırat Nehri'nden örneklenen 25 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları

Örneklenen popülasyonların isimleri	FIRAT						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Fırat popülasyonu	25			13			12



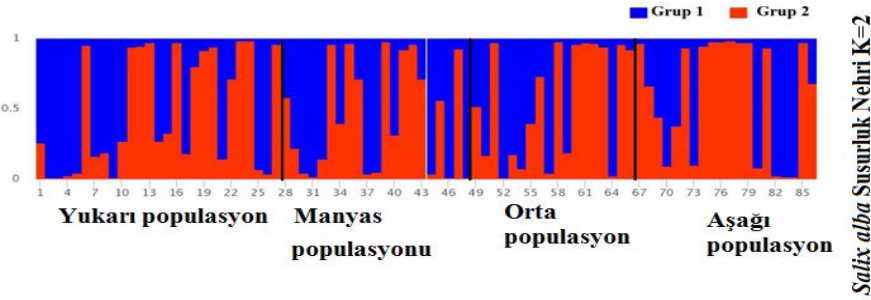
***Salix alba* Fırat Nehri populasyonu K=2**

Şekil 30 : Fırat Nehri'nden bir populasyon olarak örneklenen 25 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Akdeniz bölgesinde yeralan Susurluk Nehri'nden 4 populasyon örneklendi. Toplamda 86 bireyden oluşan bu 4 populasyon Structure genetik yapı analizi ile iki farklı genetik gruba yerleştirilmiştir. Nehir yukarısı ve Manyas populasyonundan örneklenen bireylerin %59' u ve %52' si birinci grupta yerlerken orta ve aşağı populasyondaki genotiplerin %56 ve %60' ı ikinci grupta yer almaktadır (Tablo 36, Şekil 31).

Tablo 36 : Susurluk Nehri'nden örneklenen 86 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma oranları.

Örneklenen populasyonların isimleri	SUSURLUK						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6	0,8-0,9	0,7-0,8	<0,6
Yukarı populasyon	27	11	3	1	11	1	
Manyas populasyonu	21	8	2	1	6	2	2
Orta populasyon	18	7		1	8	1	1
Aşağı populasyon	20	6		2	10		2

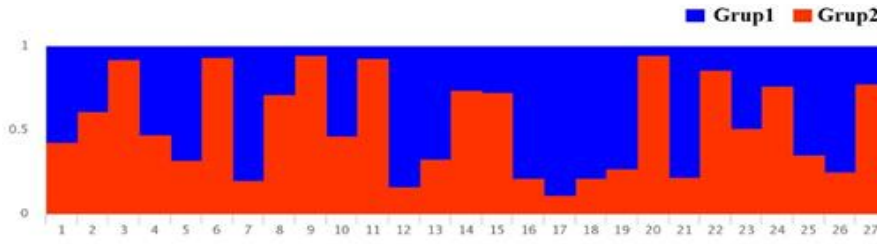


Şekil 31 : Susurluk Nehri'nden 4 populasyon olarak örneklenen 86 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler populasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

Çoruh Nehri'nden örneklenen 27 genotip iki farklı genetik gruba yerleştirilmiştir. Grup 1 de bireylerin %52' si Grup 2 de %48' i yer almaktadır (Tablo 37, Şekil 32).

Tablo 37 : Çoruh Nehri'nden örneklenen 27 *Salix alba* genotipinin 2 farklı genetik gruba ait olma katsayısı oranları.

Örneklenen popülasyonun ismi	ÇORUH						
	Toplam ağaç sayısı	Grup1			Grup2		
		0,8-0,9	0,6-0,7	<0,6	0,8-0,9	0,6-0,7	<0,6
Çoruh popülasyonu	27	2	9	3	6	6	1



***Salix alba* Çoruh Nehri popülasyonu K=2**

Şekil 32 : Çoruh Nehri'nden bir popülasyon olarak örneklenen 27 *Salix alba* genotipi için 15 mikrosatellit markörü kullanılarak yapılan STRUCTURE genetik yapı analizinin sonucu. Her renk farklı bir genetik grubu temsil etmektedir. Siyah çizgiler popülasyonları birbirinden ayırmaktadır. Mavi renk grup 1 'i, kırmızı renk grup 2'yi temsil etmektedir.

4.5.3.5 Behiçbey Söğüt ("*Salix alba-Salix excelsa*") klon bankasında genetik çeşitlilik ve yapılanma

Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğüne bağlı Ankara Behiçbey Fidanlığı'nda ex situ gen kaynakları oluşturmak için *Salix alba* ve *Salix excelsa* oldukları düşünülmüş Türkiye'nin farklı yerlerinden söğüt klonları toplanmıştır. Bu klonların gerçekten *Salix alba* veya *Salix excelsa* oldukları konusunda ciddi tereddütler bulunmaktadır. Yine de toplanan örnekler geldikleri coğrafik orijinlere göre Karadeniz, Marmara, ve İç Anadolu olarak gruplandırılmış ve

8 farklı SSR lokusu ile genetik çeşitlilik bakımından tarama yapılmıştır.

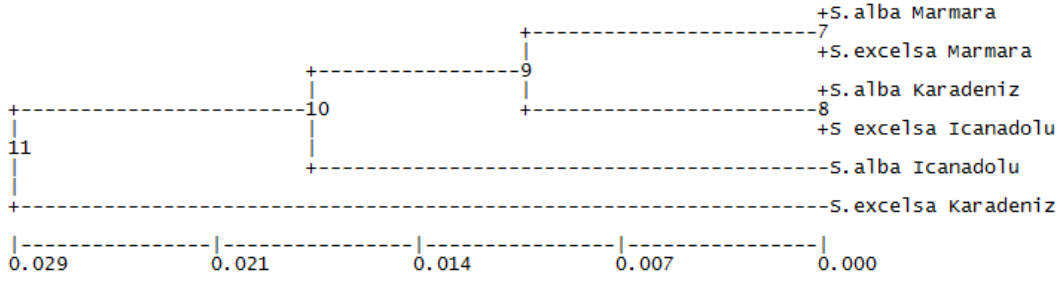
Tablo 38 : Behiçbey klon bankasında bulunan ve *Salix alba* ve *Salix excelsa* türü olduğu varsayılan söğüt populasyonlarının genetik çeşitlilik parametreleri.

Salix alba							
Tür	Örnek	Özgün Alel Sayısı	A	Ho	He	Fis	Fst
Marmara	9	5	3	0,53	0,52	-0,01	
Karadeniz	12	11	4,87	0,59	0,62	0,04	
İç Anadolu	20	13	5,62	0,49	0,55	0,10	
ORTALAMA				0,54	0,56	0,05	0,01
Salix excelsa							
Marmara	12	9	4,5	0,48	0,59	0,20	
Karadeniz	7	4	2,75	0,51	0,49	-0,05	
İç Anadolu	10	11	4,12	0,53	0,62	0,15	
ORTALAMA				0,51	0,57	0,12	0,00

Salix alba populasyonları genetik çeşitlilik parametreleri dikkate alındığında lokus başına düşen ortalama alel sayısı en yüksek İç Anadolu populasyonunda görülmüştür. En düşük değer ise, Marmara populasyonunda bulunmuştur. Karadeniz ve İç Anadolu populasyonları özgün alelerin birçoğuna sahiptir (Tablo 38). Toplam özgün alel sayısı 29 olarak tespit edilmiştir. Ortalama beklenen heterozigotluk 0,56 ve gözlenen ise 0,54 tür. Projede kullanılan 8 lokus ve tüm populasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, Fst değeri 0,01 olarak hesaplanmıştır (Tablo 38). Bunun anlamı genetik varyasyonun %99 ünün populasyonlar arasında, %1' inin ise populasyon içinde olmasıdır.

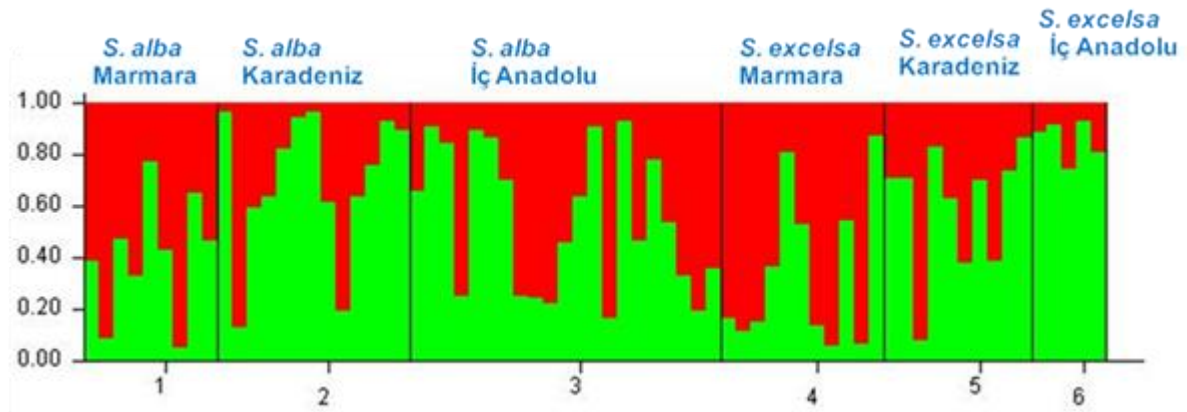
Salix excelsa populasyonları genetik çeşitlilik tanımlayıcı parametreler dikkate alındığında, lokus başına düşen ortalama alel sayısı en yüksek Marmara populasyonunda görülmüştür. En düşük değer ise, Karadeniz populasyonunda bulunmuştur. *Salix alba* populasyonlarında olduğu gibi; Karadeniz ve İç Anadolu populasyonları özgün alelerin birçoğuna sahiptir. Toplam özgün alel sayısı 24 olarak tespit edilmiştir. Ortalama beklenen heterozigotluk 0,57 ve gözlenen ise 0,51' tür (Tablo 38). Projede kullanılan 8 lokus ve tüm populasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, Fst değeri 0,002 olarak hesaplanmıştır. Bunun anlamı neredeyse populasyonlar arasında genetik farklılaşmanın olmadığıdır. Fis değerlerine göre, *S. excelsa* klonları ($F_{is} = 0,12$) *S. alba* ($F_{is} = 0,05$) klonları ile karşılaştırıldığında, *S. excelsa* klonlarında daha fazla akrablık olduğu görülmüştür (Tablo 38).

UPGMA phenogram



Şekil 33 : UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averaging) yöntemi ile oluşturulan genetik ilişki ağacı.

Genetik benzerliği ölçmenin yollarından biri genetik mesafenin ölçülmesidir. 8 SSR lokusuna göre matrix oluşturulmuş ve bu matrix ile UPGMA yöntemiyle çizilmiş dendrogram elde edilmiştir. Genetik ağaca göre, 6 popülasyonu birlikte değerlendirdiğimizde, iki ana grup oluşmuş ve bunlardan birini *Salix excelsa* Karadeniz popülasyonu diğerini ise geri kalan popülasyonlar oluşturmuştur (Şekil 33).



Şekil 34 : Structure programı ile elde edilen popülasyonları grupları.

STRUCTURE programı verilerin kullanıldığı diğer programdır. En iyi *K* değeri 2 bulunmuş ve gerçek popülasyon sayısının 2 olduğu belirlenmiştir. Aynı renkler aynı gruba ait bireyleri gösterir (Şekil 34). Resimden de anlaşıldığı gibi. Behiçbey Fidanlığında buluna *Salix alba* ve *Salix excelsa* bireyleri çok fazla genetik benzerlik göstermektedir ve farklı tür olmaları oldukça zor görünmektedir.

5.TARTIŞMA

5.1 Türkiye Söğüt türlerinin moleküler filogenetiği

Üç kloroplast ve bir çekirdek gen bölgesi *iş paketi-1* için çalışılmıştır. Türkiye Söğütlerindeki kloroplast gen bölge uzunlukları *trnT-F* için 1339 bç, *matK* için 1731 bç, *rbcL* için 1480 bç ve *ITS* için 657 bç 'dir.

Türkiye *Salix* türlerinde kloroplast kodlanmayan *trn T-F* gen bölgesi daha önceden kloroplast kodlanmayan bölgelerin yüksek mutasyona sahip olduğu ifadesiyle örtüşmektedir (Taberlet vd., 1991). Bu durum ayrıca Avrupa söğütlerinde de kodlanmayan kloroplast gen bölgesinin yüksek poliformizm içerdiği ifade edilmiştir (Bakker vd., 2000). En yüksek nükleotid çeşitliliği bu çalışmada Söğütler için kodlanmayan kloroplast bölgesi *trn T-F*'de gözlenmiştir. Özellikle *trn L* intronik bölgesi bu çeşitliliği ihtiva etmektedir.

MatK gen bölgesinin uzunluğu dünyadaki çalışmalarda 797'bç'den 1565'e kadar uzamaktadır (Hardig vd., 2010; Barkalov ve Kozyrenko, 2014a; Percy vd., 2014; Lauren Moreau vd., 2015; Wu vd., 2015). Dünyada yapılan çalışmalara oranla en yüksek bilgilendirici bölge Türkiye söğütleri *matK* gen bölgesinde bulunmuştur (33). Bu sonuçlar Kuzey Amerika Söğütlerinde de yüksek olarak ifade edilmiştir (50) (Percy vd., 2014). Yüksek varyasyon *matK* geninin 3' ucundan çok 5' ucunda bulunmaktadır. Hilu ve Liang (1997)'a göre konservatif 3' ucu filogenetik çalışmalarda daha fazla bilgilendirici baz değişimi içermesiyle yararlı olmaktadır. Ayrıca *matK* gen bölgesinde görülen bu ortalama değerde nükleotid değişimi, Kelchner (2002) tarafından ifade edilen *matK* gen bölgesi yüksek evrimsel potansiyelini destekler niteliktedir.

Birçok araştırmacı kloroplast *rbcL* genini Söğütlerde filogenetik ilişkilerini ortaya koymak için kullanmıştır (Azuma vd., 2000; Chen vd., 2010; Barkalov ve Kozyrenko, 2014a; Percy vd., 2014; Lauren Moreau vd., 2015; Wu vd., 2015; Liu vd., 2016). Bu gen bölgesi Avrupa ve Rus *Salix* türlerinde çok korunmuş (değişmeyen) olarak bulunmuştur (Hamza-Babiker vd., 2009; Barkalov ve Kozyrenko, 2014b). Buna karşın, Chen vd. (2010)'na göre bütün çoğlatılan *rbcL* geninde (1484), değişim gösteren baz pozisyonunun (117) çoğu bilgilendiricidir (53). Bu çalışmada da varyasyon gösteren 22 baz pozisyonundan 19 tanesi bilgilendirici olmasına rağmen, *rbcL* gen bölgesi Türkiye söğütlerinde korunmuştur. Bu genin etkinliğinin artırabilmek için CBOL (The Consortium for Barcode of Life -Plant working group, 2009) DNA barkod grubunun da önerdiği ve bu çalışmada da yapıldığı üzere *matK* gen ile birleştirerek ilişkiler üzerindeki etkisi araştırılmalıdır.

Çekirdek *ITS* geninde bulunan varyasyon gösteren pozisyon sayısı (17) daha önce Avrupa (Leskinen ve Alström-Rapaport, 1999) ve Rus söğütlerinde (Barkalov ve Kozyrenko, 2014b)

yapılan çalışmalarda bulunan yüksek varyasyon ile uyum göstermektedir. Ancak bu veriler diğer birkaç çalışmada bulunan çekirdek *ITS* genindeki yüksek poliformizm ile de ters düşmektedir (Wu vd., 2010; Lauren-Moreau vd., 2015). *ITS* genindeki yüksek GC içeriği DNA dizilerindeki yüksek genomik varyasyonun habercisidir ki bu rakam Türkiye Söğütlerinde % 65'tir (Serres Giardi vd., 2012; Mishra vd., 2009). Ayrıca bu bölge yüksek nükleotid çeşitliliğine de sahiptir (0,013).

Kloroplast gen bölgelerinin birleştirilerek filogenetik ağaç oluşturulduğu için moleküler parametreler, bütün kloroplast gen bölgelerini birleştirilerek hesaplanmıştır. Kloroplast gen bölgelerini GC içeriği çekirdek *ITS* gen bölgesine göre çok düşüktür (%35,5). Toplam kloroplast gen bölgelerinde (4420bç) varyasyon gösteren bölge (123 bç) miktarı çekirdek *ITS* gen bölgesinin (657) varyasyon gösteren kısmına göre (17) düşüktür ki bu durum Söğütlerde çalışan diğer araştırmacılar tarafından da desteklenmektedir (Wu vd., 2015). Söğüt türlerinde kloroplast paylaşımı (chloroplast capturing-sharing) çok yaygın olduğu ve melez türleşme görüldüğü için çekirdek genomu dizi analizlerine de kesinlikle bakılmalıdır (Brunsfield vd., 1991).

Salix türlerinde çok fazla generik ve infragenerik sınıflandırma bulunmaktadır (Fang, 1987; Argus, 1997; Hardig vd., 2010). Projenin bu iş paketinde Skvortsov (1999)'un subgenerik uygulamasına bağlı kalınarak; Türkiye'de iki altcins olduğu düşünülmektedir (Altcins *Salix* ve *Vetrix*). Çizdirilen iki filogenetik ağaca göre (kloroplast ve çekirdek) altcins *Salix* ve altcins *Vetrix* olmak üzere iki ayrı gruba ayrılmışlardır. Türk söğütlerindeki bu ayrım aynı şekilde Japon *Salix* (Azuma vd., 2000) ve Çin *Salix* (Chen vd., 2010) türlerinde de gözlemlenmiştir. Hem kloroplast hemde çekirdek filogenetik ağacında altcins *Salix* üyelerinden Seksiyon *Salix*'e dahil olanlar *S. alba*, *S. excelsa*, *S. fragilis* ve melez *S. albaxfragilis* birbirlerine çok yakın olarak konumlanmışlardır. Hepsi ağaçsı formda ve lanseolat yaprak yapısına sahip olan bu söğüt türleri diğer altcins *Salix* türlerinden farklılık göstererek hem morfolojik hem de moleküler verilere göre birbirlerine çok benzemektedirler. Altcins *Salix*'te ayrıca her iki ağaçta da *S. babylonica*'nın bazal pozisyonda olduğu görülmektedir. Ekzotik kökeninden dolayı *S. babylonica* diğer türlerden ayrılabilir (Azuma vd., 2000). *S. acmophylla* türü çekirdek gen bölgesi (*ITS*) ağacında altcins *Salix* içerisinde en uzak tür olarak yer almaktadır. *S. acmophylla*'nın polimorfik bölgelerinden dolayı. İran'da yapılan bir çalışmada *S. alba*'nın başka bir söğüt türüyle melez yapması sonucu oluşabilecek bir tür olduğu ifade edilmektedir (Abdollahzadeh vd., 2011). *S. alba* ve *S. fragilis* arasındaki melezler Avrupa'da doğal olarak çok görülmektedir (Hamza- Babiker vd., 2009). Morfolojik olarak *S. alba* ve *S. fragilis*'in arasında karakterler içeren *S. albaxfragilis* melezi, moleküler veriye göre de *S. alba* ve *S.*

fragilis'e yakındır. Altıncı *Salix* grubu birçok atasal ilkel karakter içeren ve dünyanın ılıman kuşaklarına dağılım göstermiş doğal bir gruptur (Azuma vd., 2000; Hardig vd., 2010; Abdollahzadeh vd., 2011). Birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da altıncı *Salix* kloroplast ve çekirdek DNA bazlı ağaçlarda monofiletik yapıda olduğu gözlenmiştir (Chen vd., 2010; Abdollahzadeh vd., 2011).

Altıncı *Vetrix*'e ait bireyler kloroplast (*trn* T-F, *matK*, *rbcL*) verilerine göre oluşturulan ağaçta 2 ana kolda toplanmışlardır. Özellikle kloroplast ağacında altıncı *Vetrix* üyeleri seksiyonlarına bağlı kalarak gruplandırma yaptıkları göze çarpmıştır. Kloroplast ağacında ve çekirdek ağacındaki ortak nokta ise *S.amplexicaulis* türünün en uzak tür olarak bulunmasıdır. İliman iklime sahip habitatlarda *S. amplexicaulis*'in altıncı *Salix* üyeleri ile karışık popülasyonlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durumda altıncı *Vetrix* üyesi olan *S. amplexicaulis*' in altıncı *Salix* üyeleri ile daha kolay melezleme yapabilmektedir. *S.elbursensis* türü de *S.amplexicaulis* kadar olmasa da altıncı *Vetrix* üyelerine uzak konumlanmıştır. Yayılış alanı daha doğu bölgeleri olan türün habitatı hakkında çok fazla bilgi edinilememiştir. Bütün altıncı *Vetrix* üyeleri bu çalışmada ve daha önceden yapılan kloroplast DNA sı analizlerinde politomi (polytomy) göstermişlerdir (Hardig vd., 2010); Chen vd., 2010). Bu durum çekirdek DNA (*ITS*)'sına göre çizdirilen ağaçta da devam etmekte, altıncı *Vetrix* üyeleri karmaşık bir ilişkiye sahiptir. Hatta *ITS* ağacında altıncı *Vetrix* üyeleri tam bir anakol oluşturmamakta ve altıncı *Salix* üyelerine dışarıdan bağlanmaktadır. Çekirdek DNA (*ITS*) filogenetik ağacına göre altıncı *Vetrix*'te en yakın türler *S. caprea* ve *S. cinerea* olarak belirlenmiştir. Yüksek nükleotid çeşitliliğine bağlı olarak altıncı *Vetrix* üyelerinde yüksek polimorfizme sebep olması politomik dağılım ile sonuçlanmaktadır. Altıncı *Vetrix* üyelerinin doğal bir yapıda olduğu tam olarak belli değildir (Hardig vd., 2010). *Vetrix*'te görülen bu kompleks ilişki, yayılış gösterdikleri soğuk ve yüksek rakımlı habitatlarda kendi aralarında sürekli melezleme yapmaları ile açıklanabilir (Lauren-Moreau vd., 2015). Bu şekilde lokal habitatlarda kloroplast transferinin kolay olacağı bilinmektedir (Brunsfeld vd., 1991). Altıncı *Salix*, Türkiye'de daha geniş yayımlı ılıman iklimleri tercih ederken, altıncı *Vetrix* üyelerinin Türkiye'nin kuzeyinde soğuk ve yüksek rakımlı bölgelerinde yer aldıkları gözlenmiştir. Altıncı *Vetrix*'in ayrıca *Salix* L. cinsindeki diğer altıncılara (*Chamaetia*, *Chosenia*, *Longifoliae*, *Protitea* ve *Salix*) göre daha yakın zamanda evrimleşmeye ve değişime gittiği düşünülmektedir (Lauren-Moreau vd., 2015).

5.2 *Salix alba*-*S. excelsa* türlerinin moleküler fiogenetiği

Bu ilave iş paketinde Türkiye genelinde 23 popülasyondan toplanan söğüt türlerinden (iş paketi 2) *S. alba/excelsa* olmak üzere taksanomatik tayin yapmak amaçlı bir adet kloroplast (*matK*) ve iki adet çekirdek gen bölgesi (*ITS* ve *ETS*) dizilerinin analizi yapılmıştır. Kloroplast

matK bölgesi uzun olmasına rağmen sadece 2 adet bilgilendirici baz içermektedir. Ihlara popülasyonunda net bir şekilde 2 insersiyon (indel) gözlenmiştir. Ayrıca kloroplast *matK* bölgesi diğer iki bölgeye göre nükleotid çeşitliliği çok düşüktür. Nükleotid çeşitliliği ve GC içeriği çekirdek gen bölgelerinin her ikisinde de (*ITS* ve *ETS*) yüksektir. Yüksek poliformizm *S. alba/excelsa* tür tayini için de faydalı olmuş; *ITS* için 3, *ETS* için ise 5 adet bilgilendirici polimorfik bölge bulunmaktadır. Nükleotid çeşitliliği parametresine göre *ETS* gen bölgesi diğer iki bölgeye göre (*matK* ve *ITS*) en polimorfik ve bilgilendirici gen bölgesidir. *ETS* gen bölgesinin 53. bazında *S.alba* *S. /excelsa* değişiminden çok, tür içerisinde coğrafik izolasyona bağlı olan bir baz değişimi söz konusudur.

Belirlenen substüsyonlara göre kloroplast ve çekirdek gen bölgeleri ağaçlarında tür tayini (*S.alba* / *S. excelsa*) yapılmak istenmiştir. İki gen bölgesine göre her popülasyon bireylerinin hangi türe (*S.alba/excelsa*) daha yakın olduğu ve her iki gen bölgesi açısından da tutarlılık gösterip göstermediği tespit edilmiştir. Buna göre Kızılırmak Kırıkkale, Çorum, Göksu Orta, Ihlara *S.excelsa*'ya yakın iken, Kızılırmak Kayseri, Bafra, Iğdır, Aksu1-2, Ceyhan 1-2, Seyhan, Çoruh ve Susurluk R1-2-3-4 popülasyonları *S. alba*'ya yakın durmaktadır. Kloroplast ve çekirdek gen bölgeleri arasında dişi ebeveyn kalıtım ve recombinant kalıtım bilgileri ışığında Kızılırmak Kırşehir, Göksu İlk, Göksu Orta, Göksu Ermenek, Fırat ve Erzurum popülasyonlarında farklı tür poleniyle döllenme sonucu melez popülasyonların oluştuğu düşünülmektedir.

Ekolojik olarak dioik karakterde olan söğüt bireylerinde introgresif melezleme (gen aktarımına yönelik birçok nesilde benzer birey ve ebeveynler arasında geri çaprazlama) çok görülmektedir (Anderson ve Stebbins, 1954). Bu iki türü karakterize edilebilmek için yapılan moleküler dizileme analizleri sonucunda hem kloroplast (2 baz değişimi) hem çekirdek gen bölgelerinde (8 baz değişimi) baz değişimleri gözlenmiştir. Ancak daha önce söğüt türlerindeki filogenetik ilişkileri belirlemek için yapılan moleküler analizlerde (*iş paketi* -1) görülmüştür ki sadece bir tür içinde de bu kadar substitüsyon olabilmektedir. Söğüt türlerinde genel olarak görülen melezlemeye ek olarak aynı biyocoğrafyayı paylaşan bireyler arasında haplotip paylaşımı adı verilen kloroplast aktarımı (sharing-capturing) olduğu bilinmektedir (Stegemann vd., 2012). Bu türleşme yolunda, bireyler arasında kloroplast geninin paylaşımına izin vererek ortak gen havuzları oluşturmaktadır. Bu popülasyonlar arasında mutasyon bazında değişimler olmuş ancak tam bir coğrafik izolasyon ve bunu izleyen yoğun ve benzer koşullar altında doğal seleksiyon gerçekleşmediği için türleşme devam etmektedir. Kloroplast melezlemesinden kaynaklanan bu durum. *S.alba/excelsa*'da tamamlanmamış türleşme (incomplete lineage sorting) olarak adlandırılmaktadır (Wayne ve Knowles, 2006).

Salix alba ve *Salix excelsa* türlerini taksonomisi ve filogenisi çok komplike ve karmaşıktır. Bunun en büyük nedeni iki türün birbirlerine morfolojik olarak oldukça benzerlik göstermesidir. *Salix alba* türünün tomurcuğu lanseolat-oblong ve amentum uzunluğu ise 25-30 x3-4mm. *Salix excelsa*'ninkisi ise ovat-lanseolat ve 40-50 x 10mm. Görüldüğü üzere sadece yaprak ve amentum uzunluklarından birbirlerinden ayrılmaktadır. Fakat bu iki özellik çok ayırt edici olmadığı için ayırım imkansızdır. Ayrıca, bu morfolojik özelliklerin karşılaştırılması için iki farklı türden aynı yaşta birey örneklenmelidir ve bu durum doğal popülasyonlarda geçerli olamaz. Skortsov' (1999) a göre, *Salix alba* Avrupa-Sibirya bölgesine ait bir türken, *Salix excelsa* ise İran-Turan flora bölgesine aittir. Her ikisi de Doğu Asya bölgelerinde çok eski zamanlardan beri yetiştirilmektedir. Fakat doğal alanları insanlar tarafından tahrip edilmiştir. Sonuç olarak çok fazla ara formlar oluşmuştur. Bunun yanında, bu iki türün birleştirilmesi ve tek bir tür gibi muamele görmesi öngörülmektedir. Moleküler çalışmalar da tek tür olabileceğini desteklemektedir.

Salix alba, *Salix fragilis* ile Orta ve Batı Avrupa'da, büyük oranda Rusya'da hibrit yapmaktadır ve hibritleri saf *S.fragilis*'ten daha yaygındır. Fakat, Asya'da bu kadar hibritleşmemiştir. *S.alba* ve *S.excelsa* türlerinin ortak yaşadıkları alanlarda çok sayıda ara form bulunur. Tanımlaması zor olan bu formların melez olduğu öngörülmektedir. *S.alba* ve *S.excelsa* hibritleri Asya, Suriye ve Kafkaslarda görülmüştür (Skvortsov, 1999)

Morfolojik olarak iki farklı tür olarak ifade edilen *S.alba* ve *S.excelsa*'nın moleküler olarak türleşme devam ettiği için kesin bir tür farklılaşması görülmemiştir. İleriye dönük olarak yapılacak olan ıslah ve gen kaynakları koruma çalışmalarında, *S.alba/excelsa* kompleksi olarak örneklenen 9 nehirde toplanan bütün popülasyonların *S. alba* popülasyonları olarak kabul edilmesi doğru olacaktır.

5.3 *Salix alba* popülasyonlarının Türkiye bazında genetik çeşitliliği ve yapılanması

Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan 10 nehirlerden örneklenmiş 23 *Salix alba* popülasyonunda hem popülasyon içi hem de popülasyonlar arası genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla 15 SSR lokusla moleküler karakterizasyon yapılmıştır. Yapılan genetik analiz sonuçlarına göre lokus başına ortalama alel sayısı 17.1 olarak tespit edilmiştir. Araştırmadaki ortalama alel sayısı diğer araştırmacıların verilerine yakın değerler olarak bulunmuştur. En yüksek alel sayısı SB233 (34 alel) lokusunda, en düşük alel çeşitliliği ise SB265 (5 alel) lokusunda bulunmuştur. 643 *Salix alba* genotipinde sadece 2 tane tekrarlanan klon tespit edilmiştir. Bu, *Salicaceae* ailesinde klonal üreme oldukça yaygın olmasına rağmen, *S. alba* türünün doğal popülasyonlarda aseksüel olarak yayılışın yaygın

olmadığı anlamına gelmektedir. Bu bulgu şaşırtıcı değildir. Çünkü benzer sonuçlar, *Salix huakoana*'da (Kikuchi vd., 2011), kuzey kutup bölgesindeki tundrada görülen birçok söğüt türünde (Douhovnikoff vd., 2010) ve *Salix arctica* 'da (Steltzer vd., 2008) yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir. Buna rağmen. vejetatif üreme bu aileye ait *Populus* türlerinde daha fazla görülür (Castiglione vd., 2010).

King vd. (2010) *S. alba* da SB194 lokusunda bu çalışmada olduğu gibi 6 alel bulmuştur. Fakat Fis değeri pozitifdir (Ho: 0,36, He: 0,57). Farklı bir tür olan *S. caprea* da yapılan SSR çalışmasında SB24 lokusunda 15 alel tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise 17 alel tespit edilmiştir (Ho: 0,89, He: 0,77, Fst: 0,005). gSIMCT024 lokusunda ise 18 alel görülmüştür. Bu çalışmada ise, 13 alel tespit edilmiştir (Ho:0,85, He:0,80, Fst: 0,009) (Puschenreiter vd., 2010).

S. reinii de yapılan SSR çalışmasında, Sare04 and Sare08 lokuslarında sırasıyla 37 ve 34 allel bulunmuştur (Lian vd., 2003). Bu çalışmada Sare04 lokusunda 24. Sare08 lokusunda ise 25 alel bulunmuştur. Lin ve arkadaşları (2009), *S. purpurea* ve *S. eriocephala* türlerinde PMGC2709, PMGC2889, W293, SB24, ve SB493 lokusları ile çalışmışlardır. *S. purpurea* türünde bulunan Fis değerleri sırasıyla; 0,51, 0,36,-0,08, -0,02 ve -0,08'dir. *S. eriocephala* türünde ise; 0,23, 0,33,-0,007, -0,07 ve 0,12'dir. Bu çalışmada sadece PMGC2709 ve PMGC2889 pozitif Fis değerine sahipken, diğer lokuslar negatif değere sahiptir.

Sochor vd. (2013) *S. daphnoides* türünün genetik yapısını anlamak için yaptıkları SSR çalışmasında gSIMCT024 lokusunda bu çalışma sonucunda olduğu gibi 13 alel, fakat diğer lokuslarda, örneğin SB24 lokusunda 7 alel , SB196 lokusunda 3 SB233 lokusund 8 alel, SB243 loksunda 3 alel tespit etmişlerdir. Türlerin yayılışı, iklimsel ve yetiştirme ortamları istekleri ve maruz kaldıkları çevresel ve antropojenik faktörlerin gösterdiği genetik çeşitlilik dikkate alındığında aynı lokusların farklı türlerde allel sayılarının değişim göstermesi beklenen sonuçlardır.

Bir popülasyonu oluşturan alt popülasyonlardan bazılarında genetik çeşitlilik fazla iken, bazılarında daha az olabilir. Yani mikrohabitat farklılıklarının yarattığı seleksiyondan dolayı genetik çeşitlilik alt popülasyonlarda eşit olarak dağılmayabilir. Bu çalışmada hesaplanan Fis, Fit ve Fst değerleri lokuslarda farklıdır. Bu durum her popülasyondaki lokusların çevresel faktörlerdeki değişimlerden bağımsız olarak etkilendiğini göstermektedir. Lokus başına düşen Fst değerinin büyüklüğü o lokusun popülasyonlar arasındaki farklılığa yaptığı etkiyi göstermektedir. Popülasyonlar arasındaki farklılaşmaya en büyük katkıyı SB24, SB493 ve PMGC2709 lokuslarındaki görülen alellerin yaptığı görülmüştür. Fis ve Fit değerlerinin negatif olması birbirine benzemeyen genotipler arasındaki eşleşmenin tercih edilmesi (negative

assortative mating) ve heterozigotların lehine bir seçim sonucu olabilir. Populasyon içerisinde gözlenen heterozigotluk beklenenden az ise Fis ve Fit değerleri pozitif bulunur ve bu populasyonda homozigot bireylerin fazla olduğu görülür (heterozygote deficiency). Aynı zamanda, gen alışverişinin de sınırlı sayıdaki bireyler arasında olduğuna işaret etmektedir.

Kızılırmak ve Göksu nehirlerinde bulunan popülasyonlarda genetik çeşitlilik diğer nehirlerle kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Yani populasyonlarda heterozigot bireyler, homozigot bireylere göre daha fazladır. Bu kurucu popülasyonda bulunan bireylerin heterozigotluk oranı ve vejetatif üreme stratejisinden kaynaklanabilir.

Diğer nehirlerde bulunan alt popülasyonlarda görülen heterozigot eksikliği popülasyon içinde var olan bireylerin sürekli olarak kendi içlerinde gen alış veriş yapmalarından ve insan etkisiyle vejetatif materyallerin daha kolay yayılmasından kaynaklanabilir. Alt popülasyonlarda hesaplanan pozitif Fis değeri (akrabalık derecesi) bu hipotezi desteklemektedir. Söğüt tohumları rüzgar ile uzun mesafelerde taşınabilmesine rağmen, büyük çoğunluğu ana bitkide yada yakınında kalmaktadır. Ayrıca Söğütlerin birincil polen taşıyıcısı arılar olduğu için (Tamura ve Kudo, 2000), çok uzun mesafeli tozlaşma beklenmemektedir. Böylece, kısıtlı tohum veya polen dağılımı ve uygun habitatin bulunmaması gibi nedenlerle alt popülasyonlar arasındaki gen alışverişini sınırlayabilmekte ve bu nedenle aynı gen havuzuna ait bitkilerin gen alışverişini yapma şansını artırmaktadır. Buna ek olarak, küçük popülasyon büyüklüğü habitat seçiminde farklılıklar veya tarımsal nedenlerden dolayı habitat parçalanması gibi bazı diğer faktörler, aynı popülasyondaki bireyler veya klonlar arasında üremeye sebep olacağı için populasyon içerisinde kendileşmeye ve akrabalar klonlar arasında gen alışverişine yol açabilir (Delmotte vd., 2002 ; Funk vd., 2005; Galeuchet vd., 2005). Stamati vd. (2007)'de *Salix lapponum* ve *Salix lanata*' da yaptıkları çalışmada gözlemlenen ve beklenen heterozigotluklarda büyük farklar tespit etmiştir. Trybush vd. (2012) tarafından yapılan benzer çalışmada *Salix viminalis* populasyonları için Fis değerleri 0,05 ile 0,14 arasında hesaplanmıştır.

Orta populasyonlarda genetik çeşitliliğin daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Bunun sebebi, çalışılan nehirlerin orta kısmına ait olan habitatın Göksu nehrinde olduğu gibi daha az insan mudahalesine maruz kalması ve nehrin bu bölümüne gen kaynağı sağlayacak nehrin yukarı kollardaki populasyonların genetik çeşitlilik boyutlarıyla yakından ilgilidir.

Nehirlerin genetik yapısı incelendiğinde, Fst değeri 0,08 olarak hesaplanmıştır. Bunun anlamı genetik varyasyonun %92' sinin nehir popülasyonları içinde, %8'inin ise nehir popülasyonları

arasında olmasıdır. Genel olarak, rüzgar tarafından dağılabilen ve çok uzak yerlere etkili bir şekilde taşınabilen küçük tohumlar sayesinde, söğüt populasyonları arasında genetik farklılaşmanın oranı çok yüksek değildir (Hörandl vd., 2002). Çok yıllık odunsu bitkilerde genetik çeşitliliğin populasyon içinde görülme yüzdesi daha fazladır (Hamrick vd., 1992; Berg ve Hamrick, 1994). Uzun mesafeli gen akışı, söğüt türlerinde yaygın olmamasına rağmen, sık esen rüzgarlar, su, hayvan ve insan aracılı tohum, polen ve sürgün taşınması uzak mesafelerdeki populasyonların birbirlerine genetik olarak benzemelerine yol açmaktadır (Triest vd., 2000).

Her nehir için hesaplanan F_{st} değerine göre, Ceyhan (0,004) ve Susurluk (0,006) nehirlerine ait populasyonlardaki benzer bireyler arasındaki gen alış verişi Göksu, Aras ve Aksu (0,02) nehirlerine ait populasyonlardan daha fazladır. Tüm nehirler karşılaştırıldığında en az gen alışverişi Kızılırmak nehrine ait populasyonlarda görülmektedir (0,05). Bunun sebebi, en uzun nehir olan Kızılırmak nehrinin populasyonlar arasındaki mesafesinin fazla olmasıdır. Fakat tüm populasyonların F_{st} değerleri 0,05'ten küçük olduğu için genetik açıdan çok büyük bir farklılaşmanın olmadığı söylenebilir. Her nehirdeki doğal söğüt populasyonları birbirine benzer genotipde bireylerden oluştuğu ve kendi aralarında gen alış verişinde buldukları için populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma çok düşük seviyede tespit edilmiştir. Farklı söğüt türlerinde yapılan benzer çalışmalarda F_{st} değeri genel olarak düşük bulunmuştur. Örneğin. *S. viminalis* de yapılan çalışmada F_{st} değerleri 0,03-0,07 arasında tespit edilmiştir (Trybush vd., 2012). *S. caprea* ya ait yedi Avrupa populasyonunda F_{st} değeri 0,01 ve 0,05 arasında hesaplanmıştır (Puschenreiter vd., 2010). Sochor vd. (2013), *S. daphnoides* de F_{st} değerlerini 0,05 ile 0,14 bulmuştur.

5.4. *Salix alba* populasyonlarında genetik yapılaşma

10 nehirden örneklenen 643 *Salix alba* genotipi genetik yapılaşma analizi programı sonuçlarına göre birbirinden farklı 3 genetik gruba ($K=3$) yerleştirilmiştir. Elde edilen K değerine göre Türkiye'nin her bölgesini temsil edecek şekilde örneklenen 10 nehirdeki 23 populasyon 3 farklı atasal gen havuzundan evrimleşmiştir ve bu gen havuzları birbirlerinden tamamen farklılaşmış gözükmektedir. Salicaceae ailesine ait olan *Populus* ve *Salix* cinsi türler iki evcikli olup polenleri ve tohumları rüzgar ve su yardımıyla uzak mesafelere kolaylıkla taşınabilir. Tohumların ve polenlerin yayılma şekli farklı lokasyonlarda bulunan populasyonlar arasındaki genetik alışverişi kolaylaştırdığından birbirlerine coğrafik olarak yakın bulunan populasyonlar arasında gen akışı daha kolay olacağı için benzer genetik yapıya sahip olmaları beklenir. Uzak mesafelerde yer alan söğüt populasyonları arasındaki gen akışının çok yaygın olmadığı bulunmuştur (Lin vd., 2009). Bunun aksine Perdereau vd. (2014)

yaptıkları çalışmada *Salix caprea* türünün 230 km uzaklıktaki populasyonları arasında yüksek oranda gen alışverişi olduğunu göstermiştir. Uzak mesafelerde bulunan populasyonlar arasındaki gen alışverişi tohumların, polenlerin ve vejetatif materyallerin insan aracılığıyla taşınması ile gerçekleşmiş olabilir.

Bu projede coğrafik olarak birbirine yakın olan nehirlerden örneklenen populasyonlar genel olarak aynı genetik grupta birlikte yer almıştır. Benzer sonuçlar farklı söğüt türleriyle yapılan çalışmalarda da bulunmuştur (Sochor vd., 2013; Gyllenstrand vd., 2014; Trybush vd., 2012). Farklı coğrafik bölgelerdeki nehirlerde farklı genetik yapı görülmüştür. Birinci grupta yer alan Göksu ve Kızılırmak nehirleri komşu coğrafik bölgeler olan Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinden örneklenmiştir. Göksu ve Kızılırmak Nehir'leri arasındaki genetik benzerlik nehirler arasındaki gen alışverişini mümkün kılan tohum ve polen dağılma mekanizmaları ile kolaylıkla olabileceği gibi tarihsel veya geleneksel olarak Akdeniz-İç anadolu arasında gerçekleşen insan hareketleriyle de açıklanabilir. İkinci grubu oluşturan nehirlerden Aksu ve Susurluk birbirlerine yakın olan Akdeniz ve Ege bölgelerinden örneklenmiş olmalarına rağmen aynı grupta yer alan Çoruh ve Ihlara coğrafik olarak bu nehirlere yakın değildir. Triest (2007) söğüt türlerinde populasyonlar içinde ve populasyonlar arasında uzaklığa bağlı olarak genetik izolasyonun olduğunu ve gen alışverişinin sınırlandırıldığını belirtmiştir. Bu nehir sistemlerinde akdeniz bitki örtüsü elemanları doğal olarak bulunmaktadır. Bu populasyonlardaki genler muhtemelen insan aracılığıyla materyal taşınması sonucu ya da tarihsel olarak ortak gen havuzundan beslenme sonucu olabilir. Yalnız bu kony tarihsel insan hareketleriyle ilişkili olarak çalışılması gerekmektedir. Bir başka açıklamada Ihlara populasyonuna bakıldığı zaman her ne kadar bireylerin %66' sı ikinci grupta yer alsada da birinci ve üçüncü gruba da ait olan ağaçları da içermektedir. Eski yerleşimlerin olduğu Ihlara Vadisi geçmişte yerleşimciler tarafından uzun yıllar yoğun olarak kullanılmıştır. Buradaki farklı yapı diğer nehirlerden tohum yada vejetatif olarak getirilmiş ve bu nehirde yaygınlaşmış olmasıyla izah edilebilir. Çünkü burada Akdeniz bitki örtüsü elemanlarını da görmek mümkündür. Ceyhan, Seyhan, Fırat ve Aras Nehir'leri de coğrafik olarak komşu bölgelerden örneklenmiş olup üçüncü genetik gruba teşkil etmektedirler. Bu populasyonlar bir coğrafik bariyer olarak bilinen ve türleşme de önemli olan Anadolu Çaprazı'nın doğusunda kalmaktadır.

Kızılırmak ile karşılaştırıldığında Göksu Nehri genetik yapısını daha homojen halde koruyabilmiştir. Göksu populasyonuna diğer nehir populasyonlarından tohum ve polen vasıtası ile gen akışı sınırlandırılmıştır. İnsan vasıtasıyla materyal aktarımı da gözlenmemektedir. Genetik olarak diğer populasyonlardan izole olmuştur. Örneklenen 112 bireyin tamamı 0,8-0,9 gruba ait olma katsayısı ile birinci grupta yer almıştır. Kızılırmak

Nehri'nden örneklenen ve birinci grupta yer alan 117 bireyden 96'sının grup 1'e ait olma katsayıları 0,8 ile 0,9 arasında bulunmuştur. Kızılırmak Nehri'nin aşağı kısmından örneklenen Çorum ve Bafra popülasyonlarındaki 15 bireyin de dahil olduğu 30 bireyden oluşan ikinci grupta çalışılan lokuslar açısından bir genetik karışım(admixture) söz konusudur. Bu 30 bireyin 16'sı 0,8-0,9 ait olma katsayısı ile ikinci gruba aittir. İkinci grubu oluşturan nehirlerden Susurluk' ta ki 86 bireyden 82'si 0,8-0,9 ait olma oranına sahiptir. Susurluk nehri genetik yapısını birkaç birey dışında homojen olarak koruyabilmiştir. Göksu nehrinde olduğu gibi diğer popülasyonlardan genetik olarak izole olmuştur. Aksu ve Çoruh popülasyonlarındaki bireylerin sırası ile 50'si ve 24'ü yüksek ait olma oranları(0,8-0,9) ile ikinci grupta yer almıştır. Ama bu popülasyonlarda bazı bireylerde lokuslar açısından genetik karışıklık mevcuttur ve diğer genetik gruplara aittir. Aksu nehrinin başından örneklenen bireylerin 8'i coğrafik olarak uzak olan Kızılırmak ve Göksu Nehri'nden örneklenen bireylerin genetik yapısıyla benzerlik göstermektedir. İhlara'dan örneklenen bireyler %66 oranı ile ikinci gruba ait olsa da her üç genetik gruba ait bireyleri içermektedir. Genetik karışıklığın gözlemlendiği nehirlerde farklı nehirlerin popülasyonları ile arasında gen alışverişi olduğu beklenmektedir. Bu gen alışverişi rüzgarla veya suyla kolaylıkla taşınabilen tohumların çimlenip yeni lokasyonlarında gelişmesiyle olabileceği gibi insanlar tarafından vejetatif olarak üreyen söğüt materyallerinin taşınması ile de olabilir.

Üçüncü grupta yer alan Ceyhan ve Seyhan popülasyonları genetik olarak homojen bulunmuştur ve Seyhan Nehri'ndeki bir birey hariç bireylerin tamamı 0.8-0.9 ait olma oranı ile bu grupta yer almıştır. Bu grupta yer alan Fırat popülasyonu minimum oranda genetik karışıklık içermektedir. Bireylerin sadece bir tanesi birinci gruba aittir. Bu üç popülasyona dışarıdan gen akışı gözlenmemektedir. Aras popülasyonu %56 ile üçüncü grupta yer alsada bireylerinin %44'ü ikinci gruba yerleşmiştir. İkinci grupta yer alan bireylerin 17'si 0,8-0,9 ait olma katsayısına sahip iken üçüncü grupta yer alan bireylerin 24'ü bu katsayıya sahiptir. Aras Nehri'nde yüksek oranda bir genetik karışıklık mevcuttur. Aras popülasyonunun ikinci grubunu temsil eden bireyler coğrafik olarak Aras nehrine yakın olan ve ikinci grupta yer alan Çoruh nehrinden tohumla ya da insan aracılığı ile Aras nehrine ulaşmış ve çoğalmış olabilir. Fırat nehrindeki ikinci grupta yer alan bireylerde aynı şekilde Aras nehrinden buraya taşınmış olabilir.

5.5 Nehir bazında *Salix alba* populasyonlarının genetik yapılanması

Kızılırmak Nehri kendi içinde iki farklı genetik grup içermektedir. Genetik çeşitlilik ve popülasyonlara özgü aleller dikkate alındığında yukarı ve orta nehir popülasyonlarında genetik çeşitlilik daha yüksek ve nehrin aşağı popülasyonlarında genetik çeşitlilik ve özgün alel sayısı daha düşüktür. Genel olarak heterozigot bireylerin fazlalığı görülmektedir. Populasyonlar arası farklılaşmanın en yüksek olduğu nehir Kızılırmaktır. Genetik yapılaşma analizinde, nehrin yukarı kısmından örneklenen Kayseri populasyonu 3 birey dışında birinci grupta yani aynı grupta yer almaktadır. Bireylerin tamamı 0,8-0,9 ait olma katsayısı ile kendi gruplarına aittir. Nehrin yukarı kısmı genetik olarak homojen bir yapı sergilemektedir. Nehrin orta kısmını temsil edecek şekilde örneklenen Kırşehir populasyonunda yer alan bireylerin de çoğunluğu yine birinci gruba yüksek ait olma katsayısı ile yerleşmiştir. Nehrin yukarıdaki homojen yapı bu kısımda da gözlenmektedir. Nehrin orta kısmını temsil eden diğer popülasyon olan Kırıkkale popülasyonuna bakıldığında genetik karışıklığın daha fazla olduğu, iki genetik gruba ait bireylerin bu kısımda daha fazla birlikte yer aldıkları görülmektedir. Bu nehrin yukarı ve aşağı kısımlarında her iki gruba ait bireyler arasında gen alışverişi daha yüksek orandadır. Genetik olarak farklı yapıdaki bireylerin her ne kadar nehrin orta ve aşağı kısmında daha fazla olması beklense de nehrin aşağı kısmını temsil eden Çorum ve Bafra populasyonlarında birinci gruba ait bireyler baskın olarak bulunmuştur. İkinci gruba ait olan bireylerin bu populasyonlarda bulunmama nedeni tohum ya da sürgünlerin rüzgar ve nehir akıntısı ile nehrin aşağı kısımlarına taşınmaması ya da yapılan barajlarla habitat devamlılığının kaybolması ile ilgili olabilir.

Göksu nehrinin habitat parçalanması görülmeyen ve nispeten doğallığını koruyan yukarı ve aşağı popülasyonlara özgü alel bakımından daha zengin olmakla beraber genetik çeşitlilik bakımından bütün populasyonlar benzer boyutta genetik çeşitlilik göstermektedir. Genetik çeşitliliğin yapılaşması bakımından karşılaştırılınca, Göksu Nehri'nden örneklenen bütün bireyler geçmişte oluşan üç farklı gen havuzu gruplarının özelliklerini taşımaktadır. Bireylerin çoğunluğunun (93) gruplarına ait olma katsayısı 0,5-0,6 arasında bulunmuştur. Üç farklı gen havuzu içeren ve kendi içlerinde sürekli gen alışverişi yapan bireyler nehir boyunca benzer genetik yapıya sahip olmuşlardır. Nehrin yukarı ve aşağı arasında genetik açıdan bir farklılık gözlenmemiştir. Uzak olan populasyonlar arasında genetik bir izolasyon bulunmamıştır. Farklı sığut türlerinde yapılan çalışmalarda da nehirler içinde ve nehirler arasında karşılaştırılan populasyonlar arasında çok büyük bir farklılık olmadığı ve popülasyonların genetik açıdan birbirlerine benzer oldukları bulunmuştur (Triest vd., 2000).

Ceyhan ve Seyhan nehirleri genetik çeşitlilik bakımından benzerlik göstermektedir. Her iki nehirde de örneklenen bireylerin genetik akrabalıkları diğer nehir sistemlerine göre yüksek bulunmuştur. Nehir boyunca gözlenen aynı genetik yapıya sahip olan bireylerin sürekli kendi

içlerinde gen alışverişi yapmalarından, materyal taşınması ve habitat tahribatından dolayı popülasyonlar ciddi erozyona uğramıştır. Ceyhan Nehri'nden örneklenen 74 genotipin 40' ı birinci grupta 34' ü ikinci grupta yer almaktadır. Bireylerin elde edilen iki genetik gruptan birine ait olma katsayısı çoğunlukla 0,5-0,6 arasında bulunmuştur. Nehirden örneklenen bütün bireyler her iki genetik gruptanda özellikleri (alelleri) yakın yüzdelerle içermektedir.

Aksu Nehri Ceyhan ve Seyhan nehirleri ile genetik çeşitlilik bakımından karşılaştırıldığında benzer şekilde düşük genetik çeşitlik ve yüksek akrabalık dereceleri bulunmuştur. Aksu'dan örneklenen 58 bireyden 46' sı ikinci grupta yer alırken 10 birey nehrin yukarısında, 2 bireyde nehrin aşağısında olmak üzere 12 birey de birinci grupta yer almaktadır. Aksu Nehri'nde genetik karışıklık yüksek oranda görülmemiştir. Bireylerin büyük çoğunluğu 0,8-0,9 ait olma katsayısı ile gruplarına ayrılmıştır ve genel olarak iki grubun bireyleri arasındaki gen alışverişi çok kısıtlıdır. İkinci gruptaki bireyler nehir boyunca baskın olarak bulunmaktadır. Bu da ana gen kaynağının bu gruba ait bireyler tarafından oluşturulduğunu göstermektedir.

İki farklı gruba yerleşen İhlara popülasyonu beklenen ve gözlenen genetik çeşitlilik bakımından dengede ve akrabalık derecesinden düşük olduğu bulunmuştur. İhlara popülasyonundaki bireylerden 12' si her iki grubun özelliklerini taşımaktadır. İkinci gruptan 12 birey, birinci gruptan 6 birey çok yüksek ait olma katsayısı (0,8-0,9) ile gruplarına yerleşmiştir. İki genetik grup arasındaki gen alışverişi nehrin tamamında gözükmemektedir. Her ne kadar küçük bir popülasyon olsa da İhlara'nın tarihsel geçmişi ve korunan alan olması genetik çeşitliliğin korunması ve dengede olmasını sağlamıştır.

Genetik olarak iki farklı grup içeren Aras Nehri'nin yukarı kısmı olan Erzurum'dan örneklenen popülasyon birkaç birey dışında genetik yapısını homojen olarak koruyabilmiştir. İğdir popülasyonunda yer alan bireylerde popülasyonun üst kısmında genetik yapısını homojen olarak koruyabilmiştir. Aras Nehri'nin aşağı kısmında her iki genetik gruba ait bireyler birlikte gözükmemektedir. Tohum veya vejetatif materyal taşınması popülasyon içindeki iki genetik gruba ait bireylerin birlikte görülmesine yol açmış olabilir. Her ne kadar lokuslar açısından genetik bir karışıklık sözkonusu olsada bireylerin kendi gruplarına ait olma oranları büyük çoğunlukla 0,8-0,9 dur .

Fırat Nehri'nden örneklenen 25 genotipin 13' ü birinci grupta 12' si ikinci grupta yer almaktadır. Ceyhan Nehri'nde olduğu gibi Fırat Nehri'nde de bireylerin oluşturulan iki genetik gruptan birine ait olma katsayısı tamamıyla 0,5-0,6 arasında bulunmuştur. Nehirden örneklenen bütün bireyler her iki genetik gruptanda özellikleri (alelleri) yakın yüzdelerle içermektedir. Nehir boyunca gözlenen aynı genetik yapı bu iki farklı genetik havuzdan evrimleşen bireylerin sürekli kendi içlerinde gen alışverişi yapmalarından veya genetik ve coğrafik izolasyonla başka popülasyonlarla gen alışverişinin engellenmiş olmasından kaynaklanabilir.

Susurluk Nehri'nden örneklenen 4 popülasyon genetik çeşitlilik bakımından ciddi farklılıklar göstermemekle beraber, korunan alan olan Manyas popülasyonunun en yüksek özgün alele sahip olduğu bulunmuştur. Beklenen ve gözlenen genetik çeşitlilik önemli farklılıklar göstermemektedir. Genetik yapılaşma analizi sonuçları ise, popülasyonlarda genetik olarak bir karışıklık olduğunu göstermektedir. Genetik yapı analizi programıyla iki grup içerdiği öngörülen nehirdeki popülasyonlar her iki gruba ait bireyleri içermektedir. Bireylerin büyük çoğunluğu (67) 0,8-0,9 ait olma katsayısına sahiptir. Her iki gruba ait olan bireyler arasındaki karşılıklı gen alışverişinin oranı da yüksek değildir. Nehrin başından örneklenen popülasyonların genel olarak genetik açıdan daha homojen olmasını beklenir. Nehrin akıntısı veya rüzgarla nehrin aşağı kısmına taşınan tohumlar ve vejetatif sürgünler nehrin bu kısmında gelişerek nehrin yukarısındaki bireylerdeki genleri aktarabilir. Her ne kadar nehrin aşağı kısmında genetik karışıklığın daha çok olması beklensede, Susurluk Nehri'nin yukarı, orta ve son kısmından örneklenen bütün popülasyonlarda genetik karışıklık sözkonusudur. Bu genetik karışıklığa nehrin akış yönü, nehrin coğrafik yapısı sebep olabileceği gibi (tohumların, sürgünlerin taşınması), vejetatif materyallerin insan müdahalesi ile nehrin değişik kısımlarına taşınması ve buralarda gelişmesinden bu karışıklığa sebep olduğu düşünülmektedir.

İki farklı genetik grup içeren Çoruh Nehri popülasyonu için genetik açıdan bir karışıklık (admixture) sözkonusudur. Birinci gruptaki bireylerin kendi grubuna ait olma oranları çoğunlukla (9 birey) 0,6-0,7 arasında bulunmuştur. 13 bireyden oluşan ikinci grupta bireylerin gruba ait olma katsayıları birinci gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Nehir içinde gözlenen iki genetik gruba ait bireyler sürekli kendi içlerinde gen alışverişinde buldukları için bütün bireyler genel olarak her iki gruptan da özellikler(aleller) taşımaktadır.

Bu çalışma Türkiye'deki *Salix* türlerinin evrimleşmesi ve *Salix alba* popülasyonlarında genetik çeşitliliğin boyutu ve yapılanmasının ele alındığı bu boyutta yapılan ilk çalışmadır. Türkiye 'de *Salix* cinsine ait ve doğal olarak bulunan türler arasındaki genetik ilişkiler etraflı bir şekilde ortaya konulurken, ekonomik öneme sahip *Salix alba* gen kaynaklarının durumuda detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Çalışılan 10 nehir sistemindeki *S. alba* popülasyonları genetik benzerlik bakımından iki ana grupta toplanmaktadır. Bu grupta **Anadolu Çaprazı**'nın etkisi bariz bir şekilde görülmektedir. Anadolu çaprazı, kuzeyde Zigana Geçidi'nin güney çıkışından başlayıp, güneyde İskenderun Amanos Dağları ve Doğu Toroslara kadar uzanan bir hattır. Ayrıca üç fitocoğrafik bölgenin (İran-Turan, Avrupa-Sibirya ve Akdeniz fitocoğrafik bölgeleri) kesiştiği bir alandır.

Bu coğrafik bariyerin doğusunda kalan Ceyhan, Seyhan, Aras ve Çoruh *S. alba* popülasyonları bir grubu geride kalan nehirler ise diğer grubu oluşturmaktadır. Anadolu Çaprazının batısında kalan nehir sistemlerinde alt grupları Göksu, Kızılırmak-Aksu-Ihlara ve

Susurluk nehirleri oluşturmaktadır. Uzun ve daha farklı habitatları içinde bulunduran nehirler hariç (Kızılırmak ve Göksu) bütün çalışılan nehirlerde genetik çeşitlilik daha düşük ve populasyon içinde akrabalık derecesi de daha yüksek bulunmuştur.

Nehirlerimizin genel çevresel problemlerini yapılan yoğun ve plansız yapılaşmalar, yoğun olarak yapılan tarımsal faaliyetler, endüstriyel tesislerden kaynaklanan kirlilik, tarım faaliyetlerde bilinçsizce kullanılan kimyasal ilaç ve gübreler, kontrolsüz olarak yapılan saz kesimi ve yakımı ile yasa dışı avlanmalar şeklinde belirtebiliriz. Bu tür bilinçsiz insan müdahaleleri ekosistem döngüsünün halkalarının yavaş yavaş kopmasına sebep olmaktadır. Nehirlerin temizlenmesi ve ekosistemin tekrar işlevsel hale gelebilmesi için Söğütler bütün dünya da en etkili bitkisel çözüm (Fitoremediasyon) aracı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu projenin verileri ışığında, parçalanmış ve tahrip olmuş veya tahribatın devam ettiği nehir ekosistemlere öncelik verilerek akarsu boyları ekosistemlerinin restorasyonuna ve gen kaynaklarını korumaya yönelik programların vakit geçirilmeden oluşturulması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

- ✓ Türkiye’de doğal olarak bulunan söğüt türlerinin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılması taksonomik ayrıştırmada kullanılan bir çok karakterin çevre koşullarından çok etkilenmesi yüzünden oldukça zor olmaktadır. Bu projede çevre koşullarından etkilenmeyen genetik veriler (hem kloroplast hem de çekirdek DNA verilerine göre) Türkiye’deki Söğüt türlerinin monofiletik yapıda olduğu ve iki ana grup (Altcins *Salix* ve altcins *Vetrix*) altında filogenetik ağaçları oluşturduğu görülmüştür.
- ✓ Söğütlerde en yüksek çeşitlilik gösteren ve nükleotid çeşitliliğine sahip gen bölgesi kloroplast genomunun kodlanmayan *trn* T-F bölgesi olarak belirlenmiştir. Ayrıca çekirdek *ITS* gen bölgesi diğer bütün kloroplast bölgelerinden daha çok GC içeriğe ve bilgilendirici bölgeye sahiptir.
- ✓ Kloroplast ve çekirdek DNA bölgeleri kullanılarak oluşturulan her iki ağaçtaki türlerin konumları arasındaki farklılıklar görülmüş ve bunun söğüt türlerinde görülen kloroplast paylaşımı ve introgresif melezlenme (gen aktarımına yönelik birçok nesilde benzer birey ve ebeveynler arasında geri çaprazlama) ile türlerin arasında yoğun etkileşim ile açıklanmaktadır. Altçinslerin bu şekilde moleküler veriye göre iki ağaçta da iki ana grupta ayrılması (altcins *Salix* ve *Vetrix*) farklı biyocoğrafalarda; ılıman (altcins *Salix*) ve soğuk (altcins *Vetrix*) yer almalarıyla açıklanabilmektedir.
- ✓ Çalışılan bölgelerden farklı olarak ilave çekirdek ve kloroplast gen bölgeleri ile, daha fazla takson ve dizisinde çalışılarak Türkiye’deki Söğüt türlerinin altcins, seksiyonel ve türsel ilişkileri belirlemek daha bilgilendirici olacağı düşünülmektedir.
- ✓ Ekonomik olarak önemli olan *S.alba* / *S. excelsa* kompleksinde tür tayini yapılmak istenen popülasyonların kloroplast ve çekirdek filogenetik ağaçtaki konumları popülasyonların önceden morfolojik olarak belirlenen *S.alba* / *S. excelsa* türlerine olan yakınlığı ifade edebilmekte, ancak net bir taksonomik ayırım yapılamamaktadır. Bundan dolayı, kloroplast ve çekirdek DNA’larında yapılan detaylı değerlendirmeler kloroplast melezlenmelerine bağlı olarak aynı biyocoğrafyayı paylaşan türlerde haplotip (kloroplast DNA) paylaşımının çok olduğu, coğrafik izolasyona bağlı ise tür içi mutasyonların etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Morfolojik olarak iki farklı tür olarak ifade edilen *S.alba* ve *S.excelsa*'nın moleküler olarak türleşme devam ettiği için kesin bir tür farklılaşması görülmemiştir. Bu nedenle, *S.alba* /*S. excelsa* kompleksi olarak örneklenen 10 nehirden toplanan tüm popülasyonların *S.alba* popülasyonları olduğu sonucuna varılmıştır.
- ✓ 10 nehirden örneklenen 643 *Salix alba* genotipi genetik yapılaşma analizi programı sonuçlarına göre birbirinden farklı 3 genetik gruba (K=3) yerleştirilmiştir. Bu 3 ana grubu yüksek yüzde ile temsil eden nehirler sırasıyla 1. grubu Göksu ve Kızılırmak'tan örneklenen genotipler , 2. grubu Ceyhan-Seyhan-Fırat Nehir'lerinden örneklenen genotipler ve 3. grubu ise Susurluk ve Çoruh Nehir'lerini temsil eden genotipler oluşturmuşlardır. Elde edilen K değerine ve örneklenen genotiplerin alel paylaşımına göre Türkiye'nin her bölgesini temsil edecek şekilde örneklenen 10 nehirden 23 popülasyonun 3 farklı atasal gen havuzundan evrimleştiği ve bu gen havuzlarının zamanla birbirlerinden tamamen farklılaşmış olduğu gözükmektedir.
- ✓ Çalışılan 10 nehir sistemindeki *S. alba* popülasyonları genetik benzerlik bakımından iki ana grupta toplanmaktadır. Bu gruplaşmada **Anadolu Çaprazı**'nın etkisi bariz bir şekilde görülmektedir. Bu coğrafik bariyerin doğusunda kalan Ceyhan, Seyhan, Aras, Fırat ve Çoruh *S. alba* popülasyonları bir grubu geride kalan nehirler ise diğer grubu oluşturmaktadır. Anadolu Çaprazının batısında kalan nehir sistemlerinde alt grupları Göksu, Kızılırmak-Aksu-Ihlara, ve Susurluk nehirleri oluşturmaktadır.
- ✓ Uzun ve daha farklı habitatları içinde bulunduran nehirler hariç (Kızılırmak ve Göksu) bütün çalışılan nehirlerde genetik çeşitlilik daha düşük ve popülasyon içinde akrabalık derecesi de daha yüksek bulunmuştur.
- ✓ Kızılırmak ve Göksu nehirlerinde bulunan popülasyonlarda genetik çeşitlilik diğer nehirlerle kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Yani popülasyonlarda heterozigot bireyler, homozigot bireylere göre daha fazladır. Bu kurucu popülasyonda bulunan bireylerin heterozigotluk oranı ve vejetatif üreme stratejisinden kaynaklanabilir. Diğer nehirlerde bulunan alt popülasyonlarda görülen heterozigot eksikliği popülasyon içinde var olan bireylerin sürekli olarak kendi içlerinde gen alış verişi yapmalarından ve insan etkisiyle vejetatif materyallerin daha kolay yayılmasından kaynaklanabilir.
- ✓ Kızılırmak Nehri kendi içinde iki farklı genetik grup içermektedir. Genetik çeşitlilik ve popülasyonlara özgü aleller dikkate alındığında yukarı ve orta nehir popülasyonlarında

genetik çeşitlilik daha yüksek ve nehrin aşağı popülasyonlarında genetik çeşitlilik ve özgün aleller daha düşüktür. Genel olarak heterozigot bireylerin fazlalığı görülmektedir. Popülasyonlar arası farklılaşmanın da en yüksek olduğu nehir Kızılırmak'tır.

- ✓ Bu proje kapsamında örneklenen nehirlerin hemen hepsinde doğal nehir ekosistemlerinin ve habitatlarının çeşitli çevresel faktörler yüzünden (barajlar, hidroelektrik santralleri, kum ocakları, endüstriyel ve kentsel atıklar gibi) ya yok olduğu ya da parçalı bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Halbuki söğütler nehir ekosistemlerinin en önemli türlerinden olup, nehirlerin temizlenmesi ve ekosistemin tekrar tamir edilmesi çalışmalarında bütün dünya da en etkili bitkisel çözüm (Fitoremediasyon) aracı olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu projenin verileri ışığında, parçalanmış ve tahrip olmuş veya tahribatın devam ettiği nehir ekosistemlerine öncelik verilerek *Salix alba* ile akarsu boyu ekosistemlerinin restorasyonuna ve bu türün gen kaynaklarını korumaya yönelik programların vakit geçirilmeden oluşturulması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abdollahzadeh, A., Kazempour, O. S., Maassoumi, A. A. 2011. "Molecular Phylogeny Of the Genus *Salix* (*Salicaceae*) with an Emphasize to its Species in Iran. Molecular phylogeny of the genus *Salix* (*Salicaceae*) with an emphasize to its species in Iran", Iran. J. Bot., 17 (2), 244-253, Tehran.

Akkurt, M., Fidan, Y.1998."Meram (Konya) İlçesi Bağcılığı ve Yörede Yetişen üzüm Çeşitlerinin Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi üzerinde bir Araştırma", 4. Bağcılık Sempozyumu Bildirileri, 345-349, Yalova.

Allendorf, F.W., Luikart, G. 2007. "Conservation and the Genetics of Populations", Blackwell Publishing. Malden, Massachusetts, USA.

Aravanopoulos, F. A., Kimb, K. H., Zsuffab, L. 1999. "Genetic diversity of superior *Salix* clones selected for intensive forestry plantations", Biomass and Bioenergy, 16, 249-255.

Argus, G.W. 1997. "Infrageneric Classification of *Salix* (*Salicaceae*) in the New World", Systematic Botany Monographs, Vol 52, 1-121.

Arihan, O., Güvenç, A. 2009. "Ankara çevresinde yetişen söğüt (*Salix* L.) türleri", Ot sistematik Botanik dergisi,15-52.

Arihan, O., Güvenç A. 2011. "Studies on the anatomical structure of stems of willow (*Salix* L.) species (*Salicaceae*) growing in Ankara province, Turkey", Turkish Journal of Botany (Turk J Bot), vol:35,535-551.

Arnaud-Haond, S., Belkhir, K. 2007. GENCLONE: a computer program to analyze genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization, Mol Ecol Notes, 7:15–17.

Avcı, M. 1999. "Türkiye'nin Doğal Söğütleri ve Coğrafi Dağılımları", İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi,1-24.

Azuma, T., Kajita, T., Yokoyama, J., Ohashi, H. 2000. "Phlogenetic relationships of *Salix* (*Salicaceae*) based on *rbcl* sequence data", American Journal of Botany 87, 67-75.

Bakker, F.K., Breman, F., Merckx, V. 2006. "DNA Sequence Evolution in Fast Evolving Mitochondrial DNA and Exons in Geraniaceae and Plantaginaceae Taxon", Vol. 55, No. 4, 887-896.

Bakker, F.T., Culham, A., Gomez-Martinez, R., Carvalho, J., Compton, J., Dawtrey, R., Gibby, M. 2000. "Patterns of nucleotide substitution in angiosperm cpDNA trnL (UAA)-trnF (GAA) regions", *Molec. Biol. Evol.*, 17, 1146-1155.

Baldwin, B.G., Markos, S. 1998. "Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae)", *Mol Phylogenet Evol.*, 10(3),449-63.

Barkalov, V.Y., Kozyrenko, MM. 2014a. "Phylogenetic relationships of *Salix* L. subg. *Salix* species (Salicaceae) according to sequencing data of intergenic spacers of the chloroplast genome and ITS rDNA", *Russian Journal of Genetic*, Vol. 50, Issue 8, 828-837.

Barkalov, V.Y., Kozyrenko, MM. 2014b. "Phylogenetic Analysis of the Far Eastern *Salix* (Salicaceae) Based on Sequence Data from Chloroplast DNA Regions and ITS of Nuclear Ribosomal DNA", *Botanica Pacifica, A journal of plant science and conservation*, 3, 3-19.

Barker, JHA, Pahlich A., Trybush S, Edwards KJ, Karp A. 2003. "Microsatellite markers for diverse *Salix* species", *Mol Ecol Notes*, 3, 4–6.

Baytop, T. 1997. "Türkiye'de bitkiler ile tedavi", Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 340.

Berlin, S., Trybush, SO., Fogelqvist, J., Gyllenstrand, N., Hallingbäck, HR., Åhman, I., Nordh, NE., Shield, I., Powers, SJ., Weih, M., Lagercrantz, U., Rönnerberg-Wästljung, A.C., Karp, A., Hanley, SJ. 2014. "Genetic diversity, population structure and phenotypic variation in European *Salix viminalis* L. (Salicaceae)", *Tree Genetics & Genomes*, 10,1595–1610.

Brown, A. H. D., Moran, GF. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. In: *Proceedings of the symposium on the Isozymes of North American Forest Trees and Insects*. edited by Conkle, M. T., U.S.D.A. Gen. Techn. Rept, PSW-48,1-10.

Brunsfeld, S.J., Soltis DE., Soltis, PS. 1991. "Patterns of genetic variation in *Salix* section *Longifoliae* (Salicaceae)", *American Journal of Botany*, 78, 855-869.

Castiglione, S., Cicatelli, A., Lupi, R., Patrignani, G., Fossati, T., Brundu, G., Sabatti, M, Van Loo, M., Lexer, C. 2010."Genetic structure and introgression in riparian populations of *Populus alba* L", *Plant Biosyst* 144, 656–668

Campbell, D. R., Waser, NM., Melendez, EJ. 1997. "Analyzing Pollinator-Mediated Selection in a Plant Hybrid Zone: Hummingbird Visitation", *The American Naturalist*. 149 (2), 295-315.

Chen, J., Sun, H., Wen, J., Yang, Y. 2010. "Molecular Phylogeny of *Salix* L. (Salicaceae) Inferred from Three Chloroplast Datasets and Its Systematic Implications", *Taxon* 59(1), 29-37.

Cole, CT. 2005 . "Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*)", *New Phytologist* 167, 155–164 .

Cronquist, A. 1981. "An Integrated System of Classification of Flowering Plants", Columbia University Press , New York, 1262.

Davis, P.H. 1965-1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Island*", Volumes 1-10, Edinburg University Press, Edinburgh, UK.

Delmotte, F., Leterme, N., Gauthier, JP., Risper, C., Simon, JC. 2002 . Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers, *Molecular Ecology* 11, 711 – 723 .

Donner, J. 1990. "Distribution maps to P.H. Davis 'Flora of Turkey 1-10', *Linzer Biologische Beträge*" 2, 381-515.

Douhovnikoff, V., Goldsmith, GR., Tape, KD., Huang, C., Sur, N., Bret- Harte, MS.2010. Clonal diversity in an expanding community of arctic *Salix* spp. and a model for recruitment modes of arctic plants, *Arct Antarct Alp Res* 42, 406–411.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue", *Phytochem. Bull.* 19;11-15.

Earl, D.A., Vonholdt, BM. 2012. "STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method", *Conservation Genetics Resources* 4 (2), 359-361.

Falush, D., Stephens, M., Pritchard, JK. 2003. " Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies", *Genetics* 164, 1567–1587.

Falush, D., Stephens, M., Pritchard, JK. 2007. " Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles", *Mol Ecol Notes* 7(4), 574-578.

Fang, Z. 1987. "On the distribution and origin of *Salix* in the world", *Journal of Systematic and Evolution* 25(4), 307-313.

Fischer, B. M., Salakhudinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, KJ., Töpfer, R., Zyprian, EM. 2004. "Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factor on a molecular map of grapevine". *Theor. Appl. Genet.* 108 (3), 501-515.

Francis, R. M. 2016. "POPHELPER: An R package and web app to analyse and visualise population structure". *Molecular Ecology Resources*, DOI: 10.1111/1755-0998.12509.

Fritz, R.S., Orians, MN., Brunfeldt SJ. 1994. "Interspecific hybridization of plants and resistance to herbivores: hypotheses. genetics. and variable responses in a diverse herbivore community". *Oecologia* 97,106-117.

Funk, WC., Blouin, MS., Corn, PS., Maxell, BA., Pilliod, DS., Amish, S., Allendorf, FW. 2005 . "Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape", *Molecular Ecology* 14, 483 – 496 .

Galeuchet, D. J., Perret, C., Fischer, M. 2005 ."Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis fl os-cuculi* L., in a fragmented landscape", *Molecular Ecology* 14, 991 – 1000 .

Güner, A., Zielinski, J., 1993. "*Salix rizeensis* (*Salicaceae*): a new willow from N. E., Turkey", *Karaca Arboretum* 1,1-5.

Güner, A., 2000. *Salix* L. In: Güner A., Özhatay N., Ekim T., Başer K.H.C. (eds.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol: 11, Edinburgh.

Hamza-Babiker, N., Berthold, H., Glossl, J., Arnold, C. 2009."Chloroplast DNA identification of eight closely related European *Salix* species", *Austrian Journal of Forest Science*,126 (3), 175-193.

Hanley, S., Barker, J H A., Van Ooijen, JW., Aldam, C., Harris, SL., Åhman, I., Larsson, S., Karp, A. 2002. "A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers", *Theor Appl. Genet* 105, 1087–1096.

Hardig, T. M., Anttila, CK., Brunfeldt, SJ., 2010. "A Phylogenetic Analysis of *Salix* (*Salicaceae*) Based on *matK* and Ribosomal DNA Sequence Data", *Journal of Botany* (<http://dx.doi.org/10.1155/2010/197696>),12.

- Hardig, T.M., Brunsfeld, S.J., Fritz, R.S., Morgan, M., Orian, C.M. 2000. "Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone", *Molecular Ecology* 9, 9-24.
- Hausner, G., Olson, R., Simon, D., Johnson, I., Sanders, E.R., Karol, K.G., McCourt, R.M., Zimmerly, S. 2006. "Origin and Evolution of the Chloroplast *trnK* (*matK*) Intron: A Model for Evolution of Group II Intron RNA Structures", *Mol. Biol. Evol.* 23(2), 380–391.
- Hamrick, J. L., Godt, M.J., Sherman-Broyles, S.L. 1992. "Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species", *New Forests* 6, 95 – 124.
- Herrera, S. 2006. "Bonkers about biofuels", *Nature Biotechnology* 24(7), 755-660.
- Hillis, D.M., Dixon, M. 1991. "Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference", *The Quat.Rev.Biol.* 66, 411-453.
- Hilu, K., Liang, H. 1997. "The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics", *American Journal of Botany* 84, 830–839.
- Hörandl, E., Florineth, F., Hadacek, F. 2002. *Weiden in Österreich und angrenzenden Gebieten*. Universität für Bodenkultur, Wien.
- Hsiao, C., Chatterton, N.J., Asay, K.H., Jensen, K.B. 1995. "Molecular phylogeny of the Pooideae (*Poaceae*) based on nuclear rDNA (ITS) sequences", *Theoretical and Applied Genetics* 90(3-4), 389-398.
- Hubisz, J.M., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. 2009. "Inferring weak population structure with the assistance of sample group information", *Mol Ecol Resour* 9(5), 1322–1332.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. 2007. "CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure", *Bioinformatics* 23, 1801-1806.
- Karhu, A., Vogl, C., Moran, G.F., Bell, J.C., Savolainen, O. 2006. "Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks", *Journal of Evolutionary Biology* 19, 167 – 176.

[Karolien Van Puyvelde](#), K., Triest, L. 2007. "ISSRs indicate isolation by distance and spatial structuring in *Salix alba* populations along Alpine upstream rivers (Alto Adige and Upper Rhine)", [Belgian Journal of Botany](#) 140(1), 100-108.

Karrenberg, S., Edwards, P.J., Kollman, J. 2002. "The life history of Salicaceae living in the active zone of floodplains", *Freshwater Biology* 47, 733–748.

Kelchner, S.A., 2000. "The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics", *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87, 482-498.

Kikuchi, S., Suzuki, W., Sashimura, N. 2011. "Gene flow in an endangered willow *Salix hukaoana* (Salicaceae) in natural and fragmented riparian landscapes", *Conserv Genet* 12, 79–89.

Lauren-Moreau, A., Pitre, E.F., Brouillet, L., Labrecque, M. 2013. "Microsatellite Markers of Willow Species and Characterization of 11 Polymorphic Microsatellites for *Salix eriocephala* (Salicaceae), a Potential Native Species for Biomass Production in Canada", *Plants* 2, 203-210.

Lauren-Moreau, A., Pitre, E.F., Argus, G.W., Labrecque, M., Brouillet, L. 2015. "*Phylogenetic Relationships of American Willows (Salix L., Salicaceae)*", *PloS ONE* 10(9), e0138963. doi: 10.1371/journal.pone.0138963.

Leskinen, E., Alström-Rapaport, C. 1999. "*Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: evidence from 5.8 S, ITS 1 and ITS 2 of the rDNA*", *Plant Systematic and Evolution* 215, 209-227.

Li, J.H., Bogle, A.L., Klein, A.S. 1997. "Interspecific relationship and genetic divergence of disjunct genus Liquidambar (*Hamamelidaceae*)", *Rhodora* 99, 229-241.

Liu, X., Wang, Z., Dongsheng, W. 2016. "Phylongeny of *Populus-Salix* (Salicaceae) and their relative genera using molecular data set", *Biochemical and Systematic Ecology* 68, 210-215.

Lian, C., Nara, K., Nakaya, H., Zhou, Z., Wu, B., Miyashita, N., Hogetsu, T. 2001. "Development of microsatellite markers in polyploid *Salix reinii*". *Molecular Ecology Notes* 1, 160-161.

Lian, C., Oishi, R., Miyashita, N., Nara, K., Nakaya, H., Wu, B., Zhou, Z., Hogetsu, T. 2003. "Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on

Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis”, *Molecular Ecology* 12, 609-618.

Lin, J., Gibbs, JP., Smart, LW. 2009. “Population genetic structure of native versus naturalized sympatric shrub willows (*Salix*; Salicaceae)”. *Am. J. Bot.* 96, 771–785.

Mahdi, J. G., Mahdi, AJ., Bowen, I. D. 2006. “The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential”, *Cell Proliferation Journal* 39, 147-155.

Meier, B., Lehmann, D., Sticher, O., Bettschart, A.1985. “Brettschart A. Identifikation und Bestimmung von je acht Phenolglykosiden in *Salix purpurea* und *Salix daphnoides* mit moderner HPLC”, *Pharm. Acta. Helv.* 60, 269.

Melanie, T. 2002. “A foliar morphometric determination of very fragmentary *Salix* remains from a late Miocene locality”, SE Western Hungary, *Review of Palaeobotany and Palynology* 121, 77-90.

Mishra, A., Agarwal, S., Jain, CK., Rani, V. 2009. “High GC content: Critical parameter for predicting stress regulated miRNAs in *Arabidopsis thaliana*”, *Bioinformatics* 4(4), 151-154.

Mort, ME., Soltis, DE., Soltis, PS., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A. 2001. “Phylogenetic Relationships And Evolution of Crassulaceae Inferred From matk Sequence Data”, *American Journal of Botany* 88(1), 76–91.

Murakami, N., Nogami, S., Watanabe, M., Iwatsuki, K. 1999. “Phylogeny of Aspleniaceae Inferred from rbcL Nucleotide”, *American Fern Journal* 89 (4), 232-243.

Nei, M., Kumar, S. 2000. “Molecular Evolution and Phylogenetics”, Oxford University Press, New York.

Neuhaus, H., Link, G. 1987. “The chloroplast tRNA (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide”, *Current Genetics* 11, 251–257.

Nissen, L.R., Lepp, NW. 1997. “Baseline concentrations of copper and zinc in shoot tissues of a range of *Salix* species”, *Biomass Bioenergy* 12, 115–20.

Patterson, J., Chamberlain, B, Thayer, D. 2004-2006. “*Finch TV Version 1.4.0*”.

Percy, D.M., Argus, G.W., Cronk, Q.C., Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R. 2014. "Understanding the spectacular failure of DNA barcoding in willows (*Salix*): Does this result from a trans specific selective sweep?", *Mol Ecol.* 2014; 23, 4737–4756.

Perdereau, A.C., Kelleher, C.T., Douglas, G.C., Hodkinson, T.R. 2014. "High levels of gene flow and genetic diversity in Irish populations of *Salix caprea* L. inferred from chloroplast and nuclear SSR markers", *BMC Plant Biology* 14, 202. doi: 10.1186/s12870-014-0202-x

Przyborowski, J.A., Sulima, P. 2010. "The analysis of genetic diversity of *Salix viminalis* genotypes as a potential source of biomass by RAPD markers", *Industrial Crops and Products* 31, 395–400.

Pulford, I.D., Watson, C. 2003. "Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review", *Environment International* 29, 529– 540.

Puschenreiter, M., Turktas, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Laaha, W.W. 2010. "Differentiation of metallicolous and non-metallicolous *Salix caprea* populations based on phenotypic characteristics and nuclear microsatellite (SSR) markers", *Plant Cell Environ.* 33, 1641–1655.

Saarela, J.M., Peterson, P.M., Keane, R.M., Cayouette, J., Graham, S.W. 2007. "Molecular phylogenetics of *Bromus* (Poaceae: Pooideae) based on chloroplast and nuclear DNA sequence data", *A Journal of Systematic and Evolutionary Botany.* 23(1), 450-467.

Sander, M.L., Ericsson, T. 1998. "Vertical distributions of plant nutrients and heavy metals in *Salix viminalis* stems and their implications for sampling", *Biomass Bioenergy* 14, 57– 66.

Savolainen, V., Fay, M.F., Albach, D.C., Backlund, A., Van der Bank, M., Cameron, K.M., Johnson, S.A. 2000. "Phylogeny of the Eudicots: A nearly complete familial analysis based on *rbcl* gene sequences", *Kew Bulletin* 55, 257 – 309.

Serres-Giardi, L., Belkhir, K., David, J., Glémin, S. 2012. "Patterns and evolution of nucleotide landscapes in seed plants", *Plant Cell* 24(4), 1379–1397.

Skvortsov, A.K., Edmondson, J.D. 1970. "*Salix* L. In: Davis, P.H. (ed) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*", Vol:7, 694-716, Edinburgh.

Skvortsov, A.K. 1999. "Willows of Russia and adjacent countries: Taxonomical and Geographical Revision" (transl from: Skvortsov AK (1968) Willows of the USSR: Taxonomic and Geographic Revision. Nauka, Moscow), ed: Zinovjev AG, Argus GW, Tahvanainen J and Roininen H, Joensuu Univierstiy, Joensuu, 307s.

Smaliukas, D., Noreika, R., Karalius, D. 2007. "Clonal selection of *Salix* L. taxa perspective for biofuel production, evaluation of their dendrometric characteristics and accumulation of biomass in short rotation plantations", *Biologija* 53(2), 59–62.

Sochor, M., Vašut, R.J., Bártová, E., Majeský, L., Mráček, J. 2013. "Can gene flow among populations counteract the habitat loss of extremely fragile biotopes? An example from the population genetic structure in *Salix daphnoides*", *Tree Genetics & Genomes* 9, 1193–1205.

Stamati, K., Blackie, S., Brown, J WS., Russell, J. 2003. "A set of polymorphic SSR loci for subarctic willow (*Salix lanata*, *S. lapponum* and *S. herbacea*)". *Molecular Ecology Notes* 3, 280–282.

Stegemann, S., Keuthe, M., Greiner, S., Bock, R. 2012. "Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species", *PNAS* 109(7), 2434–2438.

Steltzer, H., Hufbauer, RA., Welker, JM., Casalis, M., Sullivan, PF., Chimner, R. 2008. "Frequent sexual reproduction and high intraspecific variation in *Salix arctica*: implications for a terrestrial feedback to climate change in the High Arctic", *J Geophys Res-Bioge* 113, 11. doi:10.1029/2007jg000503

Suda, Y., Argus, GW.1968. "Chromosome numbers in some North American *Salix*", *Brittonia* 20, 191-197.

Suh, Y., Thien, LB., Reeve, HE., Zimmer, EA.1993. "Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer of ribosomal DNA in Winteraceae", *American Journal of Botany* 80 (9), 1042-1055.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. 1991. "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA", *Plant Mol. Biol.* 17, 1105-1109.

Tamura, S., Kudo, G. 2000. "Wind pollination and insect pollination of two temperate willow species, *Salix miyabeana* and *Salix sachalinensis*", *Plant Ecology* 147, 185–192 .

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0", *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Terzioğlu, S., Coşkunçelebi, K., Serdar, B. 2007. "Contribution to the description of an endemic Turkish *Salix* species", *Plant Biosystems* 141(1), 82 – 85.
- Terzioğlu, S., Serdar, B., Karaköse, M., Coşkunçelebi, K., Gültepe, M. 2014. "New data on *Salix anatolica* (Salicaceae) endemic to Turkey" , *Biotaxa*, Magnolia Press, Auckland, New Zealand.
- Thibault, J. 1998. "Nuclear DNA amount in pure species and hybrid willows (*Salix*): a flow cytometric investigation", *Canadian Journal of Botany* 76,157-165.
- Triest, L., De Greef, B., De Bondt, R., Van Slycken, J. 2000. " Rapid of controlled crosses and clones from the field suggests that hybrids are rare in the *Salix alba*-*Salix fragilis* complex", *Heredity* 84, 555-63.
- Trybush, S.O., Jahodová, S., Čížková, L., Karp, A., Hanley, S.J. 2012. "High Levels of Genetic Diversity in *Salix viminalis* of the Czech Republic as Revealed by Microsatellite Markers", *Bioenerg. Res.*5(4), 969-977.
- Tunçtaner, K. 1990. "Çeşitli Söğüt Klonlarının Genetik Varyasyonları ve Türkiye'nin Değişik Yörelere Adaptasyonları Üzerine Araştırmalar", Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, İstanbul.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A. 2007. "A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety". *PLoS ONE* 2(12), e1326, DOI:10.1371/journal.pone.0001326.
- Vermerris, W.(editör) 2008. "Genetic Improvement of Bioenergy Crops", Springer, New York, USA, 347-362.
- Wayne, P., Knowles, L.L. 2006. "Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting", *Syst. Biol.* 55(1), 21–30.
- Weeks, A., Daly, D.C., Simpson, B.B. 2004. "The phylogenetic history and biogeography of frankincense and myrrh family (Burseraceae) based n nuclear and chloroplast sequence data", *Molecular Phylogenetic and Evolution* 35, 85-101.

Welter, L. J., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., Zyprian, E. 2002. "Genetic mapping and localisation of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.)", *Mol. Breed.* 20, 359-374.

Wolfe, K.H., Morden, C.W., Palmer, J.D. 1992. "Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 10648–10652.

Wu, J., Nyman, T., Wang, D., Argus, G.W., Yang, Y., Chen, J. 2015. "Phylogeny of *Salix* subgenus *Salix s.l.* (*Salicaceae*): delimitation biogeography and reticulate evolution ", *BMC Evolutionary Biology* 15, 31, <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.qr2vv>.

Zielinski, J. 2000. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands, editor: Güner et al., 2000", Edinburgh, 216-217.

Zielinski, J., Tomaszewski, D. 2008. "*Salix anatolica* (*Salicaceae*), a new species from Turkey", *Annual Botany Fennici* 45, 386-388.

Zimmer, E.A., Hamby, R.K., Arnold, M.L., Leblanc, D.A., Theriot, E.C. 1989. "Ribosomal RNA Phylogenies And Flowering Plant Evolution", In B. Fernholm, K. Bremer, and H. Jornvall (Eds.), *The Hierarchy Of Life*, Elsevier Science, Amsterdam, 205-214.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ZEKİ KAYA
Proje No:	213O154
Proje Başlığı:	Türkiye'deki Söğüt Türlerinin Moleküler Filogenetiği ve Ekonomik Açıdan Önemli Olan Türlerin (Salix alba ve Salix excelsa) Islahına Yönelik Gen Kaynaklarının Karakterizasyonu
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	HAYRİ DUMAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2014 - 01/04/2017
Onaylanan Bütçe:	411600.0
Harcanan Bütçe:	375167.09

TÜBİTAK

Öz:	<p>Ülkemizde doğal olarak 27 Salix türü yayılış göstermekte, teşhisinde problemler bulunmaktadır. Projenin ilk iş paketi kapsamında doğal olarak bulunan söğüt türleri arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için Türkiye bazında örneklenerek, kloroplast genomunun matK, rbcL ve tRNA ile çekirdek genomundaki rDNA ITS bölgelerinin DNA dizileri çoğaltılarak karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Türkiye'deki Söğüt türleri hem kloroplast hem de çekirdek verilerine göre monofiletik yapıda olup filogenetik ağaçta, iki ana grup (Altcins Salix ve Vetrix) altında toplanmaktadır. Altıncı Salix türleri olan S. Alba, S.excelsa, S.fragilis ve melez S.albaxfragilis birbirlerine çok benzer iken S. pentanroides, S.babylonica and S.acmophylla türleri alt cins içinde daha uzak türler olarak bulunmuştur. Alt cins Vetrix türleri S.elbursensis ve S.amplexicaulis altcins içinde en uzak türler olarak bulunmuştur. İki ağaçtaki türlerin konumları arasındaki farklar Söğüt türlerinde görülen kloroplast paylaşımı ve introgresif melezlenme sonucunda oluşmuştur. Söğütlerde en yüksek çeşitlilik gösteren ve nükleotid çeşitliliğine sahip gen bölgesi kloroplast kodlanmayan (trn T-F) bölgesi iken en yüksek GC içeriğe sahip çekirdek ITS gen bölgesi olarak bulunmuştur. Morfolojik olarak iki farklı tür olarak ifade edilen S.alba ve S.excelsa'nın moleküler olarak ayrımı için ilave iş paketi yapılmıştır. Fakat iki tür ayrımı moleküler düzeyde net bir şekilde yapılamamıştır. Kloroplast melezlenmelerine bağlı olarak aynı biyoğrafyayı paylaşan bu popülasyonlarda haplotip (kloroplast DNA) paylaşımının çok olduğu sonucuna varılmıştır. S.alba/ S. excelsa kompleksi olarak örneklenen 9 nehirden toplanan tüm popülasyonlar, moleküler türleşme devam ettiği için S.alba popülasyonları olarak kabul edilmiştir.</p> <p>Projenin ikinci iş paketinde; moleküler markörler (SSR markörler) yardımıyla Türkiye'de doğal olarak yetişen ve ekonomik öneme sahip Salix alba'nın gen kaynaklarının belirlenmesi, kullanımı ve genetik çeşitliliğinin korunmasına katkıda bulunacak genetik bilgiyi üretmek amacıyla, 10 farklı nehir havzasından, toplam 23 farklı popülasyon, 15 farklı çekirdek SSR belirteci ile taranmıştır. Örneklenen Salix alba popülasyonları yapılan genetik yapılaşma analizi sonuçlarına göre birbirinden farklı 3 genetik gruba (K=3) yerleştirilmiştir. Bu 3 ana gruba yüksek yüzde ile temsil eden nehirler sırasıyla 1. gruba Göksu ve Kızılırmak, 2. gruba Ceyhan-Seyhan-Fırat ve ve 3. gruba ise Susurluk ve Çoruh Nehirlerini temsil eden genotipler oluşturmuşlardır. Elde edilen K değerine ve örneklenen genotiplerin alel paylaşımına göre Salix alba Türkiye popülasyonları 3 farklı atasal gen havuzundan evrimleştiği ve bu gen havuzlarının zamanla birbirlerinden tamamen farklılaşmış olduğu gözükmektedir. Çalışılan 10 nehir sistemindeki S. alba popülasyonları genetik benzerlik bakımından iki ana gruba toplanmaktadır. Bu gruplaşmada Anadolu Çaprazı'nın etkisi bariz bir şekilde görülmektedir. Bu coğrafik bariyerin doğusunda kalan Ceyhan, Seyhan, Aras, Fırat ve Çoruh S. alba popülasyonları bir gruba geride kalan nehirler ise diğer gruba oluşturmaktadır. Anadolu Çaprazının batısında kalan nehir sistemlerinde alt grupları Göksu, Kızılırmak-Aksu-Ihlara, ve Susurluk nehirleri oluşturmaktadır. Uzun ve daha farklı habitatları içinde bulunduran nehirler hariç (Kızılırmak ve Göksu) bütün çalışılan nehirlerde genetik çeşitlilik daha düşük ve popülasyon içinde akrabalık derecesi ise daha yüksek bulunmuştur. Bu proje kapsamında örneklenen nehirlerin hemen hepsinde doğal nehir ekosistemlerinin ve habitatlarının büyük bir bölümünün yok olduğu ya da parçalı bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. Nehir ekosistemlerinin kontrol edici görevi olan önemli türlerinden söğütler için (Türkiye durumunda S. alba) gen kaynaklarını koruma programlarının acilen oluşturulması ve bozulmuş nehir ekosistemlerinin restorasyonunda kullanılması gerekmektedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Salix species, Salix alba, Moleküler filogenetik, Genetik çeşitlilik, Genetik yapılanma
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır