

PAPER DETAILS

TITLE: Türkiye'de yayilis gösteren kayin (Fagus) populasyonlarinin moleküler filogenisi

AUTHORS: Gaye EREN KANDEMİR,Yasemin TAYANÇ,Burcu ÇENGEL,Ercan VELIOGLU

PAGES: 69-79

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/265705>

Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi

Dr. Gaye Eren KANDEMİR^{1*}, Dr. Yasemin TAYANÇ¹, Dr. Burcu ÇENGEL¹, Ercan VELİOĞLU²

¹Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, ANKARA

²Kavak ve Hızlı Gelişen Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İZMİT

*Sorumlu yazar/Corresponding author: gayekandemir@ogm.gov.tr, Geliş tarihi/Received: 11.03.2016, Kabul tarihi/Accepted: 25.10.2016

Öz

Fagus orientalis Lipsky (Doğu kayını) Balkanlar’dan Batı Anadolu üzerinden Doğu Kafkasya, Kuzey İran ve Kırım’a kadar yetişen yerli türlerdendir. Türkiye’de ayrıca *Fagus sylvatica* L. (Avrupa kayını) da yayılış göstermektedir.

Bu çalışmada, Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren on bir Doğu kayını ve Avrupa kayını populasyonu çekirdek ITS-5 bölgesi incelenerek tür farkı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada on bir farklı Avrupa ve Doğu kayını populasyonundan örneklem yapılmıştır. Örneklem yapılırken dört tohum transfer zonu dikkate alınmıştır. Bu zonların dışında örneklem yaparken yükselti olarak marjinal populasyonlar da göz önünde bulundurulmuştur. Her bir populasyondan beşer ağacın yaprakları DNA izolasyonu için kullanılmış ve populasyonların çekirdek ribozomal ITS-5 bölgesi dizi analizleri yapılmıştır. Populasyonların ITS-5 bölgesi incelendiğinde, bu bölge DNA dizilerinde Doğu kayını ve Avrupa kayını dizileri farklı bir gruplaşma göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Fagus orientalis*, Doğu kayını, *Fagus sylvatica*, Avrupa kayını, ITS-5.

Molecular phylogeny of beech (*Fagus*) populations in Turkey

Abstract

Fagus orientalis Lipsky (Oriental beech) indigenously grows in the west from Balkans through Anatolia, to the east Caucasus, northern Iran and Crimea. In Turkey there is also natural distribution of *Fagus sylvatica* L. (European beech).

In this study molecular divergence of Oriental beech and European beech was investigated by ITS-5 region. Oriental beech and European beech samples were collected from 11 different natural populations. During sampling, populations were selected from four seed transfer zones of distributional area in Turkey. In addition to different zones, marginal populations were also sampled. For each population, leaves from 5 single-trees were harvested for DNA isolation. Nuclear ribosomal ITS-5 region sequences didn’t show different grouping in European and Oriental beech populations.

Key Words: *Fagus orientalis*, Oriental beech, *Fagus sylvatica*, European beech, ITS-5.

To cite this article (Atıf): KANDEMİR G., TAYANÇ Y., ÇENGEL B., VELİOĞLU E., 2016. Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi, Orman Genel Müdürlüğü. Ormanlık Araştırma Dergisi, 4(1):69-79 DOI: <http://dx.doi.org/10.17568/oar.84722>

1. Giriş

Ülkemiz coğrafik yapısı dolayısı ile orman ağaçları çeşitliliği ve doğal ormanların yayılış göstermesi açısından önemli bir konumdadır. Her biri birer gen kaynağı olan doğal ormanlarımızın genetik yapılarının belirlenmesi ekonomik, ekolojik, etik ve estetik özelliklerinden dolayı önem taşımaktadır (Işık, 1996). Ülkemizin topoğrafik yapısı, iklimi ve insan etkileri yüzünden çok kısa mesafelerde çevre koşulları değişmektedir. Bunun sonucunda her değişik çevre koşulu, değişik genetik yapı ve lokal populasyonlar ortaya çıkarmaktadır. Ağaçlar, yaşamları boyunca kısıtlı bir yaşama ortamı (habitat)

kullandığından, doğal seleksiyon baskısı sonucu o yörenin yaşama koşullarına en iyi uyum sağlayabilmiş ve o yörede en üstün yaşama özelliğini gösteren bireylerdir. Genetik çeşitliliği yüksek olan türler ve ırklar, zamana ve yere göre değişen çevre koşullarına daha başarılı uyum gösterme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca genetik çeşitliliği yüksek olan türler ve ırklar, bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak değişen insan isteklerini karşılamada daha etkili ve yararlı olurlar (Işık 1996). Bu da gösteriyor ki; gerek ıslah gerekse koruma çalışmaları açısından populasyonların genetik yapısının belirlenmesi önem taşımaktadır (Conkle, 1980). Tür içi genetik çeşitliliğin yüksekliği, değişen çevre

Molecular phylogeny of beech (*Fagus*) populations in Turkey

şartlarına uyum açısından bir güvencedir. Genetik çeşitlilik aynı zamanda ıslah çalışmaları için şekillenecek bir hammadde gibidir (Cossalter, 1989). Orman ağaçlarında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde geleneksel yöntem fidan karakteristikleri ve seri kontrollü çaprazlamalarla elde edilen döllerin izlenmesidir (El-Kassaby, 1995). Bu çalışmalar ekonomik veya ekolojik öneme sahip kantitatif ve fizyolojik karakterlere dayanır.

Fagus; Fagaceae familyasına ait altı cinsten biridir. Dünya üzerinde 10 ana tür ve 2 adet melez tür ile temsil edilmektedir: Japon kayını (*Fagus crenata*), Çin kayını (*Fagus gleriana*), Amerikan kayını (*Fagus grandifolia*), Tayvan kayını (*Fagus hayatae*), Japon mavi kayını (*Fagus jaenponica*), Güney Çin kayını (*Fagus longipetiolata*), parıltılı kayın (*Fagus lucida*), Meksika kayını (*Fagus mexicana*), Doğu kayını (*Fagus orientalis*), Avrupa kayını (*Fagus sylvatica*) (Anşin ve Özkan, 1997). Doğu kayını; Avrupa kayını ile benzer özelliklerde olup, birçok bilim adamı tarafından Avrupa kayınının alt türü olarak adlandırılmaktadır. Her iki türün bağlantı bölgesi Yunanistan ve Bulgaristan'dır. Bu bölgedeki kayınlar bazı bilim adamları tarafından *Fagus taurica* diğer bir deyişle; *Fagus sylvatica* ve *Fagus orientalis* arasında geçiş türü olarak adlandırılmakta olup, bazılarına göre de farklı tür olarak kabul edilmektedir. Morfolojik çalışmalar Avrupa kayın populasyonlarının Türkiye'den İran'a uzanan populasyonlardan daha homojen olduğunu göstermiştir (Denk, 1996). Diğer bir tartışmalı durum da, *Fagus moesiaca*'da görülmektedir. *Fagus moesica* ayrı bir tür olarak düşünüldüğü gibi, çoğu zaman da *F. sylvatica*'nın alt türü olarak kabul edilmektedir (Paule, 1995; Vettori ve ark., 2004). Hatzis-kakis ve arkadaşlarının (2011) Yunanistan'dan örneklenen *Fagus sylvatica* subsp. *sylvatica* ve

Fagus sylvatica subsp. *orientalis* yapraklarının morfolojik varyasyonunu araştırdıkları çalışmada, Batıdan örneklenen populasyonların *sylvatica*'ya Doğudan örneklenen populasyonlarında *oreintalis*'e yakınlaştıklarını tespit etmiştir. Söz konusu türlerden ülkemizde Doğu kayını ve Avrupa kayını doğal olarak yayılış göstermektedir. Avrupa kayının adından da anlaşılacağı üzere anavatanı batı-orta ve güney Avrupa'dır. Avrupa kayınının yayılış gösterdiği alanlar ülkemizde net olarak belirlenmemiş olsa da doğu kayınının doğal yayılış gösterdiği bazı yerlerde bulunduğu bilinmektedir. Aydınözü'nün yayınında (2008), Türkiye'de Yıldız Dağları'nda yayılış gösteren Avrupa kayını populasyonları yer almaktadır. Ayrıca Türkiye Florasında da Avrupa kayınının yayılış gösterdiği alanlar belirtilmiştir (Davis, 1982).

Kayın türleri birçok yapraklı ormanda baskın tür olarak görülmektedir. Özellikle kuzey yarımkürenin ılıman kuşağı ağaçlarından olan kayının ekolojisi ve populasyon dinamiği bu alanlarda yoğun olarak çalışılmıştır. Ülkemiz ormanlarının 1.630.296 ha'ı normal, 269.733 ha'ı bozuk olmak üzere toplam 1.899.929 ha'nı kayın ormanı oluşturmaktadır. Bu değer ülkemiz ormanlarının alanının %11,3'üne karşılık gelmektedir (Kandemir, 2013; Anonim, 2015).

Doğu kayını düz, pürüzsüz, açık gri kül renginde gövdesi olan bir ağaçtır. Uç tomurcukları pseudoterminaldir (yan durumlu tomurcuğun yanında gelişme gösteremeyen sürgün ucu kurumuş olarak bir çıkıntı halinde bulunan). Yan tomurcuklar sürgünlere açı yapacak şekilde almaçlı dizilmişlerdir. Yaprakları eliptik, yumurtamsı eliptik olup tam kenarlı dişsizdir (Şekil 1).



Şekil 1. Avrupa Kayını (sol) ovate yaprak şekli ve Doğu Kayını yaprağı (sağ) obovate yaprak şekli
Figure 1. European beech (left) ovate leaf and Oriental beech (right) obovate leaf

Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi

Monoik bir bitkidir, yani erkek ve dişi çiçekler aynı ağacın farklı pozisyonlarında bulunur. Tohumlarında çimlenme engeli vardır. Besin maddesi ve humus bakımından zengin, orta ve derin topraklarda en uygun gelişimi gösterir (Anşin ve Özkan, 1997). Avrupa kayını ve Doğu kayını birbirlerine çok benzemektedirler. Her ikisinde de gri pürüzsüz bir gövde vardır. Yalnız Doğu kayınının gövdesi biraz daha açık gridir. Doğu kayınının yaprakları yumurta şeklinde ve parçacıksızdır (lobsuz). Avrupa kayını ile Doğu kayını arasındaki en önemli fark kupula üzerindeki pullardır (Şekil 2). Spatulat olan bu yapılar Avrupa kayınında bulunmamaktadır (Anonim, 1985; Kandemir ve Kaya, 2009).



Şekil 2. Üzerindeki belirgin spatulat pullarla bir Doğu Kayını kupulası

Figure 2. Spatulate scales on the Oriental beech cupule

Kayın çeşitli kullanım alanları ile de önem taşımaktadır. Kayının odunu orta yoğunlukta diye tabir edilen (0,66 g/cm³), öz odunu sert, güçlü ve darbelere karşı oldukça dirençlidir. Bu nedenle buharla şekil verilmeye uygundur. Buna rağmen Doğu kayınının asıl kullanım alanı yakıt olarak bilinmektedir. Bunun yanında kaplama, mobilya, parke, maden direği, travers yapımında ve kâğıt endüstrisinde de kullanılmaktadır (Kandemir ve Kaya, 2009).

Türkiye ormanlarının çoğunluğunu ibreliler oluşturmalarına rağmen (%53,92) kuzey yarıkürede 10 tür ile temsil edilen kayın, yapraklı ormanların en önemli türlerinden biridir (Anonim, 2006). Kayın ormanları, ülkemizde asırlardan beri süregelmektedir, ancak uygun amenajman planı ve işletmesi uygulanmadan yapılan kesimler sonucu yerlerini önemli ölçüde ormangülü, böğürtlen ve eğreltilerden ibaret zengin ve hızla yayılan çalı ve ot katına bırakmıştır (Atalay, 1992; Kandemir, 2010).

Avrupa kayını, Avrupa ağaç türleri içinde en çok araş-

tırmaya konu olan ağaç türü olup; bu tür ile yapılan çalışmalarda ekoloji, paleoekoloji ve genetik önemli yer tutmaktadır (Magri ve ark., 2006). Ancak en geniş yayılışını ülkemizde yapan Doğu kayını için aynı şeyleri söylemek mümkün değildir.

Türkiye’deki kayın ormanlarının çoğu antropojen etkiler ve işletme hataları nedeniyle sürgün kökenli bireylerden oluşmaktadır. Bu durum odun kalitesini olumsuz yönde etkilemekte, genetik tabanın daralmasına neden olmakta ve genetik yenilemeyi engellemektedir (Çalıkoglu ve Kavgacı, 2001).

Anavatanı ülkemiz olan ve doğal yayılışının büyük bir kısmını ülkemizde gerçekleştiren doğu kayını dünya üzerinde Bulgaristan’dan başlayarak, Türkiye, Kafkasya ve İran’da doğal olarak yayılış göstermektedir. Türkiye’deki en geniş ve en uygun yayılışını Demirköy’den Hopa’ya kadar Karadeniz sahiline paralel uzanan dağların orta ve yüksek kısımlarında ve özellikle kuzey bakılarda kurduğu saf ve karışık ormanlarda yapar. Marmara Bölgesi ile Anadolu’da da yer yer görülür. Doğu Akdeniz’de Adana’nın Pos ormanlarında, Amanos Dağları’nda, Yozgat-Çekerek’de, Kahramanmaraş-Andırın yöresi ile Kütahya çevresinde lokal ve relikt olarak bulunur. Doğu kayını rutubetçe zengin, yağışın dengeli olduğu ılıman iklimlerden hoşlanır (Anşin ve Özkan, 1997; Atalay, 1992).

Doğu kayını, Türkiye’deki yapraklı ağaç türlerinin içinde ağaçlandırma hacmi bakımından en önemli türdür ve bu türde doğal gençleştirmeler yapılmaktadır. Kayın ormanları tomruk eldesi için önem taşımasının yanında çevre ve toprak koruma nedeniyle de göz önünde bulundurulmalı ve ibrelilere alternatif olarak da düşünülmelidir (Koski ve Antola, 1993).

Doğu kayını yaygın bir yapraklı tür olması ve Türkiye ekonomisi için önemi düşünülerek Milli Ağaç Islahı Programına konu olmaktadır. Bu programa dahil edilmiş tek yapraklı türdür. Kayının temel ıslah amacı ibrelilere benzer olarak boy ve hacim artımıdır. Düzgün gövde, yuvarlaklık, ince ve geniş dal açısı gibi karakterler üzerinde de durulması gerektiği düşünülmektedir (Koski ve Antola, 1993).

Doğu kayını iklim ve ekolojik şartlara göre iki ana ıslah zonuna ayrılmıştır (Atalay, 1992). Her iki ıslah zonunun sınırı iklim şartlarının deniz ikliminden karasala dönüştüğü Karadeniz sahiline paralel uzanan ilk sıradağlardan geçmektedir. Bu iki ıslah zonuna ilaveten Milli Ağaç Islahı Programında bir de tohum üretim zonu önerilmiştir. Ana ıslah zonlarında üç, tohum üretim zonunda üç olmak üzere altı adet alt zon ve bir de Amanos Dağlarında gen koruma zonu ayrılmıştır. Böylece Milli Ağaç Islahı Programında Doğu kayını dört ıslah zonuna ayrılmıştır (Koski ve Antola, 1993).

Doğu kayınının ülkemizde geniş alanda yayılış göstermesi, tohum üretimi ve ağaçlandırma ça-

Molecular phylogeny of beech (*Fagus*) populations in Turkey

lışmaları açısından tohum transfer zonlarının belirlenmesi ihtiyaını doğurmuştur (Atalay, 1992). Kayın ormanlarının yetişme, dolayısıyla bonitet, verim g ve floristik kompozisyon özellikleri bakımından önemli farklılıkları bulunduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, kayının yetişmesinde etkili olan tüm ekolojik öğeler dikkate alınarak, tohum transferi açısından Türkiye kayın ormanları bölgelere ve bölgelerde değişen yağış, sıcaklık, bakı, yükseklik, floristik kompozisyona göre 4 ana ve 30 alt bölgeye ayrılmıştır (Tablo 1). Doğu kayını tohum transfer zonları Tablo 1 de yer almaktadır.

Tablo 1. Tohum Transfer Zonları ve Alt Zonları (Atalay, 1992)
Table 1. Seed Transfer Zones and sub-zones of Oriental beech (Atalay, 1992)

KARADENİZ SAHİL ZONU	
1.1	Camili Havzası
1.2	Göktaş-Murathı arası oruh Havzası
1.3	Sarp-Ordu arası
1.4	Ordu-Sinop arası
1.5	Sinop-Ereğli arası
1.6	Ereğli-Akçakoca arası
1.7	Çatalca-Kocaeli bölümü
1.8	Samanlı Dağları doğu bölümü
1.9	Istranca Dağları doğu bölümü
1.10	Istranca Dağları orta ve batı bölümü
1.11	Istranca Dağları güney bölümü
KARADENİZ ARDI ZONU	
2.1	Ortaköy ve Dökmeci yukarı havzası
2.2	Artvin yöresi
2.3	Yukarı Altıparmak (Barhal) Havzası
2.4	Orta Harşit Havzası
2.5	Koyulhisar-Taşova, Kelkit Nehri kuzeyi
2.6	Kelkit vadisi güney bölümü
2.7	Ladik-Boyabat bölümü
2.8	Kastamonu Havzası
2.9	Ara ayı yukarı havzası (Karabük-Ara arası)
2.10	Dokurcun yukarı havzası
MARMARA ZONU (Trakya hariç)	
3.1	Samanlı Dağları batı bölümü
3.2	Katırlı-Avdan Dağları kuzey bölümü
3.3	Güney Marmara (Kapıdağ-Karadağ) bölümü
3.4	Uludağ-Domaniç Dağları bölümü
3.5	atal-meraltı Dağları bölümü
3.6	Biga-Gnen bölümü
3.7	Kazdağı bölümü
3.8	Akdağ (Dursunbey) bölümü
3.9	Demirci-şaphane-Murat Dağları (Kuzeydoğu Ege bölümü)
AMANOS ZONU	
4	Amanoslar (gen koruma alanı)

Son yıllarda bitkilerin tanımlanmasında morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler verilerin kullanılması hız kazanmıştır. Yüksek yapılı bitkiler çekirdek genomu ve organel genomuna (kloroplast ve mitokondri) sahiptirler. Çekirdek genomu lineer yapıdadır ve eşeyli kalıtımlanır. Fakat kloroplast ve mitokondri genomu eşeysiz olarak kalıtımlanır ve halkasal yapıdadır (Graham ve Olmstead, 2000). Kloroplast DNA dizileri bölgesi yapısı itibarı ile bitkilerde moleküler filogenetik çalışmalarda kullanılan başlıca bölgelerdendir (Baldwin, 1992; Alvarez ve Mendel, 2003). Bu bölgeler kodlanmayan yapıları itibarı ile kodlanan bölgelere göre filogenetik analizler bakımından daha anlamlı varyasyonlar oluşturmaktadır. Bu nedenle de taksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır (Gielly ve Taberlet, 1994). Çekirdek ribozomal ITS (Internal Transcribed Spacers) bölgesi de son yıllarda bitkilerin evrimsel araştırmalarında en çok kullanılan bölgelerden birisidir (Alvarez ve Mendel, 2003; Hughes ve ark. 2006; Feliner ve Rossellbo, 2007). Bunun en önemli nedeni, farklı taksonomik seviyelerdeki bitkiler için, geniş bir yelpazedeki bitki türlerinde kullanılabilen evrensel primerler geliştirilmiş olmasıdır (White ve ark. 1990). Ayrıca, varyasyon düzeyi nedeniyle, tür seviyesinde moleküler çalışmalar için yeterli belirteç sağlar. Bu nedenle, ITS bölgesi poliploid taksonların orjini, hibritleşme, introgresyon (geri melezleme) ve filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. ITS bölgesi Fagacea ailesinde *Quercus* (Manos ve ark. 1999; 2001; Bellarosa et al. 2005; Cases ve ark. 2007; Denk ve Grimm 2010), *Castanea* (Manos ve ark. 2001) ve *Fagus* (Denk et al. 2002)'ta filogenetik ilişkilerin ortaya koyulması amaçlı birçok çalışmada kullanılmıştır.

Dirik (1994), ormancılıkta kullanılabılmenin temel koşullarından biri olan korumanın; bir yandan yasal ve yönetsel önlemlerin alınmasını, diğer yandan da teknik çalışmaların ekolojik ve biyolojik ilkelerle uyumlu olmasını, bu ilkelerin temel dayanaklarından birinin de ormanların genetik yapıları olduğunu belirtmektedir. Bu bağlamda ormancılıkta yapılan genetik çalışmalar direk ya da dolaylı olarak koruma çalışmalarına hizmet etmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde yayılış gösteren Doğu kayını ve Avrupa kayını popülasyonlarında ITS-5 bölgesi farklılaşması araştırılmıştır. Morfolojik olarak farklılık gösteren bu iki tür arasındaki moleküler farklılaşmanın ITS-5 bölgesindeki boyutunu ortaya koymak hedeflenmiştir.

Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi

2. Materyal ve Yöntem

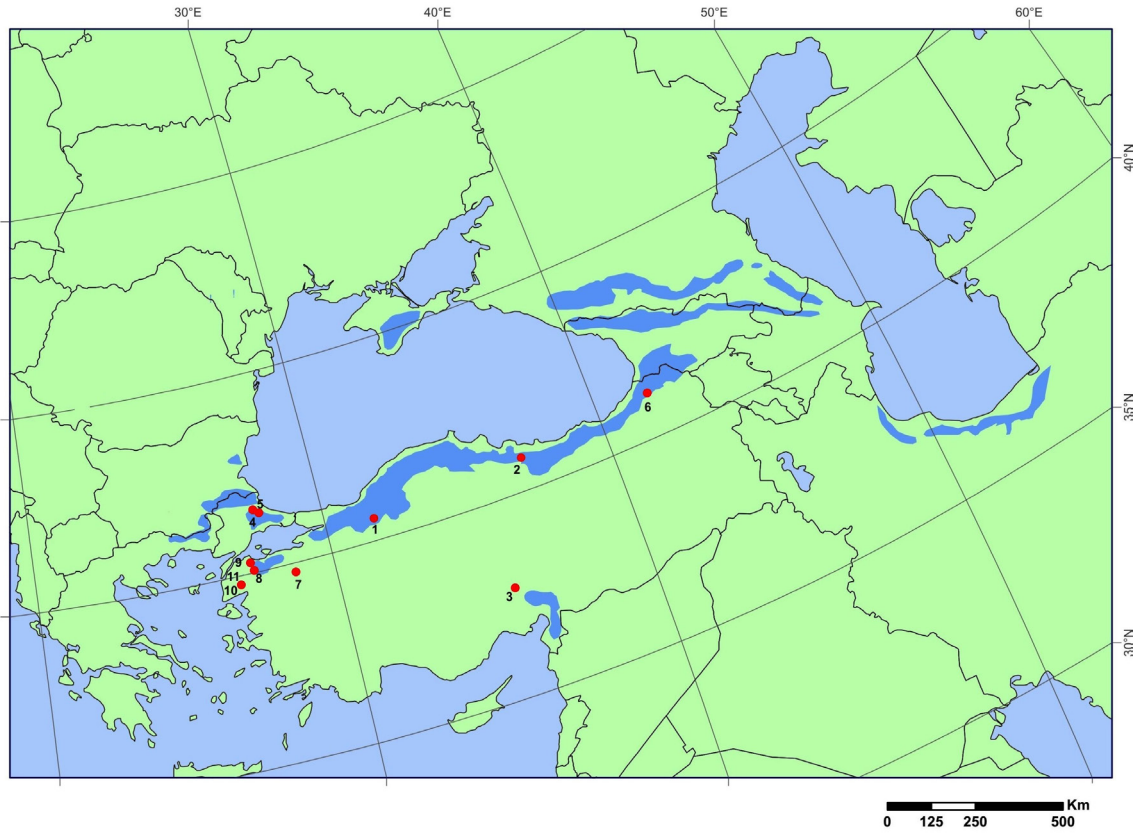
2.1. Örneklenen populasyonlar

Örnekleme tohum transfer zonları (Tablo 1) dikka-

te alınarak yapılmıştır. Örnekleme yapılan popu-
lasyonlar Tablo 2’ de verilmiştir. Populasyonların
Türkiye haritası üzerindeki dağılımları ise Şekil
3’te gösterilmiştir.

Tablo 2. Örneklenen populasyonlar ve özellikleri
Table 2. Studied populations and properties

No	Populasyonlar	KOD	Örneklenen birey sayısı	Tohum transfer zonu (Tablo 1)	Yükselti (m)
1	Bolu- Ayıkayası	AYI	5	2.10	1100
2	Akkuş-Göllüce	GOL	5	1.4	1260
3	Kadirli-Taşköprü	TAS	5	4	1500
4	Demirköy-Kadinkule	DEM	5	1.10	700
5	Demirköy-Kadinkule	KAD	5	Avrupa kayını	700
6	Yusufeli-Altıparmak	YUS	5	2.3	2100
7	Dursunbey-Çamlık	CAM	5	Avrupa kayını	1670
8	Alaçam-Alaçam	ALA	5	Avrupa kayını	1700
9	Alaçam-Değirmeneğrek	DEE	5	3.8	1600
10	Kalkım-Sarıot	SAR	5	Avrupa kayını	1300
11	Kalkım-Sarıot	SARdk	5	3.7	1300



Şekil 3. Örneklenen populasyonların kayın dağılım haritası üzerindeki yerleşimleri
Figure 3. Distribution map of studied populations

2.2. Örnekleme yöntemi

Her bir populasyondan 5'er ağaç olmak üzere toplam 55 ağaçtan yaprak örnekleri alınmıştır. Meşcerelerden örnekleme yapılırken, aileler arasında en az 100 m mesafe olmasına, 300 m'den fazla yükselti farkı olmamasına dikkat edilmiştir. Her bir ağaçtan toplanan yapraklar ayrı ayrı torbalarla, buzluklarla en kısa sürede Orman Ağaçları ve tohumları İslah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü derin dondurucularına ulaştırılmıştır. Yaprak örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

2.3. DNA izolasyonu

PCR analizlerine uygun saflıkta DNA elde edebilmek için hazır DNA izolasyon kiti denenmiştir. Ancak denenilen farklı DNA izolasyon kitlerinden hiçbirisi istenilen verimlilikte sonuç vermemiştir. Bu yüzden, çeşitli DNA izolasyon yöntemleri denenmiş ve bunlar arasında en iyi sonuç Doyle ve Doyle'nin (1990) CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) protokolüyle elde edilmiştir. Sonuç olarak, kayın yapraklarından DNA izolasyonunda bazı değişiklikler yapılarak aşağıdaki protokolün kullanılmasına karar verilmiştir:

1. Yapraklar sıvı azotla beyazlayıncaya kadar ezilip 0.5 gram tartılarak tüplere konulur.
2. Üzerine önceden ısıtılmış 15 ml CTAB özütlemeye tamponu eklenip karıştırılır.
3. Tüpler su banyosunda (65°C) 1 saat bekletildikten sonra 14000rpm'de 10 dakikasentrifüj edilir.
4. Üst faz yeni tüplere alınır, üzerine 10 ml kloroform:oktanol (24:1) solüsyonu eklenip, karıştırıldıktan sonra 14000 rpm'de, 15 dakika santrifüjlenir.
5. Üst faz alınarak, daha önceden 10 ml soğuk isopropanol konulmuş tüplere aktarılır.
6. Ultra soğuk (-80°C) dolapta 1 saat bekletilir.
7. Yeniden 14000rpm'de 10 dakikasentrifüj edilir.
8. Üst faz dökülür. Çökelti 5 ml %70 etil alkolle iki kere yıkanır.
9. Tüpler ters çevrilerek kurumaya bırakılır.
10. Çökelti 200 µl TE tamponuyla çözülür.

Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

2.4. Elde edilen DNA miktarlarının ölçülmesi ve seyreltilmesi

Elde edilen tüm DNA örneklerinin konsantrasyonları UV Visible spektrofotometreyle (Amers-

ham Gene Quant) ölçülmüştür. Elde edilen DNA konsantrasyonları 40 µg/ml - 1100 µg/ml arasında değişmiştir. Sonuç olarak, PCR uygulamaları için tüm DNA örnekleri 50 ng/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş DNA örnekleri çalışma süresince +4°C'de saklanmıştır.

2.5. PCR optimizasyonu ve ITS bölgesi çoğaltılması

PCR'da doğru sonuçlar elde edebilmek ve bant yapısının net olması için değişik primerler denenmiştir. Elde edilen PCR ürünleri 2 µl yükleme boyası eklenerek, % 2,5'lik Nu Micropor agaroz jelde, 1x TAE tamponuyla, 80 Voltta 3 saat yürütülmüştür. Ayrıca jellerde 2-3 kuyucuğa, elde edilen bantların büyüklüklerini belirlemek amacıyla DNA standardı yüklenmiştir.

PCR tepkime karışımının optimizasyonu için, farklı DNA ve primer konsantrasyonlarıyla, Bovine Serum Albumin (BSA) ve Tween 20 etkisi denenmiştir. Çoğaltılan ITS-5 bölgesi, dizi analizlerinde kullanılmıştır. Söz konusu bölgenin primerleri Tablo 3'de yer almaktadır.

Analizlerde en iyi sonuç verenlerden ITS-5 geni kullanılmıştır. Bu gen için polimeraz zincir reaksiyonu tepkime karışımı ve PCR bilgileri Tablo 4 ve 5 de verilmiştir. DNA dizi analizinde hem geri (reverse) hem de ileri (forward) primerler kullanılmış, elde edilen 2 dizi üst üste konularak diziler üzerindeki varsa boşluklar tamamlanmıştır. Elli beş bireyden otuzunda ileri ve geri primerlerle oluşturulan diziler eksiksiz tamamlanmış ve analizlerde eksiksiz dizi veren bu otuz birey kullanılmıştır. Her populasyondan minimum iki örnek kullanılmıştır.

2.6. İstatistik değerlendirme

DNA dizileri CHROMAS programı ile kontrol edilmiş, CLUSTELX 2 (Thompson ve ark., 1997) programı ile alt alta dizilmiş, diziler arasındaki farklar işaretlenmiştir. Daha sonra MEGA formatına dönüştürülmüş, populasyonlar arası mesafe MEGA-5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura ve ark., 2011) analiz programı ile hesaplanmıştır.

3. Bulgular

Bu çalışmada, Türkiye'de yayılış gösteren on bir Doğu kayını ve Avrupa kayını populasyonunun dizi analizi çekirdek ribozomal ITS-5 bölgesi çoğaltılarak incelenmiş ve populasyonların arasındaki bağlantı hesaplanmıştır.

On bir populasyonda 684 baz çifti analize tabi tu-

Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi

Tablo 3. Populasyonların dizi analizlerinde kullanılan primerler
Table 3. Primers used for the sequence analysis

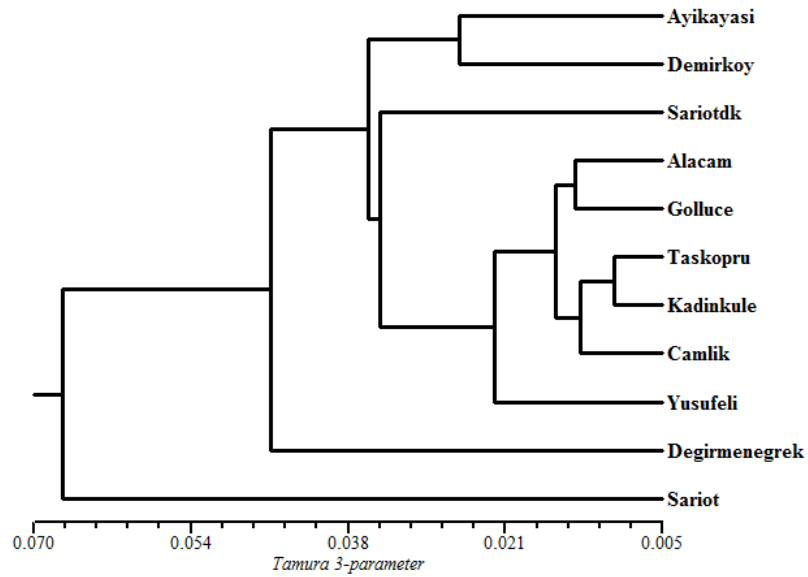
DNA dizi analizi bölgeleri	Primer dizileri (5’-3’)
ITS-5 geni	<i>ITS5</i> (ileri): GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G <i>26S-25R</i> (geri): TAT GCT TAA ACT CAG CGG GT

Tablo 4. ITS-5 için optimizasyonu yapılan PCR tepkime karışımı
Table 4. ITS-5 PCR mixture

PCR tepkime içeriği	Kullanılan miktar	Son etkin miktar
Steril Su	33,5 µl	
dNTP (10 mM)	1 µl	0,4 µM
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	1,5 µM
Tampon (10 x)	5 µl	1 x
Primer (100 µM)	2+2 µl	1 µM
TaqDNA Polimeraz (5 u/µl)	0,5 µl	1 u
DNA (ng/µl)	2 µl	10 ng
Toplam Miktar	50 µl	

Tablo 5. ITS-5 için PCR tepkime reaksiyonları
Table 5. ITS-5 PCR reaction

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü sayısı	Tanım
95	5	1	İlk sarmal bozulumu
95	1		Sarmal bozulumu
54	1	35	Birleşme
72	1		Uzama
72	10	1	Son uzama



Şekil 4. ITS-5 dizi analiz sonuçlarına göre oluşturulan dendrogram
Figure 4. ITS-5 sequence analysis dendrogram

Molecular phylogeny of beech (*Fagus*) populations in Turkey

Tablo 6. ITS-5 bölgesi dizileri baz (Timin, Guanin, Adenin, Sitozin) kompozisyonu
Table 6. ITS-5 region sequence base composition (Thymine, Guanine, Adenine, Cytosine)

Bireyler	T(imin)	S(itozin)	A(denin)	G(uanin)	Toplam
Alaçam1	18,5	32,3	20,0	29,2	650,0
Alaçam2	17,7	33,2	20,3	28,7	654,0
Alaçam3	18,0	32,2	20,3	29,4	649,0
Ayıkayası2	17,8	32,7	20,2	29,3	645,0
Ayıkayası5	18,2	32,9	20,0	28,9	650,0
AF456965 (Gen bankası örneği)	18,6	31,9	20,7	28,8	652,0
AF456959 (Gen bankası örneği)	17,7	32,4	20,5	29,3	648,0
Çamlık3	18,1	32,6	20,4	29,0	648,0
Çamlık4	17,6	32,7	20,3	29,4	649,0
Değirmeneğrek1	18,0	32,7	20,2	29,1	649,0
Değirmeneğrek4	18,0	32,0	20,0	30,0	650,0
Değirmeneğrek5	17,9	33,2	19,9	28,9	653,0
Demirköy1	18,5	31,9	20,3	29,3	659,0
Demirköy2	18,2	32,0	20,3	29,5	660,0
Demirköy5	18,0	32,1	20,3	29,5	660,0
Göllüce1	18,4	32,1	20,0	29,5	651,0
Göllüce2	17,9	32,6	19,9	29,5	647,0
Göllüce3	17,9	32,7	20,3	29,1	649,0
Kadinkule3	18,0	32,7	20,3	29,0	649,0
Kadinkule4	19,7	32,7	19,7	27,9	664,0
Sarıot3	17,9	32,5	20,3	29,3	649,0
Sarıot4	18,2	32,5	19,9	29,4	649,0
Sarıotdk1	17,7	32,5	20,2	29,6	649,0
Sarıotdk3	17,9	32,4	19,8	29,9	648,0
Sarıotdk4	18,1	33,6	19,5	28,7	645,0
Sarıotdk5	17,9	32,7	20,2	29,2	648,0
Taşköprü1	18,0	31,7	20,7	29,6	646,0
Taşköprü4	18,2	32,4	20,2	29,3	649,0
Taşköprü5	18,0	32,4	20,2	29,4	649,0
Yusufeli2	17,9	32,5	20,2	29,4	649,0
Yusufeli3	18,2	32,5	20,2	29,1	649,0
Yusufeli4	18,2	32,4	20,2	29,3	649,0
Ortalama	18,1	32,5	20,2	29,2	650,3

tulmuştur. Bu baz çifti dizisinde 684 bazdan 499 tanesi korunan bölgedir (conserved), diğer bir deyişle 499 baz bütün bireylerde aynı sıralamayı göstermiştir. Çalışılan bölgede 169 baz değişken ve 60 tanesi de filogenetik olarak bilgi sağlayan baz dizisi (parsimony informative) olarak bulunmuştur.

Bu bölgedeki mutasyonlar kontrol edilmiş ve baz dizisi incelendiğinde toplam yedi transisyon (pürin-pürin ve pirimidin-pirimidin değişikliği) ve on bir adet de transversiyon (pürin-pirimidin veya pirimidin-pürin değişikliği) tespit edilmiştir. Dizide 629 bazda ise herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Transisyon/transversiyon oranı ise 0,62 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan dizi analizlerinde baz kompozisyonu her bir birey için bakılmış ve T (Timin), G (Guanin),

A (Adenin) ve S (Sitozin) oranları tespit edilmiştir. Tablo 6 da görüldüğü gibi dizilerin 645 baz ile 664 baz arasında değiştiği gözlenmiştir. Ortalama 650,3 baz bulunmaktadır. Analiz edilen Doğu kayını ve Avrupa kayını bireylerinde ITS-5 bölgesi çoğunlukla Sitozinlerden oluşmaktadır, (%32,5) en az Timin (%18,1) içermektedir (Tablo 6).

Yapılan dizi analizleri sonucuna göre Doğu kayını ve Avrupa kayını arasında farklı bir gruplaşma gözlenmemiştir. Avrupa kayını popülasyonları olan Demirköy-Kadinkule, Dursunbey-Çamlık, Alaçam-Alaçam ve Kalkım-Sarıot gruplaşmalar içerisinde dağılmıştır. Aynı bölgeden toplanan Doğu kayını ve Avrupa kayını popülasyonları (Demirköy- Kadinkule ve Kalkım-Sarıot) Kimura mesafe analizine (Kimura,1964; 1980) göre farklı kollarda yer almışlardır. Ancak yakın mesafeden

Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi

toplanan Alaçam, Sarıotdk (Sarıot doğu kayını), Değirmeneğrek populasyonları birbirine yakın çıkmıştır. Avrupa kayınları bu ikinci gruplaşma alanında çoğunlukta bulunmaktadır. Bu grubun dışında bir tek Sarıot Avrupa kayını populasyonu yer almaktadır. Yine Demirköy-Kadınkule’den toplanan Doğu kayını ve Avrupa kayını dizileri farklı gruplarda yer almışlardır (Şekil 4).

Aritmetik ortalamalara göre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ile her bir bireyler gruplandığında Avrupa kayınları ve Doğu kayınlarının grup oluşturmadığı dağınık gruplar oluşturdukları görülmektedir (Nei, 1972).

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada örneklenen on bir Doğu kayını ve Avrupa kayını populasyonunun ITS-5 bölgesi dizi analizleri yapılmıştır. Yapılan ITS-5 bölgesi dizi analizleri sonucuna göre Doğu kayını ve Avrupa kayını arasında farklı bir gruplaşma gözlenmemiştir. Sarıot (Avrupa kayını) populasyonu diğer populasyonlardan ayrılmıştır. Sarıot bölgesinden örneklenen Avrupa kayını ve Doğu kayını farklı gruplar içinde yer almıştır. Diğer bir deyişle Sarıot Avrupa kayını, Avrupa kayınları ile grup oluşturmadığı gibi, diğer populasyonlardan da ayrılmıştır.

Denk ve arkadaşlarının (2002) Doğu Avrupa ve Batı Asya kayın populasyonlarında genetik, morfoloji ve fosil kayıtları kullanarak yaptığı kapsamlı bir çalışma bulunmaktadır. Avrupa ve Asya’ya ait kayın populasyonlarında yapılan allozim çalışmasında populasyonlar arası genetik çeşitlilik (F_{ST}) değerleri bakımından oldukça farklılaştıklarını ortaya koymuşlardır. Asya populasyonları Doğu kayınında da Avrupa kayınında da allelik zenginlik açısından Avrupa populasyonlarından daha yüksek seviyede bulunmuştur (Gömöry ve ark. 2007).

Hatziskakis ve arkadaşlarının (2009) *F. sylvatica* da kloroplast haplotip çeşitliliği ile ilgili yaptıkları çalışmada genetik çeşitlilik değerlerinin 0,69 ile 0,19 arasında değişmekte olduğu görülmüştür. Bu değerlerin içinde en düşük olanı 0,19’la Türkiye’den toplanan populasyonlardan elde edilmiştir. Yine Papageorgiou ve arkadaşlarının (2008) *F. sylvatica* ve *F. orientalis* ile yaptıkları çalışmada (*F.orientalis*’i, *F.sylvatica*’nın alttürü olarak kabul etmişlerdir. Rodoplar’dan, toplanan populasyonlarda AFLP kullanılarak elde edilen genetik çeşitlilik değerleri oldukça düşük ve kloroplast DNA’sı ile yapılan çalışmada ise daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada doğudan batıya gidildikçe kayın populasyonlarındaki genetik çeşitlilik değerinin yükseldiğine işaret edilmiştir.

Gailing ve Wuehlisch (2004)’in Doğu kayını ve Avrupa kayınında AFLP belirteçleri ve kloroplast mikrosatellitleri ile yaptıkları çalışmada, Avrupa kayını ve Türkiye’nin kuzeyinden örneklenen Doğu kayınları farklı gruplaşma oluştururken, yine aynı çalışmada kloroplast mikrosatellitleri kullanılarak yapılan gruplamada Avrupa kayınları iki farklı tip oluşturmuş, Türkiye’nin kuzeyinden alınan örneklerde ise farklı kloroplast tipleri görülmüştür. Bu örneklerde yüksek kloroplast varyasyonu tespit edilmiştir. Kloroplast bölgesi belirteçleri ile ITS-5 bölgesinin benzer sonuçlar ortaya koyduğu düşünülmektedir. Çalışma *F. orientalis* ve *F. sylvatica*’nın coğrafik olarak ayrılmış (allopatik) taksa olduğunu ortaya koymuştur.

Avrupa kayını ile yapılan bir çalışmada paleobotanik ve genetik veri kullanılarak iklim sığınakları ile İber Yarımadası, İtalya ve Balkanlar’da ki bitki coğrafyası hakkında farklı bir yapılaşma ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada kloroplast markörleri kullanılmış, ancak farklı haplotip gruplaşması gözlenmemiştir (Magri ve ark. 2006). Ancak daha önce yapılan farklı bir çalışmada 3 farklı haplotip bulunmuştur (Demesure ve ark. 1996). Yunanistan’ın kuzeyinden Rodop Dağları’ndan toplanan populasyonlarla yapılan çalışmada morfolojik olarak Doğu kayını ve Avrupa kayını özellikleri gösteren populasyonlarda genetik çeşitlilikte doğudan batıya gidildikçe kademeli bir artış olduğu gözlenmiştir (Papageorgiou ve ark. 2008).

İran’dan örneklenen 14 Doğu kayını populasyonunda, kloroplast DNA’sı *trnD*, *trnT* bölgesi ile yapılan çalışmada 3 farklı haplotip bulunmuştur (Shanjani ve ark., 2004). İran’dan örneklenen bu bireylerde farklı DNA bölgelerinin dizileri Doğu kayınında belirgin ya da ayırt edici bir dizilim olmadığı sonucunu doğurmaktadır.

ITS-5 bölgesi incelendiğinde Doğu ve Avrupa kayınlarının ayırt edici bir fark oluşturmaması iki türün birbirinin hibriti olabileceği fikrini de düşündürmektedir. Çünkü bu türlerin hibritleşmesi için en geçerli sebep olan coğrafik yakınlıktır ve aynı örneklem alanında her iki kayının da bulunuyor olması bu fikri pekiştirmektedir. Aynı şekilde Balkanlar da ki kayının her iki kayına da benzemesi ya da her iki kayından da ayrılması Avrupa kayınının bir ekotipi olabileceği hipotezini de ortaya koymaktadır (Gömöry ve ark. 1999).

Linnaeus zamanından buyana botanikçiler bitki tür çeşitliliğini ortaya koymak için çeşitli karakterleri taksonomik kanıt olarak kullanmışlardır. Bunların içinde morfoloji, anatomi, embriyoloji, polen biyolojisi, kromozomlar, proteinler, bitkilerin yan ürünleri ve DNA dizi verisi yer almaktadır. Buna

Molecular phylogeny of beech (*Fagus*) populations in Turkey

rağmen hızlı ve doğru olarak bitki türünü ayırt etmek oldukça zordur (Li ve ark., 2011). Kayının genom büyüklüğü de dikkate alınırsa (Lesur ve ark., 2015), tüm genomdaki bir DNA bölgesinde tür farklılaşması görülmemesi çok şaşırtıcı bir sonuç değildir.

Teşekkür

Bu makale; T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünce yürütülen Kayın (*Fagus*) Populasyonlarının Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi, ANK-030 1621/2008-2013” adlı araştırma projesi kapsamında hazırlanmıştır.

Kaynaklar

Alvarez, I., Mendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 417-434.

Anonim, 1985. Kayın. OAE El kitabı dizisi no: 1. Muh-telif yayınlar serisi: 42. Ankara

Anonim, 2015. Orman Varlığımız. OGM yayını Ankara.

Anşın, R., Özkan, Z. C. 1997. Tohumlu bitkiler. Odunsu taksonlar. KTÜ Or. Fak. Yayın no: 19. Trabzon.

Atalay, İ. 1992. Kayın ormanlarının ekolojisi ve tohum transfer yönünden bölgelere ayrılması. OATIAM Yayın no: 5. 209 sayfa, ANKARA.

Aydınözü, D., 2008. Avrupakayınının Yıldız Dağlarındaki yayılış alanı Coğrafya Dergisi (İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü) Sayı: 17, sayfa 44-56.

Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in PLants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

Conkle, M.T. 1980. Amount and Distribution of Isozyme Variation in Various Conifers Species. In: Proceeding of the 7th Meeting. Canadian For. Ser. page: 109-117.

Çalikoğlu, M. Kavgacı, A. 2001. Biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilirliği ve artırılması açısından baltalıkların koruya dönüştürülmesi. İÜ Fak Der. Seri B, Cilt 51. sayı 1. 111-121.

Cossalter, C. 1989. Genetic Conservation: A cornerstone of breeding strategies: Breeding Tropical Trees. Population Structure and Gene Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry. (Proc. IUFRO Conference Pattaya, Thailand, November 1988). Gibson, G.J. Griffin, A.R. Matheson, A.C. (Ed.) Oxford Forestry Institute, Oxford, U.K. 28-38.

Davis, P. H. 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Island, Edinburg Uni. Pres. Volume VII.

Demesure, B., Comps, B. Petit, J. 1996. Chloroplast

DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520.

Denk, T. H. 1999. The taxonomy of *Fagus* in Eurasia. 2: *Fagus sylvatica* subs. *Sylvatica*. Feddes Repertorium 11: 5-6, 381-412.

Denk, T. Grimm, G., Stögerer, K., Langer, M., Hemleben, V. 2002. The evolutionary history of *Fagus* in western Eurasia: evidence from genes, morphology and the fossil record. *Plant Systematics and Evolution* 232: 213–236.

Dirik, H. 1994. Genetik çeşitlilik orman gen kaynaklarının korunması. İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Seri B, Cilt 44, Sayı 3-4, Sayfa 13-121, İstanbul.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

El-Kasaby, Y. A. 1995. Evaluation of the tree improvement delivery system: Factors affecting genetic potential. *Tree Physiol.* 15:545-550.

Feliner, G. N., Rossello, J. A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:911-919.

Gailling, O., Wuehlisch, V.G. 2004. Nuclear markers (AFLPs) and chloroplast microsatellites differ between *Fagus sylvatica* and *Fagus orientalis*. *Silvae Genetica*, 53, 3.105-110.

Gielly, L., Tabarlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 11(5): 769-777.

Graham, S.W., Olmstead, R.G. 2000. Systematics utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the Angiosperms. *American Journal of Botany*, 11: 87-97.

Gömöry, D., Paulo, L., Brus, P., Zhelev, Z., Tomovic, Z., Gracans, J. 1999. Genetic differentiation and phylogeny of beech on Balkan Peninsula. *J. Evol. Biol.* 12, 748-754.

Gömöry, D., Paulo, L., Vysyn, J. 2007. Patterns of allozyme variation in western Eurasian *Fagus* Botanical Journal of the Linnean Society [Volume 154, Issue 2](#), pages 165–174, June 2007.

Hatziskakis, S., Papageorgiou, A.C., Gailing, O. Finkeldey, R. 2009. High chloroplast haplotype diversity in Greek populations of beech. *Plant Biology* 11, 425-433.

Hatziskakis, S., Tsiripidis, I., Papageorgiou, A. C. 2011. Leaf morphological variation in beech (*Fagus sylvatica* L.) populations in Greece and its relation to their post-glacial origins. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165: 422-436.

Hughes, C.E., Eastwood, R.J., Bailey, C.D. 2006. From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Phil. Trans. R. Soc.B.* 361:211-225.

Türkiye’de yayılış gösteren kayın (*Fagus*) populasyonlarının moleküler filogenisi

- Kandemir, G.E. 2010. COST Action E52, Genetic resources of beech in Europe-current state, vol 25, pp 256-264.
- Kandemir, G. 2013 <http://www.fao.org/3/a-i3825e/i3825e71.pdf>.
- Kandemir, G., Kaya, Z. 2009. Technical guidelines of EUFORGEN. *Fagus orientalis*, Lipsky.
- Kimura, M., Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-38.
- Kimura, M. 1980., A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–120.
- Koski, V., Antola, J. 1993. Türkiye Milli Ağaç Islahı ve Tohum Üretimi Programı. Ankara.
- Li, D-Z, Gaoa, L-M., Lia, H-T., Gea, X-J., Liu, J-Q., Chena, Z. D., Zhoua, S-L., Yanga, J-B., Fua, C-X, Zenga, C-X., Yana, H-F., Zhua, Y-J., Suna, Y-S., Chena, S-Y., Zhao, L., Wanga, K., Yanga, T. and Duana, G-W. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS*, vol. 108 no 149, p19641-19646.
- Magri, D., Vendramin, G. G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D., Latalowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J.M., Tantau, I., Van Der Knap, W. O., Petit, R. J., Beaulieu, J. L. 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Papageorgiou, A. C., Vidalis, A., Gailing, O., Tsiripidis, I. Hatziskakis, S., Boutsios, S. Galatsidas, S., Finkeldey, R. 2008. Genetic variation of beech (*Fagus sylvatica*) in Rodopi (N.E. Greece). *European Journal of Forestry Research* 127: 81-88.
- Paule, L. 1995. Gene conservation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) *For. Genet.* 2 (3): 161-170.
- Shanjani, P., Vettori, C. Giannini, R., Khavari-Nejad, R. A. 2004. Intraspecific variation and geographic patterns of *Fagus orientalis* Lipsky chloroplast DNA. *Silvae Genetica* 53, 5-6 page 193-197.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL –X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 (24): 4876-4882.
- Vettori, C., Pafetti, D., Paule, L. Giannini, R. 2004. Identification of the *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* L. species and intraspecific variability. *Forest Genetics* 11(3-4): 223-230.
- White, T.J., Bruns T., Lee S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes For Phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Zobel, B., Talbert, S. 1984. Applied forest tree improvement. North Carolina State University. Wiley and Sons. Inc. NY.