



T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Çay Varyetelerinin ISSR Markırları ile Tanımlanması

Melike KAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2013

**T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Çay Varyetelerinin ISSR Markırları ile Tanımlanması

Melike KAÇ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

RİZE 2013

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Çay Varyetelerinin ISSR Markırları ile Tanımlanması

Melike KAÇ

Yüksek Lisans

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31/05/2013

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 17/06/2013

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih Ş. BERİŞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Fatih YILMAZ Y.



RİZE 2013

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Çay Varyetelerinin ISSR Markırları ile Tanımlanması” başlıklı “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Yüksek Lisans eğitim sürecinde, emeği geçen ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ’e ve çalışmanın planlanması, değerlendirilmesinde her türlü desteğini gördüğüm ve bu çalışmayı yapabilmem için her türlü laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Cemal SANDALLI başta olmak üzere tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini, yardımını ve bilgilerini benimle paylaşan değerli arkadaşım Arş. Gör. Necla PEHLİVAN’a, ve tezimin hazırlanması sırasında desteğini esirgemeyen ve emeği geçen başta Arş. Gör. Ayşegül SARAL, Arş. Gör. Azer ÖZAD DÜZGÜN, Biyolog Emine Esra BUDAK’a ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu zamana kadar maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan anneme, manevi aileme ve nişanlım Ercan AKKAYA’ya şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma RTEÜ-BAP-2013.102.03.4 nolu proje ile desteklenmiştir.

Melike KAÇ

Rize 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÖZET	
VI	
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Moleküler Tekniklerin Çay Genotiplerini Tanımlamada Kullanılması	4
2. MATERİYAL ve METOD	7
2.1. Materyal.....	7
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Çeşit ve Genotipler	7
2.2. METOD	8
2.2.1. Yaprak Örneklerinin Toplanması	8
2.2.2. Yapraklardan DNA İzolasyonu	8
2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	9
2.2.4. ISSR PCR Uygulamaları	9
2.2.4.1. PCR Uygulamalarının Tekrarlanabilirliği ve Agoroz jel Elektroforezi	11
2.2.4.2. Sonuçların Değerlendirilmesi	12
2.2.5. SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region Marker; Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik diziler) Markır Geliştirme.....	12
2.2.5.1. Polimorfik Bantların Klonlaması	14
3. BULGULAR	16
3.1 DNA Analizleri	16
3.2. ISSR Analizleri.....	16
3.2.1. Benzerlik İndeksi ve Genetik İlişki Dendogramı	25
3.3 SCAR Analizleri.....	27
3.3.1. ISSR-G(AC) ₈ Primeri ile Çoğaltılan Fragmentin Baz Analizinin Belirlenmesi.....	27

4. TARTIŞMA.....	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
6. KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	36

ÖZET

Bu çalışma, Türk orijinli 19 çay varyetesi arasında ki genetik benzerliği belirlemek için ISSR DNA moleküler markır teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Çay varyetelerindeki genetik farklılığı tespit etmek için 21 adet ISSR primeri denenmiş ve 15 tanesinin çalışmaya uygun olduğu görülmüştür. Bu primerler kullanılarak yapılan ISSR çalışması sonucunda elde edilen PCR bantları Rohlf (1988)' e göre benzerlik indeksi oluşturulmuş ve NTSYS-PC Ver. 2.0 programı ile dendogramı oluşturulmuştur. Bu dendograma göre en yüksek benzerlikleri %74 ile Çayeli - İyidere varyeteleri, %72,5 ile Pazar - Derepazarı varyeteleri ve %72 ile Enstitü 1 - Enstitü 2 ve %68,5 ile Gündoğdu - Tuğlalı varyeteleri göstermektedir. Birbirine en yakın grup içerisinde Ardeşen - Fındıklı - Pazar varyeteleri yer almaktadır. Dendogramda görülen diğer ikili dallamalarda %65 ile Pazar 20 – Muradiye ile Üniversite - Üniversite 2 çiftleri ve %59 ile Derepazarı 7 – Hayrat varyeteleri göstermektedir. Birbirine %59 benzeyen Derepazarı 7 – Hayrat çifti %54 benzerlik ile diğer tüm çay varyetelerinden ayrılmaktadır. *Camellia olifera* ise *Camellia sinensis* – *Camellia assamica* hibritleri olan çalışmamızda kullandığımız çay varyetelerinden %26,5 benzerlikle dış grup olarak ayrıldığı görülmektedir. Dendograma göre aynı coğrafi bölgeyi paylaşan Çayeli – Ardeşen – Fındıklı – Pazar varyetelerinin %66, Gündoğdu – Tuğlalı varyetelerinin %68,5 ve Derepazarı – Hayrat varyetelerinin %59 benzediği görülmektedir. Farklı coğrafi bölgelerde yetiştirilmekte olduğu halde çift oluşturmuş olan Pazar 20 – Muradiye, Çayeli – İyidere, Pazar – Derepazarı çiftlerinin ise çelikle üretilmediklerinden dolayı doğal olarak gözlemlenen seksüel açılım dolayısıyla benzer bantlar vermesi sebebiyle birbirine yakın benzerlikte olduğu düşünülmektedir.

Çalışma sonucunda çay varyetelerinin belirlenmesinde ISSR markırlarının kullanılabileceği bir kez daha görülmüştür. Çalışma RTEÜ-BAP-2013.102.03.4 nolu proje ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çay, *Camellia sinensis*, ISSR, DNA markırı, Genetik analiz, benzerlik.

SUMMARY

Determining of Genetic Diversity of Turkish Tea Varieties Using ISSR DNA Markers

In this study, we aimed to determine of genetic diversity of 19 tea varieties originated from Turkey using ISSR DNA marker techniques.

We used 15 ISSR primers that selected previous studies including 21 primers. Obtained PCR bands profiles were analyzed similarity indeks by Rohlf (1988). We used NTSYS-PC Ver. 2.0 to obtain dendrogram. Utilising cluster analysis, maximum genetic sismilarity was found between Çayeli and İyidere with 74%, Pazar and Derepazarı with 72.5%, Institute 1 and Institute 2 with 72%, and Gundogdu and Tuglali with 68.5%, respectively. We obtained the closed group among Ardesen, Findikli, Pazar which these varieties were closed located geographically. We generally see binary branching i.e. between Pazar 20 and Muradiye, Universtity 1 and 2 with 65%, Derepazari 7 and Hayrat with 59%, respectively. Wee see that outgroup, *Camellia olifera* was similar tea varieties, *Camellia sinensis* and *C. assamica* hybrits with 26.5%.

In this research, ISSR marker techniques was succesful for determining genetic similarity between tea varieties. This research supports by funds from Recep Tayyip Erdogan University BAP Unit (2013.102.03.4).

Key Words: Tea, *Camellia sinensis*, ISSR markers, genetic analysis, similarity.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Çaylık Alanlara Göre İllerin Dağılımı	3
Şekil 2. Çay varyetelerinin Örnekleme Noktaları	8
Şekil 3. Favor Prep Plant Genomic DNA Ekstraksiyon Mini Kit Genomik DNA'ların %0,7 agaroz jel elektroforezi fotoğrafı.....	16
Şekil 4. (CT) ₈ GG ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	17
Şekil 5. (AC) ₈ G ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	17
Şekil 6. (AC) ₈ C ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	18
Şekil 7. (AC) ₈ TG ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	18
Şekil 8. (AC) ₈ CG ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	19
Şekil 9. G_(AC) ₈ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin % 1,4'lük AGE görüntüsü.....	19
Şekil 10. (GT) ₈ C ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	20
Şekil 11. (CTC) ₆ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	20
Şekil 12. (GAA) ₆ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	21
Şekil 13. (CAG) ₆ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	21
Şekil 14. (CAG) ₆ GT ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	22
Şekil 15. (CAA) ₆ G ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	22
Şekil 16. (GATA) ₄ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	23

Şekil 17. (CTGA) ₄ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	23
Şekil 18. (GACA) ₄ T ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.....	24
Şekil 19. Çay genotipleri arasında ki benzerlik indeksine dayanılarak çizilen dendogram	26
Şekil 20. ISSR-G(AC) ₈ Primeri ile çoğaltılan PCR ürünlerinden 6 ve 7 nolu örnekten elde edilen sıranın karşılaştırılması.	28
Şekil 21. Şekil 21. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü	29
Şekil 22. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü	29
Şekil 23. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü	30
Şekil 24. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü..	30

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Türkiye’ de yıllar itibariyle çay üretimi	2
Tablo 2. Çalışmada kullanılan çay çeşit ve varyeteri ile alındıkları genetik kaynaklar.	7
Tablo 3. ISSR Primerleri ve Tm Dereceleri	10
Tablo 4. ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	11
Tablo 5 Çayda ISSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları.....	11
Tablo 6. SCAR Primerleri ve Tm Dereceleri	13
Tablo 7. SCAR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	13
Tablo 8. Çayda SCAR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları.....	13
Tablo 9. Çay varyetelerine ait benzerlik indeksi	25

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
RAPD	Random Amplified Polymorphic
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
SSR	Simple Sequence Repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
DNA	Deoksiribonükleik Asit
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik Asit
PCR	Polymerase Reaction
RÇveBKAE	Rize Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü
SCAR	Sequenced Characterized Amplified Region Marker
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
sn	Saniye
rpm	Revolutions perminute
dk	Dakika
ng	Nanogram
mM	Milimolar
U	Unite
kb	Kilobaz
TAE	Trizma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA
UV	Ultraviolet
Bİ	Benzerlik İndeksi
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
Amp	Ampisilin

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Çay, dünyada sudan sonra en fazla tüketilen içecektir. Çay bitkisinin taze sürgün yapraklarının işlenmesiyle elde edilir. Angiospermae sınıfından olan çay bitkisi, Dicotyledonea alt sınıfı içerisinde Theaceae (*Camellia*) familyasındandır. 1950 yılında çayın ismi *Thea sinensis* L. olarak kabul edilmiştir. Daha sonra yapılan sistematikte çay *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze olarak isimlendirilmiştir. *Camellia* familyasındaki bitkiler genel anlamda tüm mevsimlerde yeşil renkli, sık yapraklı ve boyları 1.5 metreye kadar yükselebilir özelliktedirler. Sürgün devreleri çeşitlilik gösterir, dinlenme dönemlerinde çiçek açar, çiçekler yaprağın üstünde ve yan taraflarında meydana gelir. Çay bitkisi 100 seneye kadar yaşayabilir. Yalnız, 50. senenin üzerinde verim düşmeye başlar. Assam çeşitlerinde 40-50 yaş sonrasında %1 oranında hayatiyet kaybı görülür. Çin çeşidi çaylarda yaşam ve verim 100 yıla kadar düzenli olarak devam eder. Bitki yüksekliği fazla değildir. Yapraklar sıra üzerinde, her mevsim yeşil renkli, elips şeklinde, uzunca ve parlaktır. Yaprakların altı tüylü, yaşlı yapraklar koyu yeşil, deri gibi sert ve düzdür. Yaprakların dal üzerindeki duruşu bir yaprak hizasında fakat, ikinci devirde, yeni altı yaprak sonra hizaya gelecek şekilde düzenli olarak bulunur. Çay bitkisinde çiçek açma dönemi, farklı bölgelere göre değişim gösterebilir. Çiçek açma Temmuz-Ocak ayları arasında olabileceği gibi Ağustos-Aralık veya Ekim-Aralık aylarında da kendini gösterebilir. Çay çiçekleri, genellikle yabancı çiçek tozları ile döllenirler. Tohum bağlama, döllenmiş tüm çiçeklerde gerçekleşmez. Döllenme oranına göre az sayıda tohum oluşur (Ataseven, 2012).

Ticari anlamda önem kazanmış üç farklı çay tipi mevcuttur. Bunlar yetiştirildikleri ülkelere göre Assam Çayı, Çin Çayı ve Kamboçya Çayı olarak isimlendirilmektedir. Bunlar arasında morfolojik ve ekolojik olarak birçok benzer özellikler bulunmasına rağmen farklı yanları da bulunmaktadır (Ataseven, 2012).

Çay bitkisinin yapraklarında alkaloidler, fenolik bileşikler, uçucu yağlar ve değişik vitaminleri bulundurması önemli bir özelliğidir. Dünyada Yeşil ve Siyah çay olmak üzere iki çay ürünü elde edilmektedir. Bunların her ikisinin de ham maddesi, çayın taze yaprakları olmakla beraber, bu yaprakların işlenme tarzındaki farklılıklar, farklı kalitede ürünlerin elde edilmesine neden olmaktadır. Anavatanı Çin ve Hindistan olan çayın Türkiye’de ilk defa yetiştirilme girişimi, 1888 yılında Bursa’da yapılmış fakat

başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Etkili bir biçimde çay yetiştiriciliği 1937 yılında başlatılmıştır. Çay bitkisinin körpe yaprakları ile tomurcuğunun değişik yöntemlerle işlenmesi sonucu farklı tip çaylar elde olunur. Siyah çay üretimi ile yeşil çay üretimi arasındaki en önemli ayırım, siyah çay üretiminde fermantasyonun (yükseltgenmenin) uygulanmış olmasıdır. Siyah çayda renk, koku ve lezzet enzimatik oksidasyon sonucu oluşur (Ataseven, 2012).

Yıllar itibariyle dalgalanmalar olmakla birlikte yaş çay üretim miktarında son yıllarda artışlar görülmüştür. Bu durumun temel gerekçeleri iklim koşullarının bitki gelişimi için uygun geçmesi, çay tarım alanlarının (kaçak yapılan çaylık tesisleri) genişlemesi ve alımlarda ürün standardının tam anlamı ile korunamamış olmasıdır. 2011 yılı itibariyle 758.895 dekar alandan 1,23 milyon ton yaş çay üretimi gerçekleştirilmiştir (Ataseven, 2012).

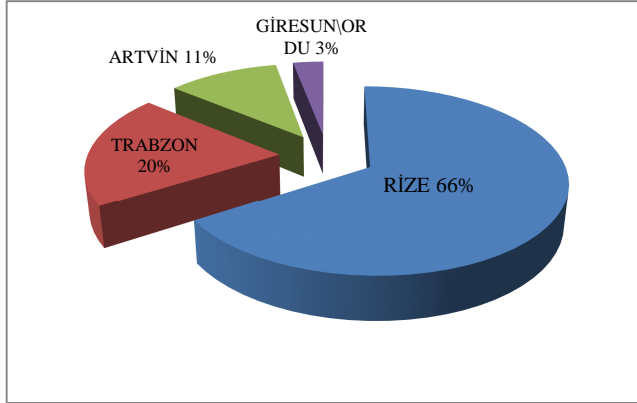
Tablo 1. Türkiye’de yıllar itibariyle çay üretimi (Ataseven, 2012).

Yıl	Çaylık Alan(Dekar)	Yaş Çay (Ton)	Kuru Çay(Ton)
2007	765 808	1 145 321	121.694
2008	758 257	1 100 257	123.804
2009	758 513	1 103 340	111.594
2010	758 641	1 305 566	106.355
2011	758 895	1 231 141	116.357

Türkiye’de çay tarımı Doğu Karadeniz Bölgesinde Gürcistan sınırından başlayarak Ordu ilinin Fatsa ilçesine kadar olan kuşakta yapılmaktadır. Bu bölge içerisinde başta Rize olmak üzere Ordu, Giresun, Trabzon ve Artvin illerinde çay yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölge dünyada çay yetiştiriciliği yapılan alanlar içerisinde en üst bölgeler arasında yer almaktadır. Gürcistan sınırından Trabzon ilinin Araklı ilçesine kadar olan alan Türkiye’de çay yetiştirilmesi bakımından en elverişli ve birinci derecede verimli çay üretim alanlarını

oluşturmaktadır. Çay Doğu Karadeniz Bölgesinde yaşayan halkın en önemli gelir kaynaklarından birisini teşkil etmektedir (Ataseven, 2012).

Çaylık alanların % 65,62'si Rize, % 20,46'sı Trabzon, % 11,3'u Artvin, % 2,6'si ise Giresun ve Ordu illerinde bulunmaktadır (Şekil 1) (Ataseven, 2012).



Şekil 1. Çaylık alanlara göre illerin dağılımı (%).

Türkiye’de Doğu Karadeniz Bölgesi’nde dar bir alanda yetiştirme olanağı bulunan çay, ülke ekonomisine katkısıyla birlikte temel içecek maddesi olarak da önem arz etmektedir. Ayrıca çayın yetiştiği bölgede farklı tarım ürünü yetiştirme olanağının fazla olmaması bölge insanı için çayın ekonomik değerini artırmıştır. Bunun yanında çayın aradığı iklim şartlarından dolayı farklı bölgelerde yetiştirme olanağının olmayışı çay bölgesinin önemini artırmıştır. Çay ürününün yetiştiği Trabzon ve Rize yöresinin genel coğrafi ve sosyo-ekonomik yapısının kendine has özelliklerinin tarımsal alanda çay üretimini bölgede alternatifsiz bırakmaktadır. Çay üretimi bölge ekonomisinde son derece önemli bir yer tutmaktadır. Bölge sanayisinin neredeyse tamamı çay üretimine yöneliktir. Ancak bölge insanının arazi mülkiyeti sınırlı olduğu için çay üretimi küçük çapta aile üretimi şeklinde yapılmaktadır (Ataseven, 2012).

Çok geniş bir bitki ailesinin üyesi olan çaylar, türler arasında sitogenetik ve morfolojik özellikleri ile tanımlamak kolay olduğu halde, tür içi tanımlamada bu özellikler yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, türlerin generatif çoğaltma yöntemleri ile, aynı ve farklı koşullarda birbirini izleyen çoğaltmalar çok geniş bir varyasyonun ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu sebeple, çay gen kaynaklarının belirlenmesi ve isminin doğruluğunun araştırılması önemli bir araştırma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Klasik veya modern anlamda çalışmaların yapılmamış olması, bu alandaki araştırma sebeplerini daha da kuvvetlendirmektedir (Beriş, 2001).

1.2. Moleküler Tekniklerin Çay Genotiplerini Tanımlamada Kullanılması

Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA markırı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) olmuştur. Fakat bu yöntemin maliyetinin çok yüksek ve yavaş olması PCR' a (Polymerase Chain Reaction) dayalı moleküler markırların gelişmesine neden olmuştur. Bu markırların bazıları RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) ve mikrosatellitlerdir. Çeşitler arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmak ve en uygun moleküler markır tekniğini belirlemek amacıyla birçok bitki türünde bu yöntemler karşılaştırılmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda; polimorfizm bakımından SSR (Simple Sequence Repeat) ve AFLP markırları, maliyet bakımından RAPD ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP markırlarının avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bunların yanı sıra çalışılacak laboratuvar olanakları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve koşulların sınırlı olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılacak yöntemler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yüksek çözünürlükte agaroz kullanarak veya akrilamit jeli gümüş nitratla boyayarak SSR ve AFLP analizleri de radyoaktif madde kullanmadan uygulanabilmektedir (Doğan, 2006).

SCAR markırlar orijinali olan RAPD markırlara göre daha üstün özelliklere sahiptir. RAPD bantlarının seleksiyonu amacıyla kullanılmasında ortaya çıkabilecek diğer amplifikasyon ürünlerini ortadan kaldıran SCAR markırlar, ilgili özelliğin gen bölgesinde bir lokusta olması nedeniyle ve dolayısıyla da PCR sonuçlarının daha kararlı olmasını sağlar. Çok düşük miktarlarda kalıp DNA (reaksiyon başına 10-100 ng) gerektirmesi, yüksek duyarlılıkta olması ve kolay ve hızlı kullanım sunan SCAR markırları, bu avantajlarının yanında primer konstriksiyonu için ilgilenilen sıranın bilgisini gerektirir. SCAR markırları, RAPD markırlarından daha çok tekrarlanabilir. SCAR markırlarının seçiciliğinin artmasında kullanılan primerlerin uzunluğunun 24 baz kadar olması da kesin sonuç almada önemli rol oynar (Beriş, 2001).

Çay genotiplerinin belirlenmesinde moleküler markırlardan oldukça fazla yararlanılmaktadır. Bu markırlar içerisinde en çok tercih edilenlerden biride ISSR markırlarıdır. Günümüze kadar yapılan benzer çalışmalar şu şekilde özetlenebilir.

Matsumoto ve ark. (2004), Kore' de yetiştirilen 297 çay örneğine ait fenilalanin ammonia liyaz genine ait cDNA'ları RFLP ile analiz ederek genotiplerin ayrımını yapmış ve bu genin Kore çaylarının genetik ayrımında kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Singh ve Singh Ahuja (2006), Çin Assam ve Kamboçya çay tiplerine ait 28 farklı klonun 5S rDNA bölgelerinin RFLP çalışması ile ayırımını yapmıştır.

Yao ve ark. (2008), Çin Japonya ve Kenya' da yetiştirilmekte olan çay kültürlerinin ayırımını ve çay yetiştiriciliği programında atasal seleksiyonun önemini ortaya koymak amacıyla 48 kültürde 21 ISSR primeri kullanarak ISSR analizi yapmıştır. Böylece Kuzey, Güney, Güneybatı, Doğu, Orta Çin, Japonya ve Kenya popülasyonlarını birbirleriyle olan ilişkisini ortaya koymuştur.

Lai ve ark. (2001), Tayvan' da yetiştirilmekte olan 21 Çin, 3 Assam ve 7 hibrit klon ile birlikte 6 doğal Tayvan yabani çayı olmak üzere 37 genotipin RAPD ve ISSR analizlerini yaparak genetik ilişkisini ortaya koymuştur.

Wang ve ark. (2010), Yeşil çay üretiminde kullanılan Qiannianxue ve Xiaoxueya albino çay kültürlerinin ayırımını RAPD analizi ile yapmışlardır.

Lee ve ark. (2003), 24 Japonya, 7 Kore çay kültürünü ve 6 *Camellia* türü olmak üzere 37 *Camellia* cinsine ait örneğin filogenetik ilişkisini AFLP tekniğiyle ortaya koymuştur.

Ujihara ve ark. (2011), 7 Japonya ticari çay kültürü, 4 anaç kültür 3 genetik kaynak ve 2 *Camellia* cinsi olmak üzere toplam 67 kültürü kullanarak EST bağımlı CAPS DNA markırı ile kültürler arasında ki genetik belirlemeyi yapmışlardır.

Wachira ve ark. (1997), Kenya' da yetiştirilmekte olan 28 çay kültüründe RAPD ve STS analizleriyle ayırım yapmıştır.

Ben-Ying ve ark. (2010), Çin kaynaklı 134 çay genotipini 18 primeriyle ISSR analizi ile genetik yakınlığını belirlemiştir.

Prabu ve Mandal (2010), çay genotiplerinin EST analizlerinde kullanılmak üzere hedef genlerin belirlenmesini ve miRNA'larının bilgisayar ortamı identifikasyonunu ilk kez çalışmıştır.

Freeman ve ark. (2004), 15 çay genotipi kullanarak mikrosatellit analizlerinde kullanılmak üzere tekrar motiflerini belirlemiştir.

Vijayan ve ark. (2009), 112 *Camellia* türünde ITS analizi kullanılarak moleküler taksonomi çalışması yapmıştır.

Beriş, Kaç ve Sandallı (2013), Türkiye' de yetiştirilmekte olan çay kültürlerine ait ITS analizi ile ayırımını yapmıştır (yayınlanmamış veri).

Roy ve Chakraborty (2009), Çin'de yetiştirilmekte olan Çin, Assam ve Kamboçya tiplerine ait 21 çay genotipini 7 ISSR primerleriyle karşılaştırmış, Kamboçya ve Assam tiplerinin %67, bunların Çin tipleriyle de benzerliğini %59 bulmuşlardır.

Dan (2006), Vietnam'da yetiştirilen yerel kültürar, seçilmiş çay klonları farklı ülkelerden ithal edilen kültürar ve klonlardan oluşan 71 örnek üzerinde 7 ISSR primeri ile benzerliğini araştırarak polimorfizmini ortaya koymuştur.

Thomas ve arkadaşları (2006), UPASI-10 clonuna ait 16 somaklonal varyantın 40 ISSR primeri ile polimorfizmini ortaya koymuştur.

Mondal (2002), Hindistan kökenli 25 farklı çay kültürarını 12 ISSR primeri kullanılarak genotiplerin taksonomik sınıflandırılmasını yapmışlardır.

Çay genotiplerinin belirlenmesinde ISSR markırlarının dışında, RAPD, AFLP, Mikrosatellit ve ITS sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüze kadar ülkemizde yetiştirilen çay klonlarının ve/veya varyetelerinin genotipi üzerine yapılan iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların ilkinde Enstitü tarafından belirlenen 8 çay klonunun RAPD primerlerle benzerliği araştırılmıştır (Beriş ve ark., 2005). Diğer çalışmada ise Rize ve Trabzon da yayılış gösteren 32 çay genotipi AFLP tekniği kullanılarak karşılaştırılmıştır (Kafkas ve ark., 2009).

2. MATERYAL ve METOD

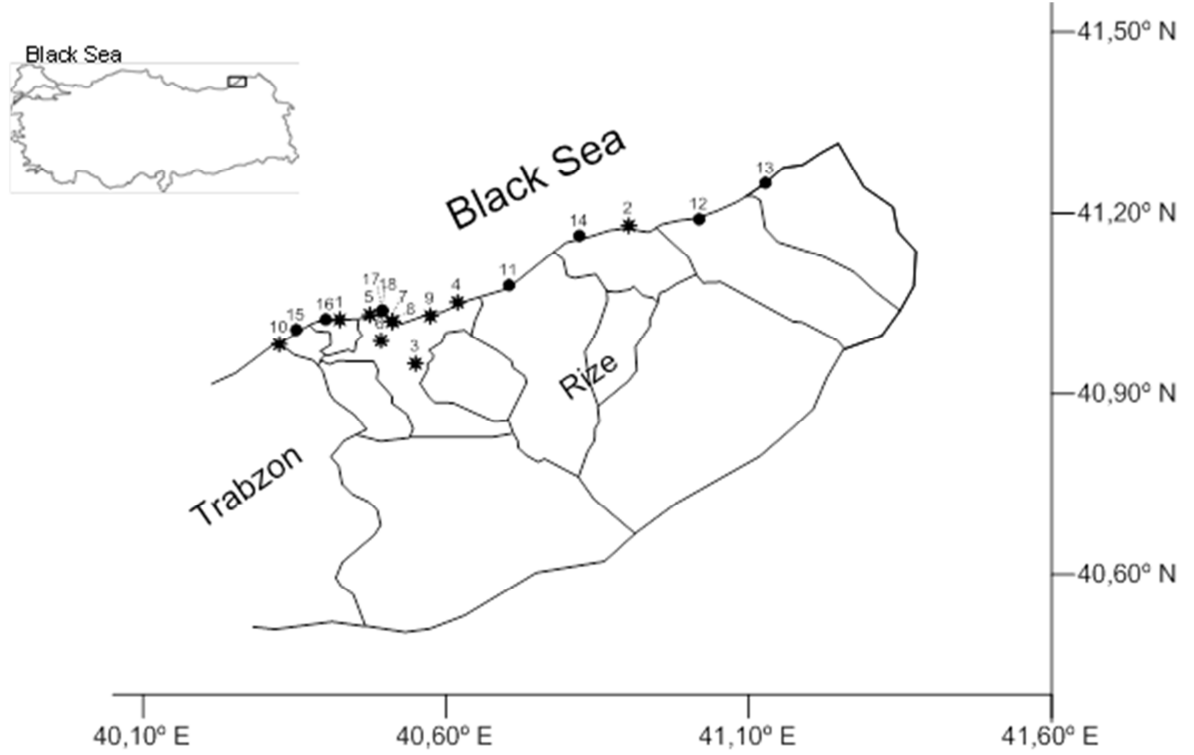
2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Çay Varyeteleri

Bu araştırmada toplam 19 çay varyetesi materyal olarak kullanılmıştır. Bitkisel materyallerin 11'i Rize Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsünden 8'i ise Rize iline bağlı ilçelerden alınmıştır. Çalışmada kullanılan çay çeşitleri Tablo 2'de, ilgili harita bilgisi de şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan çay varyeteleri ile alındıkları genetik kaynaklar.

No	Çeşit ve Varyete İsmi	Kaynak
1 (D7)	Derepazarı 7	Rize-RÇ ve BKAE
2 (P20)	Pazar 20	Rize-RÇ ve BKAE
3 (M)	Muradiye	Rize-RÇ ve BKAE
4 (G)	Gündoğdu	Rize-RÇ ve BKAE
5 (F3)	Fener 3	Rize-RÇ ve BKAE
6 (T10)	Tuğlalı 10	Rize-RÇ ve BKAE
7 (E1)	Enstitü 1	Rize-RÇ ve BKAE
8 (E2)	Enstitü 2	Rize-RÇ ve BKAE
9 (HB)	Hamzabey	Rize-RÇ ve BKAE
10 (H)	Hayrat	Trabzon-RÇ ve BKAE
11 (Ç)	Çayeli	Rize-Çayeli
12 (A)	Ardeşen	Rize-Ardeşen
13 (Fı)	Fındıklı	Rize-Fındıklı
14 (P)	Pazar	Rize-Pazar
15 (I)	İyidere	Rize-İyidere
16 (D)	Derepazarı	Rize-Derepazarı
17 (U)	Üniversite	Rize-Merkez 1
18 (U2)	Üniversite 2	Rize-Merkez 2
19(OLİ)	<i>Camelia olifera</i>	Rize-RÇ ve BKAE



Şekil 2. Çay varyetelerinin örnekleme noktaları

2. 2. METOD

2. 2.1. Yaprak Örneklerinin Toplanması

Rize Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü bahçesinde ve Rize ili ilçelerindeki çay bahçelerinden alınan toplam 19 örnek, çay bitkisinin genç sürgün yapraklarından alınıp buz poşetlerinde buzda muhafaza edilerek Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'na getirilmiştir. Bu örnekler önce saf suda daha sonra da % 70'lik alkolde yıkandıktan sonra kurutulup sıvı azot (-196⁰C) ile muamele edilmiştir. Aynı gün içerisinde DNA izolasyonu yapılmıştır.

2.2.2. Yapraklardan DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu Favor Prep Plant Genomic DNA Ekstraksiyon Mini Kit ile yapılmıştır. Bu yöntemde 50 mg (max.100 mg) taze yada dondurulmuş bitki veya 5mg(max.100mg) kurutulmuş örnek hazırlanır. Sıvı azot ile örnek toz haline getirilir ve steril 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır. 400 µl FAPG 1 Buffer ve 8 µl RNase A(50mg/ml) eklenir ve tüpler vortekslenir. 65 ⁰C'de 10 dakika bekletilir. İnkübasyon esnasında 5 dakikada bir ters düz edilir (Bu esnada örnek başına 200 µl olacak şekilde Elution Buffer 65⁰C'de inkübasyona bırakılır). Her bir ependorfa 130 µl FAPG 2 Buffer

eklenir, tüpler vortekslenir ve 5 dk buzda inkübe edilir. Filter Column'a 2 ml'lik Collection Tube yerleştirilir. Buzda inkübasyona bıraktığımız örnekler Filter Column'a alınır. 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası filter column atılır. Süpernatant (~400 µl) yeni bir ependorfa aktarılır. Yeni ependorfa aktardığımız süpernatantın üzerine 1,5 katı kadar FAPG 3 Buffer eklenir (örneğin 500 µl lizata 750 µl FAPG 3 Buffer) ve lizat 5 saniye boyunca vortekslenir. FAPG mini column'u 2ml lik collection tube'ye yerleştirilir. 750 µl'lik karışımı çökelmede dahil FAPG Column'a aktarılır. 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında tüpte kalan sıvı dökülür. Column'a 500 µl W1 Buffer ardından 750 µl Wash Buffer eklenir. 13000 rpm'de 30 sn santrifüjlenir. Santrifüj sonrası tüpte kalan sıvı dökülür ve FAPG Column Collection Tube geri koyulur. Tekrar 13000 rpm'de 3 dk santrifüj yapılır. FAPG Column'u temiz bir 1,5 ml'lik steril ependorf tüpe aktarılır. Önceden inkübasyona bırakılmış elution buffer'dan 50 µl column matriksinin merkezine eklenir ve elution buffer matriks tarafından emilsin diye 3 dk bekletilir. 13000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak saf DNA elde edilir.

2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

PCR' a dayalı DNA moleküler markır tekniklerinde konsantrasyonun belirlenmesi önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada çay genotiplerinin konsantrasyonunun belirlenmesi için Nano Drop (Thermo Sci.) cihazı kullanılmıştır. Her bir örnek için 1 µl izole edilmiş DNA örneklerinden alınarak konsantrasyonları belirlenmiştir. Hesaplama; Belirlenen konsantrasyon (ng/µl) × a = 1 ng/µl × Son hacim (µl) olarak belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlar 1 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış ve PCR' analizleri için her bir DNA örneği 20 µl kullanılacak şekilde son hacim 800 µl'de hesaplanmıştır. Böylece tüm örnekler PCR' a hazır hale getirilmiştir.

2.2. 4. ISSR PCR Uygulamaları

ISSR reaksiyonunda kullanılan 21 primere ait veriler Tablo 3'de, yapılan PCR çalışmasına ait bilgiler Tablo 4'de verilmiştir. PCR reaksiyonları 50 µl son hacimde yapılmıştır. ISSR analizlerinde kullanılan PCR döngü şartları Tablo 5'de verilmiştir. PCR uygulamaları Bio-Rad T100™ cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. ISSR PCR'larında kullanılan ve Tm (⁰C) dereceleri

No	Primer (5'-3')	Tm (⁰ C)
1	(AG) ₈ C	48
2	(TC) ₈ G	50
3	(CT) ₈ GG	52
4	(AC) ₈ T	45
5	(AC) ₈ G	48
6	(AC) ₈ C	51
7	(AC) ₈ TG	50
8	(AC) ₈ CG	52
9	G_(AC) ₈	48
10	(GT) ₈ C	48
11	(GT) ₈ T	48
12	(CTC) ₆	58.1
13	(GAA) ₆	44
14	(CAG) ₆	58
15	(CAG) ₆ GT	59
16	(CAA) ₆ G	48
17	(CAA) ₆	44
18	(GATA) ₄	35
19	(CTGA) ₄	45
20	(GACA) ₄ T	47
21	(CTGA) ₄ G	50

Tablo 4. ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Konsantrasyon	Miktar (µl)
Buffer (5X)	1X	10
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	4
dNTP (4 mM)	200 µM	2.5
ISSR Primer	100 pmol	1.5
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)	1 U	0.3
DNA	(1 ng/ µl)	15

Tablo 5 Çayda ISSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	2	40
Primerin DNA'ya bağlanma safhası (annealing)	40–60 (primere göre değişmekte)	1	40
Uzama safhası (extension)	72	2	40
Son uzama safhası (final extension)	72	7	1

2. 2.4.1. PCR Uygulamalarının Tekrarlanabilirliği ve Agaroz jel Elektroforezi

PCR koşullarının tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla, örneklere ait çoğaltma işlemi birbirinden bağımsız olarak iki kez tekrar edilmiştir. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonu engellemek için her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla, her bir primerin yürütülmesinde, 1 kb'lık DNA ladder kullanılmıştır.

PCR ürünlerinin elektroforezi, 8 µl PCR ürünü kullanılarak agaroz jel ortamında yürütülmüştür. Yirmi hücreli jel tepsi kullanılarak, %1,4'lük agarozda, 1X TAE (Tris base, glacial asetik asit, EDTA) tamponunda 55 dk süre ile 96 voltta yürütülen örnekler,

0,25 µ g/ml etidium bromid ile boyanmış ve UV ışığı altında UVP Bioimaging System (CA, USA) ile görüntülenmiştir.

2. 2.4.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezi sonuçları görüntüledikten sonra elde edilen fotoğraflarda yer alan amplifikasyon bantlarının okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alınmıştır. Bantların okunması, var olma ve olmama durumuna göre “1” veya “0” şeklinde değerlendirilmiş ve benzerlik indeksi oluşturulmuştur. Bu amaçla, Sokal ve Sneath (1963) tarafından geliştirilen ve aşağıda verilen “Benzerlik İndeksi (Bİ)” formülü ile iki birey arasındaki benzerlik karşılaştırılmalarında kullanılmıştır. $Bİ = a/(a+b)$ şeklinde hesaplanmıştır.

a : iki çay klonunda da bulunan homolog bant sayısı

b : iki çay klonunda da bulunan homolog olmayan bant sayısı

Klonlar arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendogram verileriye, Rohlf (1990) tarafından geliştirilen NTSYS-Pc(Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System, Version 2.02i) programı kullanılarak “UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Cluster’analizi ile belirlenmiştir.

2. 2.5. SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region Marker) Markır Geliştirme

ISSR PCR sonuçlarına göre G(AC)₈ primeri ile elde edilen amplifikasyon ürünü kullanılarak SCAR markır geliştirilmesi denendi. Bu amaçla, bu primer ile çoğaltılan PCR ürünleri pGEM-T vektörüne 2.2.5.2 nolu başlıktaki basamaklar takip edilerek klonlandı ve pozitif klonlardan bir tamesi seçilerek baz dizin analizine gönderildi (Macrogen, hollanda). Sekans sonuçları karşılaştırıldığında (Clustal W) Tablo 6’daki primerler dizayn edilerek SCAR markır olarak kullanılabilirliği denenmiştir. PCR koşullarına ait bilgiler Tablo 7’de, PCR reaksiyonu bileşenlerine ait bilgiler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 6. SCAR Primerleri ve T_m(⁰C) Dereceleri

No	Primer	Primer nükleotit sırası (5'-3')	T _m (⁰ C)
1	SCAR9F_6A_1	GAC ACA CAC ACA CAC ACC CCA	61,3
2	SCAR9F_6TCTC_2	GACACACACACACACACCCCATCTC	67,1
3	SCAR9F_6G_3	ATC TTT TTA TTA CTC AAG	40,5
4	SCAR9F_7G	GAC ACA CAC ACA CAC ACC CCG	63,3
	SCAR9R	TTT TCT AAA TAA CTT AAA ATC	43,7

Tablo 7. SCAR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Konsantrasyon	Miktar (µl)
Buffer (5X)	1X	10
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	4
dNTP (4 mM)	200 µM	2.5
ISSR Primer	100 pmol	1.5
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)	1 U	0.3
DNA	(1 ng/ µl)	15

Tablo 8. Çayda SCAR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

	Sıcaklık (⁰ C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	2	34
Primerin DNA'ya bağlanma safhası (annealing)	40-60 (primere göre değişmekte)	1	34
Uzama safhası (extension)	72	2	34
Son uzama safhası (final extension)	72	7	1

2.2.5.1. Polimorfik Bantların Klonlaması

ISSR analizi esnasında çalışılan çay örneklerini birbirinden ayırmasını sağlayabilecek polimorfik bantları SCAR markır olarak kullanılması amacıyla klonlanmıştır. Bu nedenle aşağıdaki yöntem izlendi.

PCR sonucunda elde edilen polimorfik ISSR bantları, PCR ürünlerinin aktarılmasına uygun olan T/A klonlama vektörü pGEM-T/Easy (Promega, Medison, USA) vektörü kullanıldı. İlgili PCR ürünü, öncelikli olarak PCR ürünü saflaştırma kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean Up System, Promega Co., Medison, USA) üretici firmanın öngördüğü şekilde kullanılarak saflaştırılmıştır. Daha sonra 10 µl son hacimde olacak şekilde 3 µl saflaştırılmış PCR ürünü, 1 µl (50 ng) pGEM-T/Easy vektör, 2X Rapid Ligation Tamponu ve 1 µl T4 DNA ligaz kullanılarak oluşturulan reaksiyon, 16°C'de gece boyu bekletilerek tamamlandı.

Rekombinant vektörün konak hücreye aktarılmasından önce, konak hücre soğuk CaCl₂ yöntemiyle alıcı (kompetan) duruma getirildi. Bu hücrelerin hazırlanabilmesi için bir gece önceden, cam tüpler içine 3 ml LB sıvı besi yerine *E. coli* DH5α suşu ekilerek 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Büyüme sonunda 50 ml LB besi yeri içerisine 500 µl olacak şekilde gece kültüründen sulandırıldı ve OD₆₀₀ değerinin 0,2–0,4 arasında olana kadar 37°C'de büyütüldü. İstenen değere ulaşan kültür iki santrifüj falkon tüpüne bölündü ve buz üzerinde 10-15 dk bekletildi. Buz üzerinde bekletilen hücreler 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pellet üzerine 7,5 ml soğuk Frozen storage buffer (100 mM KCl, %10 Gliserol, 50 mM CaCl₂.2H₂O, 10 mM KCO₂CH₃) eklenilerek hafifçe çözülmesi sağlandı ve 2 saat buz üzerinde bekletildi. Ardından tekrar 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 2 ml soğuk Frozen storage buffer eklenerek çözüldü ve steril ependorflara 100 µl olacak şekilde dağıtılarak 80°C'de muhafaza edildi.

Ligasyon ürünleri daha sonra Maniatis ve ark. (1982)'ne göre alıcı özellik kazandırılmış *E. coli* DH5α konak hücrelerine aktarıldı. Rekombinant plazmitlerin alıcı hücrelere aktarılmasında aşağıdaki metot uygulandı:

- 200 µl alıcı hücre içeren tüpe 3 µl ligasyon ürünü eklendi (içerisine ligasyon ürünü konulmayan alıcı hücre tüpü kontrol amaçlı olarak kullanıldı),
- Oluşan karışım 30 dakika buzda bekletildi,
- Daha sonra tüpler, 42°C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakıldı,

- Isı şokundan sonra tekrar buza konulan tüplerin içerisine 200 µl sıvı LB eklendi ve 37°C’de 2 saat inkübe edildi,

- Daha önce hazırlanmış olan LB Amp petrilere (50 µg/ml ampisilin içeren, üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-Gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş petrilere) yayılarak 37 °C’de 1 gece inkübe edildi. Büyüme sonucunda içerisine plazmit alan hücrelerin mavi/beyaz koloni oluşturmamasından yararlanılarak klonlar seçildi.

Seçilen beyaz koloniler ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekilip 37 °C’ de 16 saat inkübe edildikten sonra 13000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. (Geri kalan hücrelerde santrifüj edildikten sonra pelletler -20’ye kaldırıldı). Süpernatant atılıp pellet üzerine Solüsyon-I (50 mM Glukoz, 25 mM Tris HCl pH 8, 1ml için 4 mg lizozim)’den 200 µl eklendi ve vortekslendi. Bu işlemde sonra 400 µl solüsyon-II (% 1 SDS ve 0,1 M NaOH) eklendi tortular kaybolana kadar alt üst edilerek 5 dk buzda bekletildi. Süre bitiminden sonra üzerine 300 µl amonyum asetat (7,5 M, NH₄AC) eklendi ve 11-13 kez alt üst edilerek tekrar 10 dk buzda bekletildi. 700 µl izopropanol eklenmiş ependorflara süpernatant alındı ve alt üst edildi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 13000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökdükten sonra pellet üzerine 500 µl soğuk % 70’lik EtOH eklendi ve alt üst edildi tekrar 13000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant dökdü. Pellet 30 dk 37 °C’ de alkolün uzaklaştırılması için bekletilerek kurutuldu. Bu aşamadan sonra pellet üzerine 50–100 µl TE de çözüldü ve içerdikleri RNA’ların parçalanması için 1 µl RNaz/100 µl ilave edildi ve 37 °C’de 30 dk bekletildikten sonra -20 de muhafaza edildi.

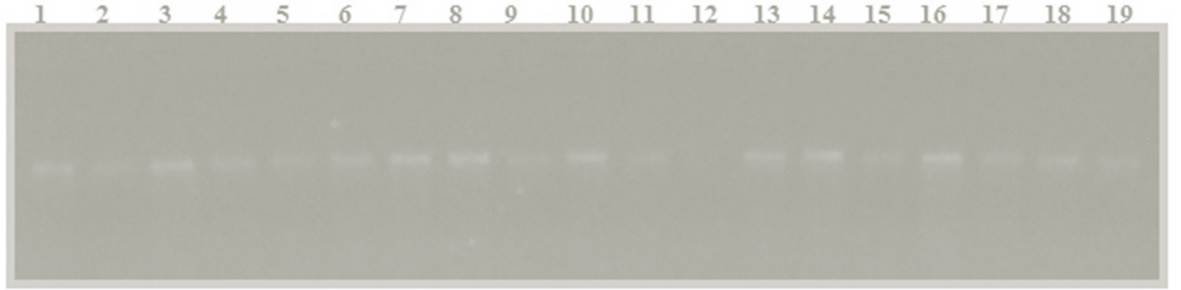
İzole edilen bu plazmitlerin istenilen DNA parçasını ihtiva edip etmediğini anlamak amacıyla ISSR PCR yapıldı. PCR sonrasında %1’lik agaroz jelde PCR ürünüyle yürütülerek plazmidin istenilen DNA fragmentini taşıyıp taşımadığı kontrol edildi.

Doğru klonlar tespit edildikten sonra -20°C ‘ye kaldırılmış pelletler GF-1 Plazmid DNA Ekstraksiyon kit’ i ile izole edildi. Belirlenen klonların taşıdıkları ISSR bölgelerinin DNA sıra analizleri T7 ve SP6 universal primerleri ile Macrogen Inc. (Hollanda) firması tarafından gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1 DNA Analizleri

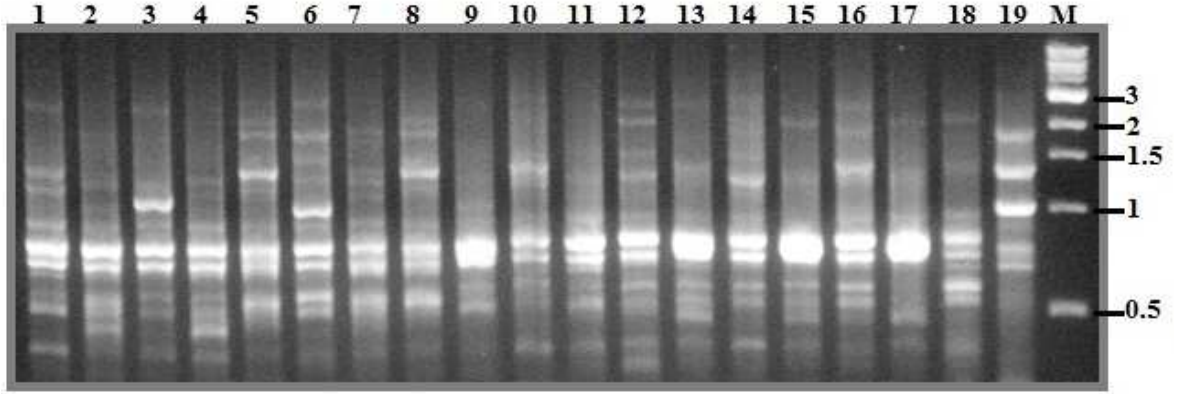
Çalışmada kullanılan örneklere ait genomik DNA'lar (gDNA), Favor Prep Plant Genomic DNA Ekstraktion Mini Kit ile firmanın öngördüğü şekilde izole edilmiştir. gDNA'lar % 0,7'lik agaroz jel elektroforezine tabii tutularak sonrasında jel fotoğrafı UVP Bioimaging System (CA USA) ile görüntülenmiştir (Şekil 3). Elde edilen gDNA'ların saflık değerleri ve konsantrasyonları NanoDrop (Thermo Sci.) belirlenmiş ve kullanıma kadar -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.



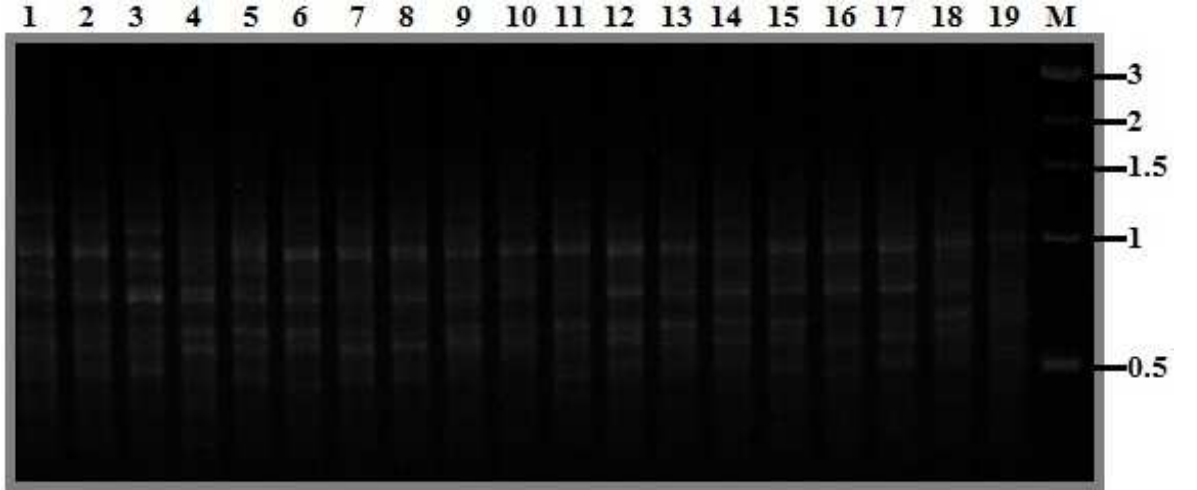
Şekil 3. Favor Prep Plant Genomic DNA Ekstraktion Mini Kit Genomik DNA'ların %0,7 agaroz jel elektroforezi fotoğrafı. . Sırası ile genotiplerin isim listesi,1. Der pazarı-7, 2. Pazar-20, 3.Muradiye, 4. Gündoğdu, 5. Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9. Hamza Bey, 10.Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Der pazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*

3.2. ISSR Analizleri

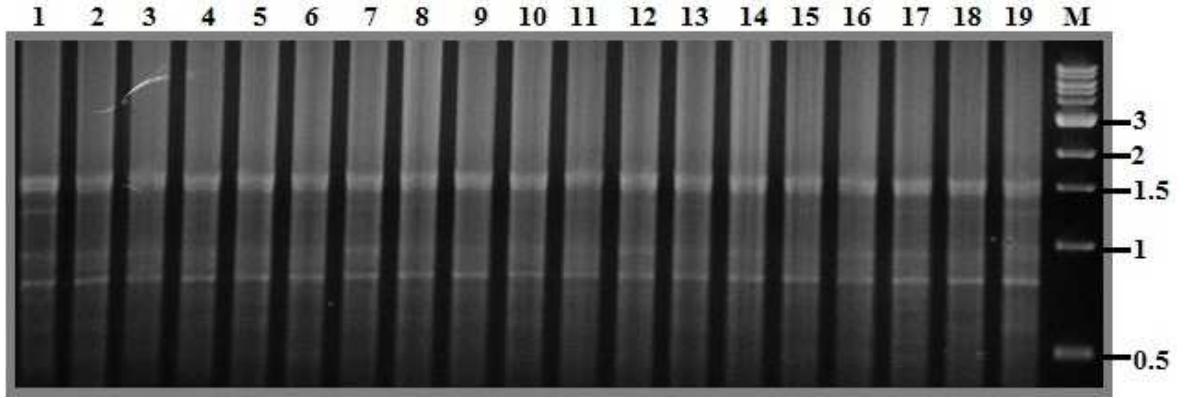
ISSR tekniği 19 farklı çay genotipinde karakterizasyonun ve genetik ilişkilerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu teknikte 21 ISSR primeri denenmiş ve 15 ISSR primeri çalışma boyunca kullanılmıştır. İlgili ISSR primerlerine ait veriler tablo 5'de verilmiştir. PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri % 1,4'lük agaroz jelde DNA ladder (1 kb DNA Ladder, New England Biolab, USA) kullanılarak yürütülerek görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 4 – Şekil 18'de verilmiştir.



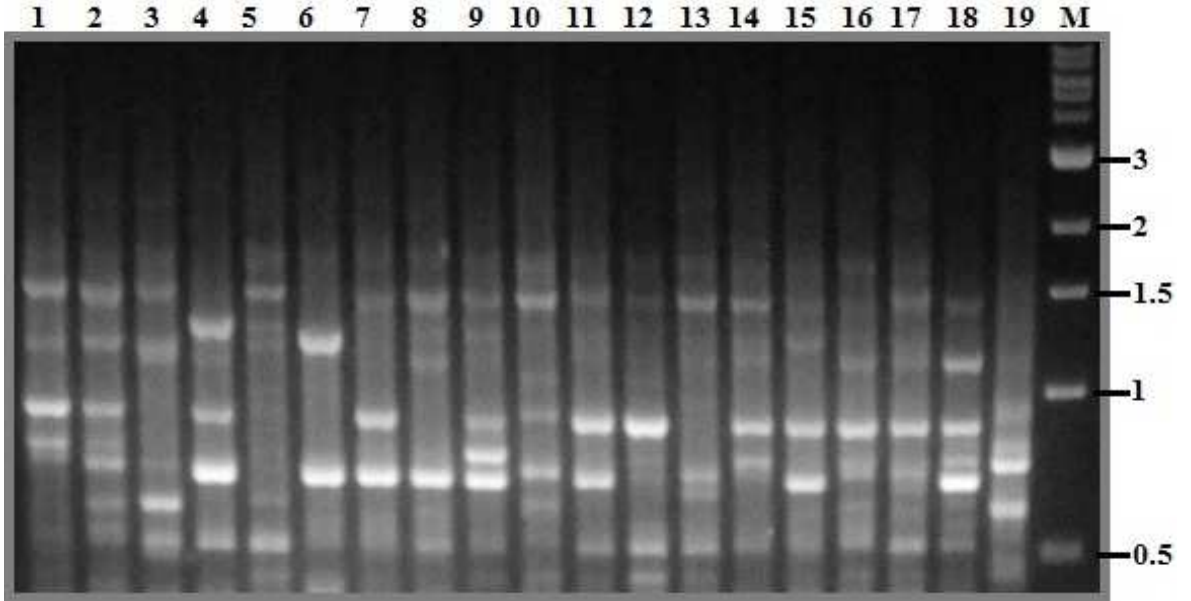
Şekil 4. (CT)₈GG ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi,1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20, 3.Muradiye, 4. Gündoğdu, 5. Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9. Hamza Bey, 10.Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



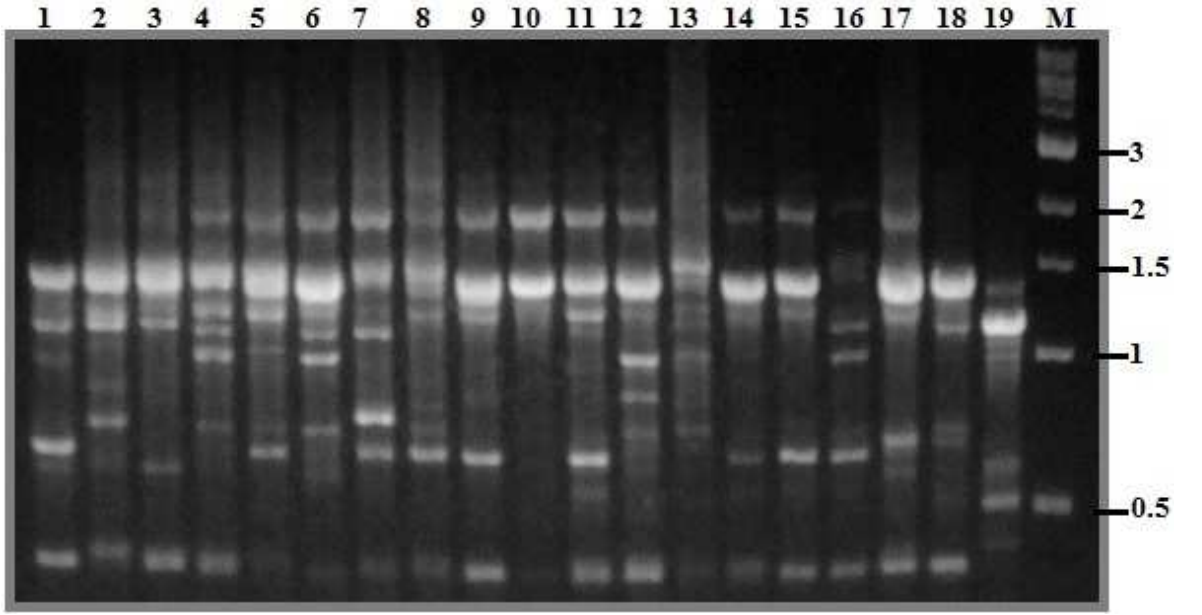
Şekil 5. (AC)₈G ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



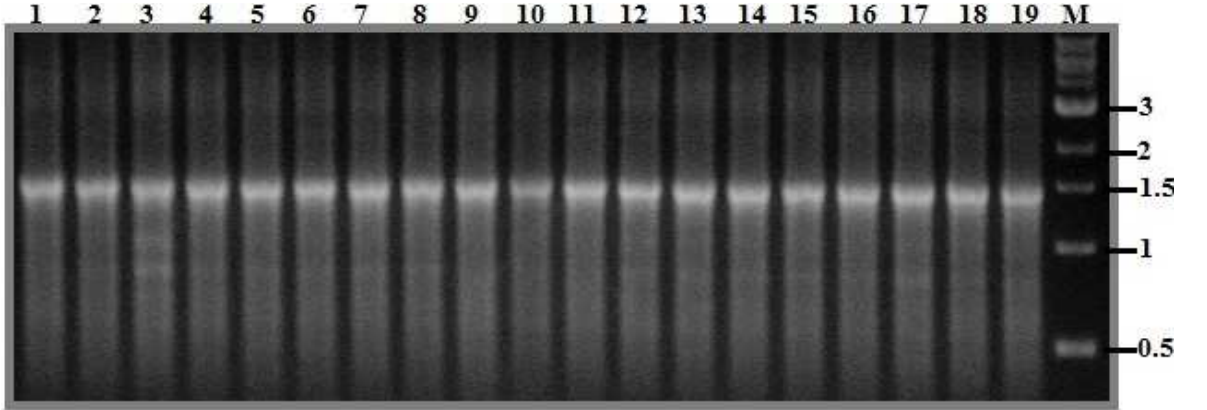
Şekil 6. (AC)₈C ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



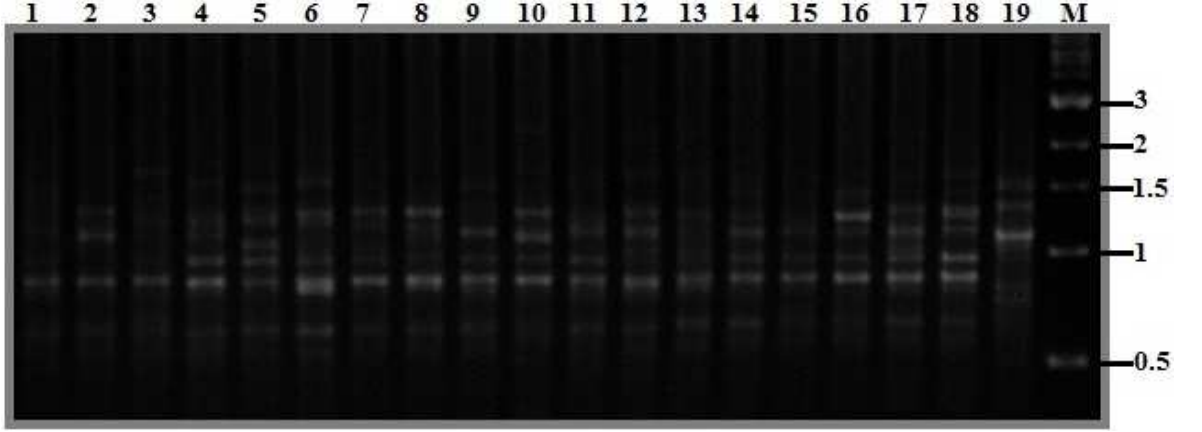
Şekil 7. (AC)₈TG ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



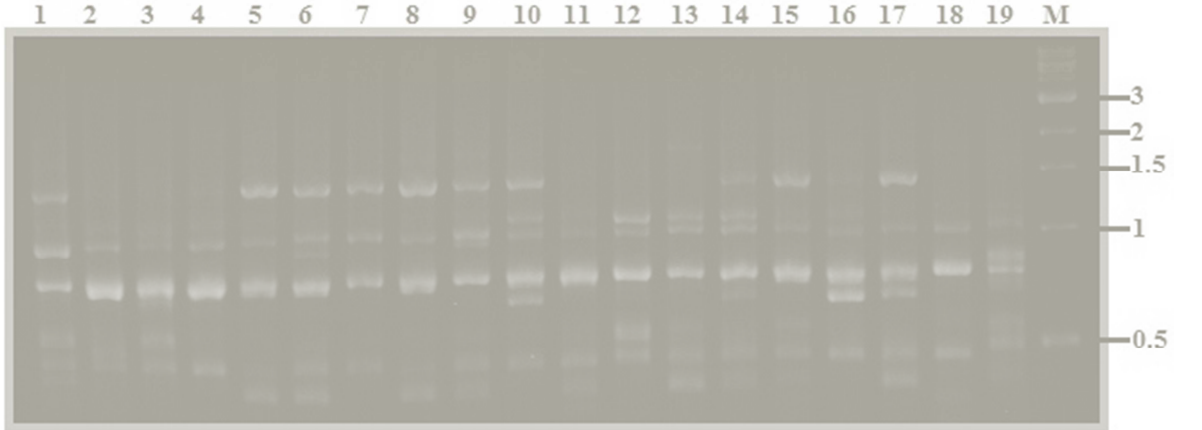
Şekil 8. (AC)₈CG ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



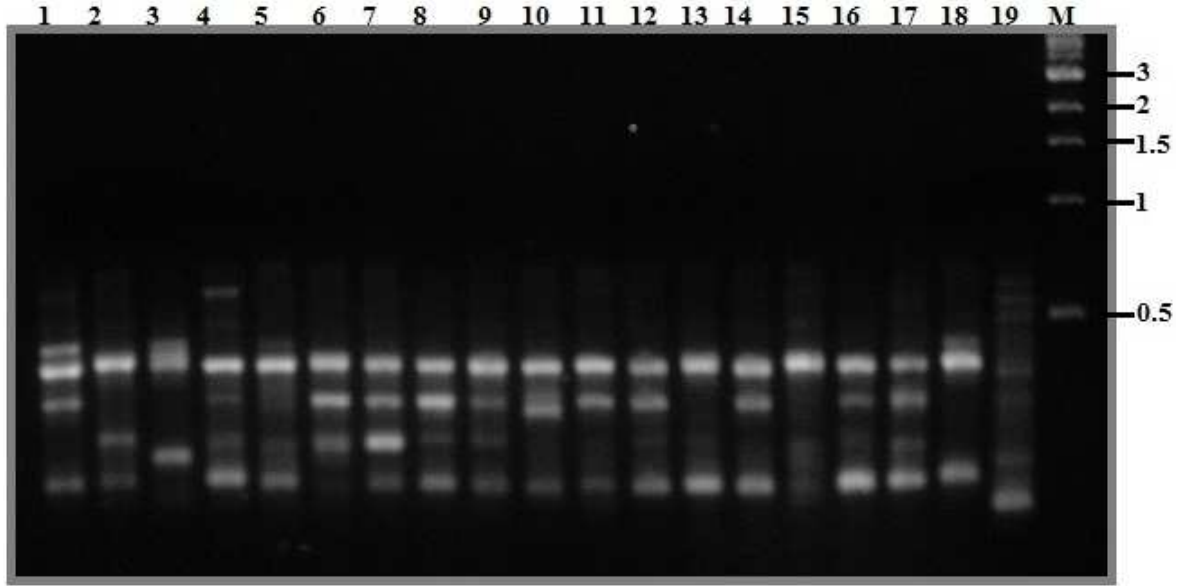
Şekil 9. G_(AC)₈ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin % 1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



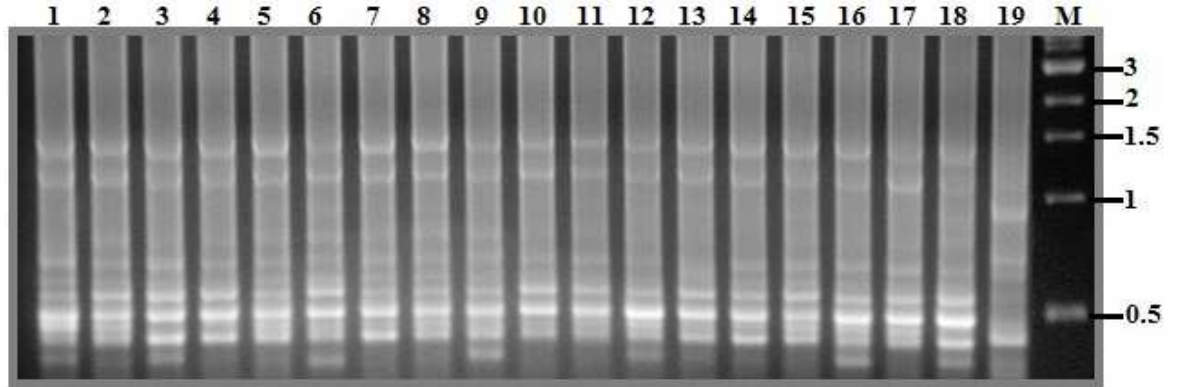
Şekil 10. (GT)₈C ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepaşarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepaşarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



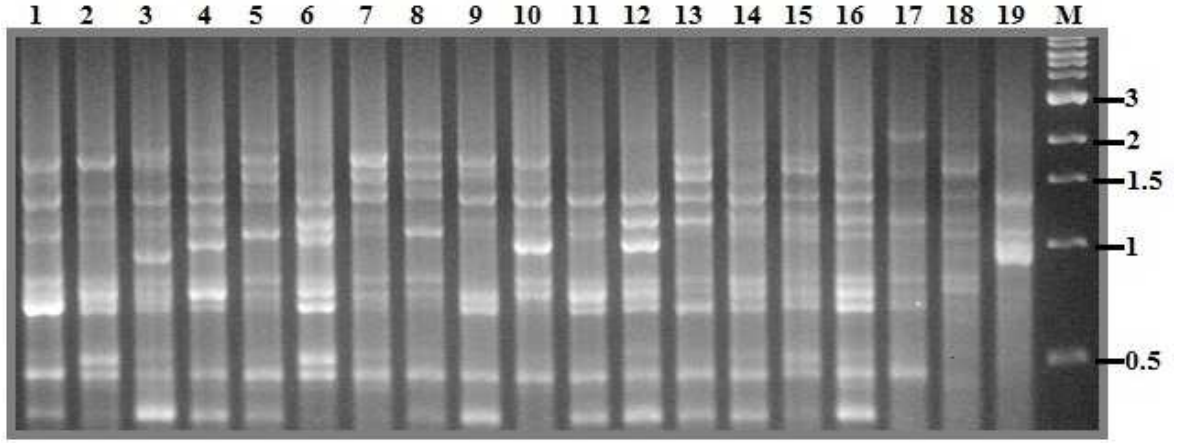
Şekil 11. (CTC)₆ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepaşarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepaşarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



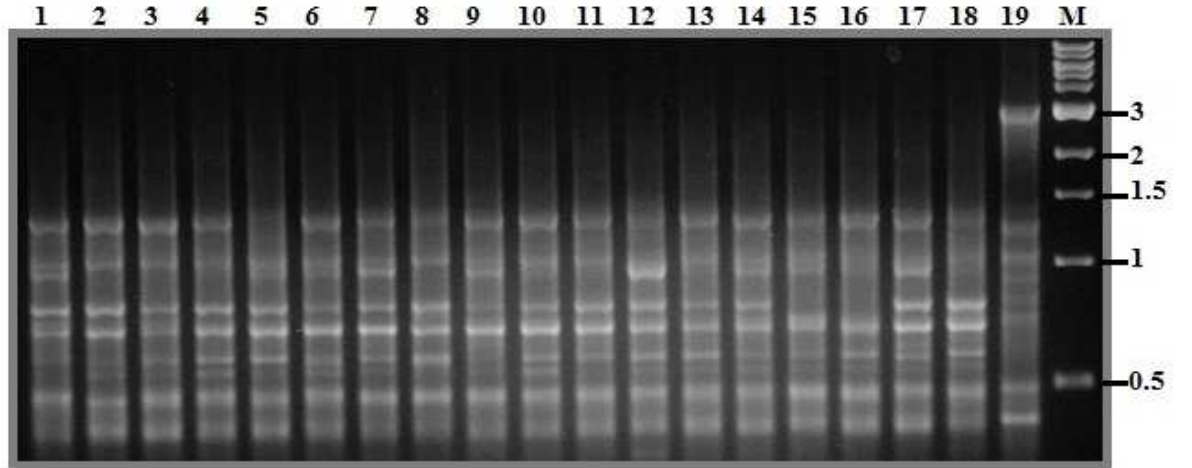
Şekil 12. (GAA)₆ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



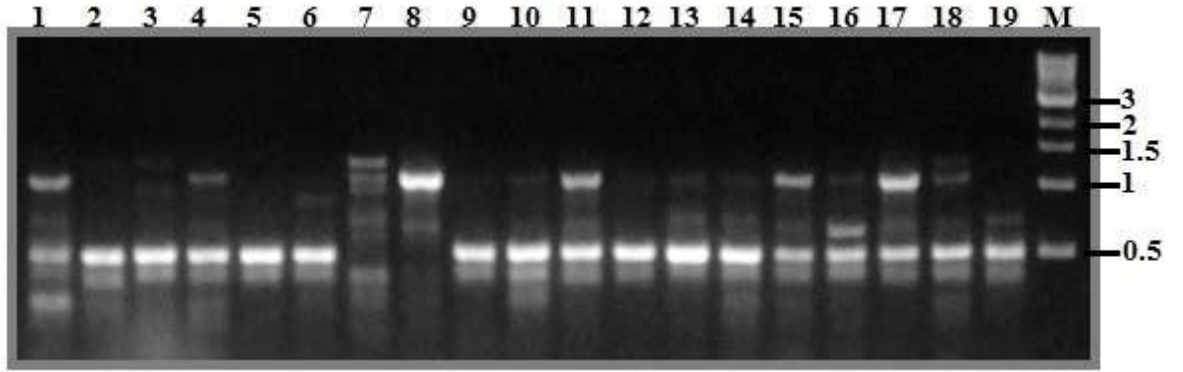
Şekil 13. (CAG)₆ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



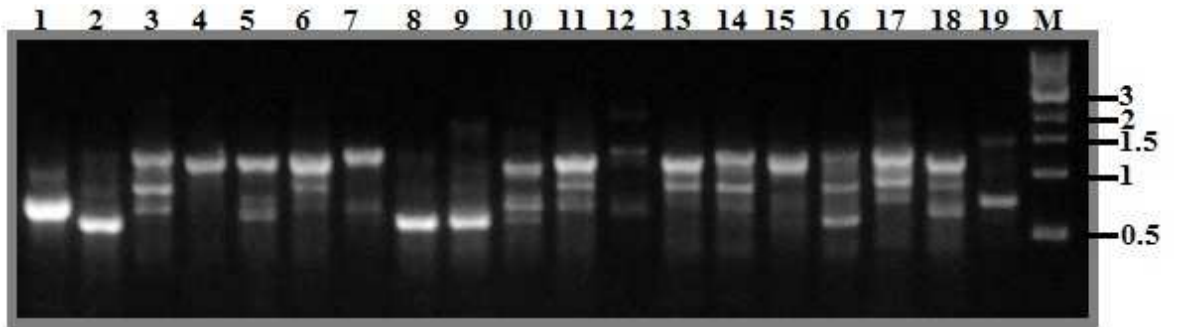
Şekil 14. (CAG)₆GT ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Der pazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Der pazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



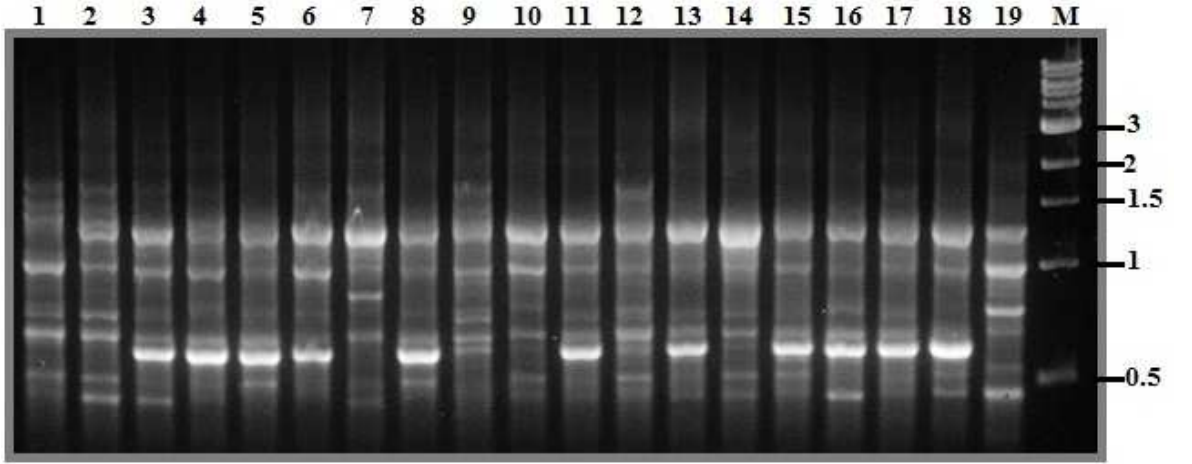
Şekil 15. (CAA)₆G ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Der pazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Der pazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



Şekil 16. (GATA)₄ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



Şekil 17. (CTGA)₄ ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)



Şekil 18. (GACA)₄T ISSR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü.. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derapazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derapazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*, M. Marker(1 kb)

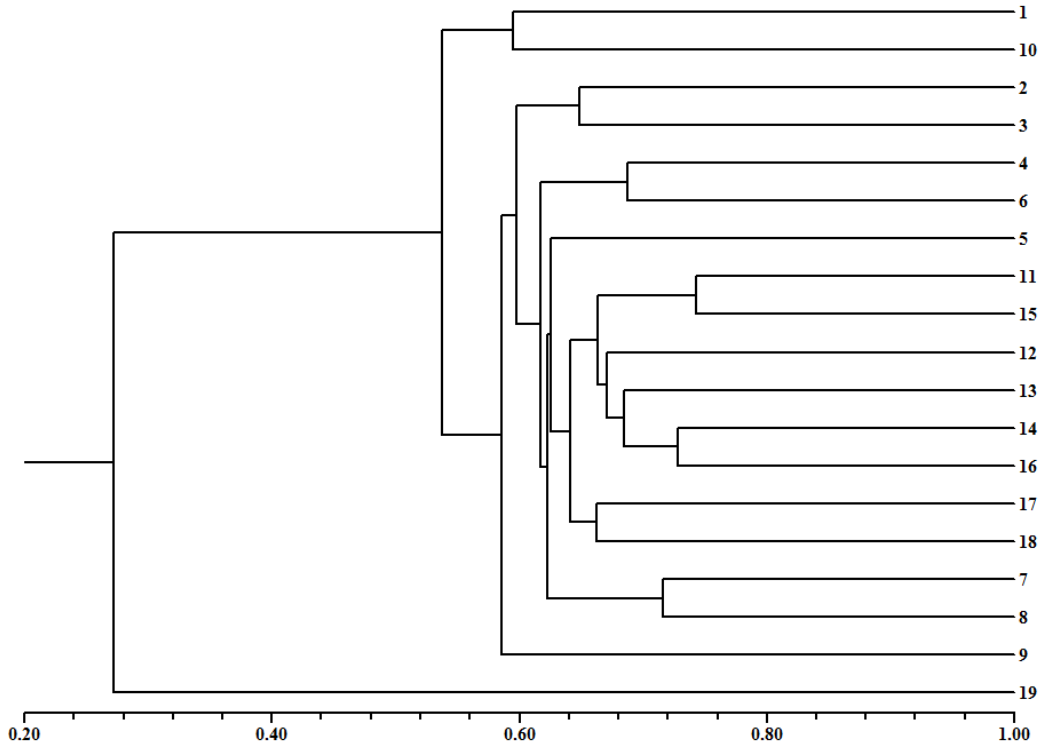
3. 2. 1. Benzerlik İndeksi ve Genetik İlişki Dendogramı

Benzerlik indeksi formülüne dayanarak klonlar arası benzerlik oranları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 9. Çay varyetelerine ait benzerlik indeksi 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1	0,518	0,549	0,458	0,514	0,456	0,519	0,491	0,536	0,595	0,550	0,535	0,527	0,553	0,517	0,549	0,487	0,520	0,230
2		1	0,649	0,619	0,634	0,636	0,616	0,578	0,557	0,574	0,606	0,662	0,577	0,595	0,554	0,620	0,616	0,582	0,279
3			1	0,561	0,563	0,585	0,551	0,545	0,533	0,588	0,594	0,645	0,583	0,602	0,572	0,589	0,647	0,611	0,313
4				1	0,610	0,687	0,632	0,610	0,565	0,551	0,680	0,610	0,614	0,572	0,642	0,613	0,607	0,605	0,242
5					1	0,624	0,589	0,639	0,555	0,576	0,683	0,615	0,630	0,615	0,618	0,613	0,613	0,613	0,299
6						1	0,616	0,572	0,632	0,513	0,636	0,636	0,638	0,638	0,598	0,624	0,632	0,568	0,261
7							1	0,716	0,580	0,547	0,651	0,683	0,579	0,642	0,610	0,606	0,622	0,559	0,237
8								1	0,608	0,523	0,671	0,608	0,647	0,662	0,651	0,622	0,633	0,536	0,224
9									1	0,541	0,652	0,597	0,576	0,659	0,571	0,593	0,610	0,501	0,196
10										1	0,601	0,584	0,544	0,613	0,511	0,567	0,566	0,538	0,251
11											1	0,682	0,662	0,697	0,743	0,685	0,670	0,704	0,310
12												1	0,648	0,706	0,642	0,658	0,650	0,593	0,252
13													1	0,704	0,677	0,665	0,599	0,639	0,296
14														1	0,618	0,728	0,699	0,621	0,285
15															1	0,645	0,621	0,597	0,283
16																1	0,666	0,638	0,297
17																	1	0,662	0,305
18																		1	0,344
19																			1

Yukarıda elde edilmiş olan benzerlik indeksi'ne göre klonlar arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendrogram verileriyle, Rohlf (1988) tarafından geliştirilen NTSYS-Pc(Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System, Version 2.0) programı kullanılarak "UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) Cluster" analizi ile belirlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Çay varyeteleri arasında ki benzerlik indeksine dayanılarak çizilen dendrogram. 1. Derepaarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepaarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*

ISSR analizleri sonucunda elde edilen dendrograma bakıldığında çay genotiplerinin iki ana dala ayrıldığını görmekteyiz. Bu dalların birincisinde birbirine %59 benzerlikle Derepaarı7 ve Hayrat genotiplerinin yer aldığı ve diğer genotiplere %54 oranında benzediği görülmektedir.

İkinci ana dalda Hamzabey genotipinin %58 benzerlikle diğer 15 genotipten ayrıldığını görmekteyiz. Kalan 15 genotipin dendrogram içerisinde yerleşimi şu şekildedir. Pazar20 ve Muradiye genotipleri birbirlerine %65 benzemekte kalan 13 genotipe %60 oranında benzemektedir. Yine 13 genotipin içerisinde Gündoğdu ve Tuğlalı genotipleri

birbirlerine %68,5 oranında benzemekte ve kalan 11 genotip ile %61,5 oranında benzerlik göstermektedir.%72 oranında birbirine benzeyen Enstitü1 ve Enstitü2 genotipleri %62 benzerlik ile diğer klonlardan ayrılmış yine % 62,5 benzerlikle Fener3 genotipi kalan 8 genotipten ayrılmıştır. Kalan genotipler içerisinde birbirine %65 benzerlik gösteren Üniversite ve Üniversite2 kodlu genotipler kalan genotiplere %64 benzerlikle ayrılmıştır. Dendogramın %74 ile en yüksek benzerlik indeksine sahip olan Çayeli ve İyidere genotipleri kalan 4 genotipten %66 benzerlikle ayrılmıştır. Pazar ve Derepazarı genotipleri birbirlerine %72,5 oranında benzemekte Fındıklı genotipi ile %68 benzerliği bulunmaktadır. Fındıklı, Pazar ve Derepazarı genotipleri Ardeşen kodlu genotipe %67 oranında benzemektedir.

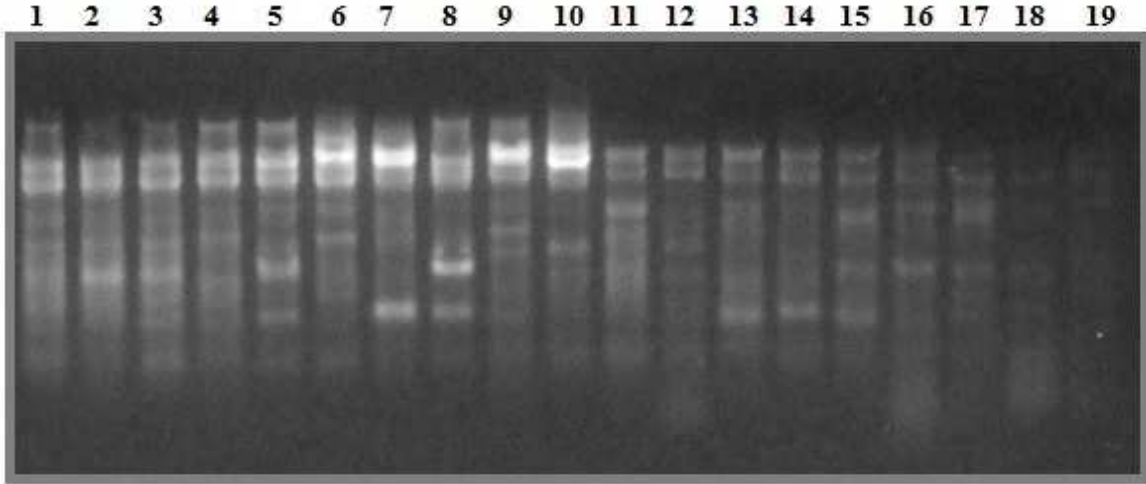
Analiz esnasında dış grup olarak kullanılan *Camellia olifera*'nın ülkemizde yetişmekte olan çay genotiplerine %26,5 oranında benzediği görülmektedir.

3. 3 SCAR Analizleri

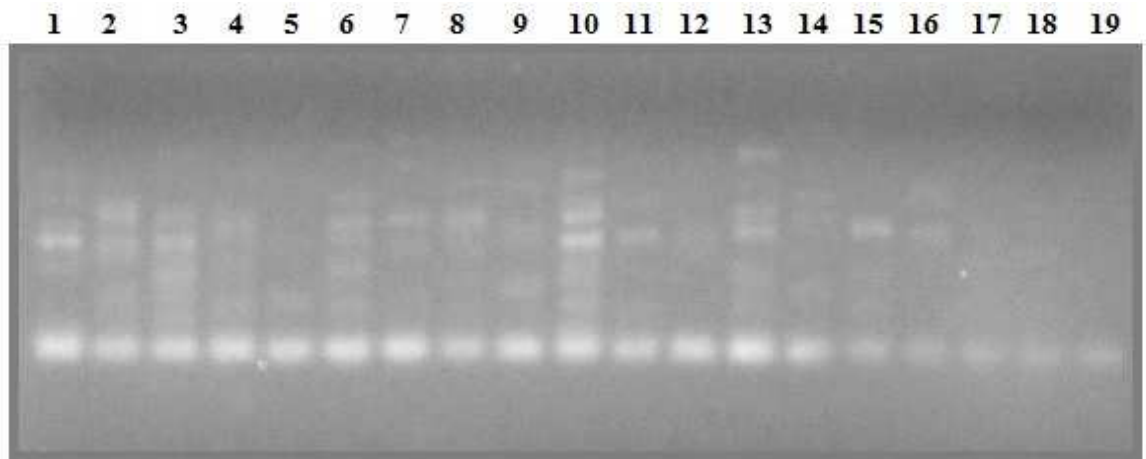
3. 3. 1. ISSR G(AC)₈ Primeri ile Çoğaltılan Fragmentin Baz Analizinin Belirlenmesi

ISSR-G(AC)₈ primer ile Tuğlalı 10 ve Enstitü 1 adlı çay örneklerinden çoğaltılan PCR ürünlerinin pGEM-T easy vektörüne klonlanması başarılmıştır. İki çay kültüründen elde edilen sıranın karşılaştırılmış hali Şekil 20'deki gibidir.

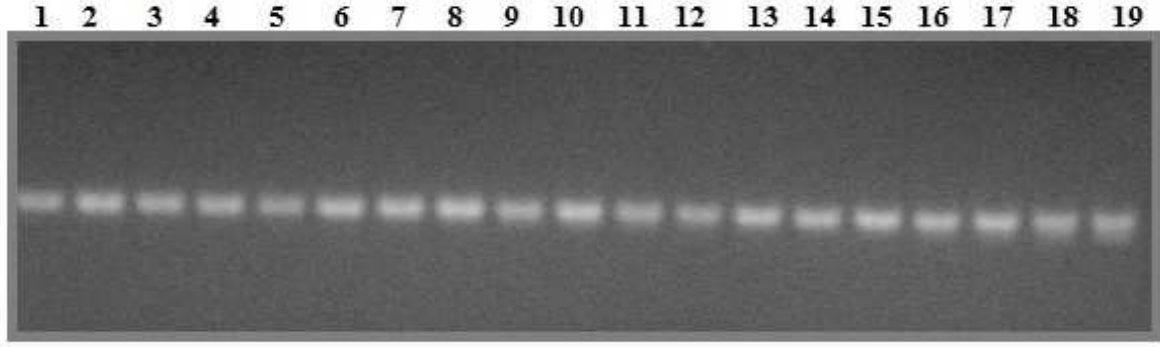
Şekil 20’de verilen nükleodit dizisine ilişkin dördü forward biri reverse primer olarak dizaynı yapılmış ve PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Geliştirilen Primerlere ait jel görüntüleri Şekil 20-23’ de verilmiştir.



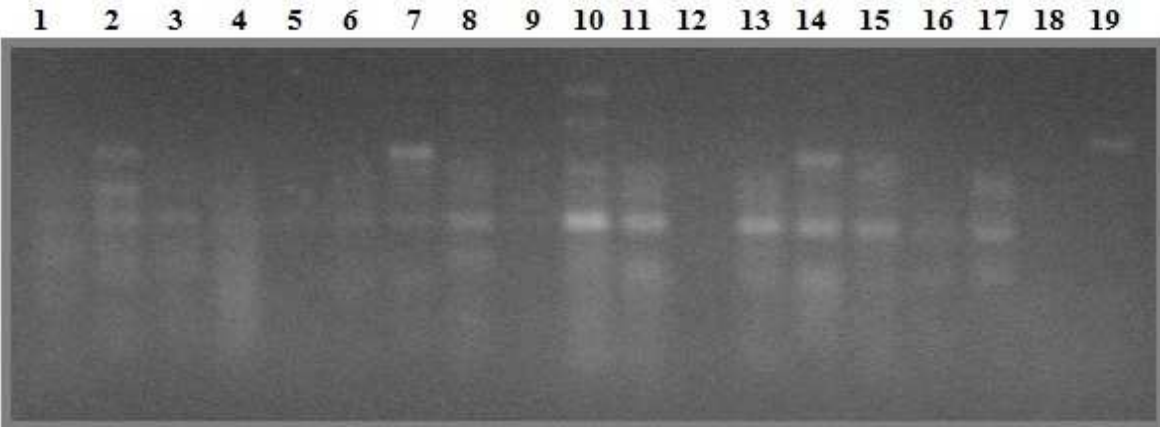
Şekil 21. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4’lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*



Şekil 22. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4’lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*



Şekil 23. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*



Şekil 24. SCAR9F_6A_1 SCAR primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin %1,4'lük AGE görüntüsü. Sırası ile genotiplerin isim listesi, 1. Derepazarı-7, 2. Pazar-20,3. Muradiye, 4. Gündoğdu, 5.Fener-3, 6. Tuğlalı-10, 7. Enstitü-1, 8. Enstitü-2, 9.Hamza Bey, 10. Hayrat, 11. Çayeli, 12. Ardeşen, 13. Fındıklı, 14. Pazar, 15. İyidere, 16. Derepazarı, 17. Üniversite, 18. Üniversite-2, 19. *Camellia olifera*

4. TARTIŞMA

Bitki genotiplerinin tanımlanmasında DNA izolasyonu yöntemi dolayısıyla DNA kalitesi başarıyı etkileyen en önemli ölçülerden biridir. Bu nedenle PCR uygulamalarında kullanacağımız saf DNA' nın eldesinde Favor Prep Plant Genomic DNA Ekstraksiyon Mini Kit firmanın öngördüğü şekilde kullanılmıştır. Böylece az miktarda taze yaprak dokusu örneği ile oldukça saf yüksek kalitede genomik DNA kısa sürede izole edilmiştir. ISSR tekniğinin en önemli avantajlarından biri az miktarda DNA ile sonuç verebilmesi olduğundan kullandığımız izolasyon yöntemi oldukça başarılı olmuştur.

Araştırmamızda kullandığımız çay varyeteleri Rize Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü' den temin edilen 11 anaç ve Rize ili ve çevre ilçelerden rastgele şekilde örneklenmiştir. Böylece hem anaç türlerin hem de farklı bahçelerde yetişen çay genotiplerinin karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız ISSR tekniğinin bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılan RFLP, SSR ve AFLP gibi yöntemlere nazaran tekrarlanabilir olması, radyoaktif işaretlemeye ihtiyaç duymaması, düşük maliyetli ve her laboratuvar şartında çalışılabilir olması nedenleriyle tarafımızdan tercih edilmiştir. Her bir ISSR PCR reaksiyonu en az iki defa tekrarlanmış ve sonuçların aynı olduğu teyit edilmiştir. ISSR tekniğinin RAPD tekniğine göre tekrarlanabilirliği daha üstün olduğu birkez daha görülmüştür. Ayrıca Yalım (2005) ve Tanyolaç (2003)'ında belirttiği gibi RAPD analizine göre toplam ve polimorfik bant sayısı RAPD çalışmalarına göre daha az olduğu tarafımızdan da görülmüştür (RAPD çalışmaları laboratuvarımızda ayrı bir çalışma olarak yapılmıştır).

ISSR primerleri daha önce yapılmış çalışmalara göre çay genotipleri arasında en iyi ayırım sonucunu veren primerlerden seçilmiştir. Ön çalışmalar ile gerek PCR şartları gerekse seçilen primerlerin tüm genotiplerde sonuç verip vermediği denenmiştir. Böylece hem Türk çay varyetelerinde çalışan primerler belirlenmiş hem de bu primerlere özgü optimum PCR şartları belirlenmiştir. Ön çalışmalarımız sonucunda 21 ISSR primerinden tüm varyetelerimizde çalışabilen 15 ISSR primeri belirlenmiş ve kullanılmıştır.

Yapılan ISSR analizlerinden oluşturulan dendograma göre en yüksek benzerlikleri % 74 ile Çayeli - İyidere varyeteleri, %72,5 ile Pazar - Derepazarı varyeteleri ve %72 ile Enstitü 1 - Enstitü 2 ve %68,5 ile Gündeoğdu - Tuğlalı varyeteleri göstermektedir. Birbirine en yakın grup içerisinde Ardeşen - Fındıklı - Pazar varyeteleri yer almaktadır.

Dendogramda görülen diğer ikili dallamalarda %65 ile Pazar 20 – Muradiye ile Üniversite 1 - Üniversite 2 çiftleri ve %59 ile Derepazarı 7 – Hayrat varyeteleri göstermektedir. Birbirine %59 benzeyen Derepazarı 7 – Hayrat çifti %54 benzerlik ile diğer tüm çay genotiplerinden ayrılmaktadır. *Camellia olifera* ise *Camellia sinensis* – *Camellia assamica* hibritleri olan çalışmamızda kullandığımız çay varyetelerinden %26,5 benzerlikle dış grup olarak ayrıldığı görülmektedir. Dendograma göre aynı coğrafi bölgeyi paylaşan Çayeli – Ardeşen – Fındıklı – Pazar varyetelerinin %66, Gündoğdu – Tuğlalı varyetelerinin %68,5 ve Derepazarı – Hayrat varyetelerinin %59 benzediği görülmektedir. Farklı coğrafi bölgelerde yetiştirilmekte olduğu halde çift oluşturmuş olan Pazar 20 – Muradiye, Çayeli – İyidere, Pazar – Derepazarı çiftlerinin ise çelikle üretilmediklerinden dolayı doğal olarak gözlemlenen seksüel açılım dolayısıyla benzer bantlar vermesi sebebiyle birbirine yakın benzerlikte olduğu düşünülmektedir.

G_(AC)₈ ISSR primeri ile 2 farklı çay bitkisinden elde edilen Tuğlalı 10 örneği 1467, Enstitü 1 örneği ise 1525 nükleotitlik homolog bölgelerin nükleotit sayıları farklı olmasına rağmen %85 benzer olması aynı büyüklükte gözlenen ISSR bant profillerinin nükleotit seviyesinde farklılık gösterdiğini göstermiştir. Dolayısıyla bant profili olarak birbirinin aynısı gibi görünmelerine rağmen aslında homolog fragmentler baz dizi analizi yapıldığında oldukça polimorfizm sağlayabileceği tesbit edilmiştir. Bu polimorfizmden yararlanılarak çalışılan örnekte ki her bir örnek için spesifik bir belirteç geliştirilebilir. Ancak bu çalışmadaki hızlı denemelerimizde 9 nolu primer ile elde edilen nükleotit verilerine dayandırılarak dizayn edilen spesifik primerler ile istenilen sonuca ulaşılamamıştır. Ancak baz dizi analizi neticesinde en azından 9 nolu ISSR primerin çay genomunda hangi genomik bölgeyi çoğalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak basit, ekonomik ve tekrarlanabilir özelliğinden dolayı ISSR analizleri ile Türkiye’de yetiştirilmekte olan çay genotiplerinin birbirlerinden ayrılabilceği görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Rize ilinde yetiştirilmekte olan çay varyeteleri ile Rize Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü tarafından belirlenmiş çay varyeteleri arasında ki benzerlik DNA seviyesinde ISSR - PCR tekniği ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar řu şekilde özetlenebilir:

- 1- Elde edilen benzerlik oranları dikkate alındığında örneklerin ekolojik olarak birbirleriyle bağlantılı olabileceği gör÷lmüştür.
- 2- Varyetelerin ayırımında daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan 21 ISSR primerinin 15 tanesinin Türk çay genotiplerinde kullanılabileceği belirlenmiştir.
- 3- Onbeş ISSR primerinin 12 tanesinin polimorfik olduğu bulunmuştur.
- 4- ISSR analizleri sonucunda Derepazarı 7 ve Hayrat çiftinin diğer çay varyetelerinden ayrıldığı gör÷lmüştür.
- 5- ISSR tekniği, çay varyetelerinin ayırımında kullanılabileceği gör÷lmüştür.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçların daha ileri götürülebilmesi için aşağıdaki öneriler dikkate alınabilir:

- 1- ISSR analizleri sonucunda elde edilen bant profilleri kullanılarak geliştirilebilecek SCAR markırları sayesinde genotip benzerliği daha ayrıntılı araştırılabilir.
- 2- Çay genotiplerinin ayırımında farklı DNA markırları birlikte kullanılarak ayırım genişletilebilir.
- 3- Çay tarımının geleceğe yönelik iyileştirilmesinde genotip ayırımının yukarıdaki öneriler ile kısa zamanda tamamlanması ve ıslah çalışmalarına katkı yapması gereklidir.

ISSR primerleriyle elde edilen bant profillerinden yararlanılarak kùltüvarlara spesifik primerlerin geliştirilmesinde çok sayıda bandın incelenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ataseven Z. 2012. Türkiye' de Çay Sektörü. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. Temmuz 2012. ISSN: 1303-8346
- Ben-Ying L, You-Yong L, Yi-Chun T, Li- Yuan W, Hao C and Ping-Sheng W. 2010 Assessment of Genetic Diversity and Relationship of Tea Germplasm in Yunnan as Revealed by ISSR Markers. *Acta Agronomica Sinica* 36(3):391-400
- Beriş F Ş, Sandallı C, Canakçı S, Demirbag Z and Belduz A O. 2005. Phylogenetic analysis of Tea clones (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Biologia*, Bratislava, 60/4:1
- Beriş Ş.F. Çay Bitkisinin (*Camellia sinensis* (L). O.Kuntze) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Tekniği ile Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. KTÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon. 2001
- Dan T V. Assessing genetic diversity in Vietnam tea [*Camellia sinensis* (L).O. Kuntze] using morphology, inter-simple sequence repeat (ISSR) and mikrosatellite (SSR) markers. Doktora Tezi. Georg-August University Göttingen. Faculty of Agricultural Science. Germany 2006
- Doğan Y. 2006. Bazı Ceviz (*Junglas regia* L.) Çeşit ve Genotiplerinin Moleküler Markör Teknikleriyle Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. 2006.
- Freeman S, West J, James C, Lea V and Mayes S. 2004 Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea (*Camellia sinensis*) *Molecular Ecology Notes* 4, 324-3267
- Kafkas S, Ercişli S, Doğan Y, Ertürk Y, Haznedar A, and Sekban R. 2009. Polymorphism and Genetic Relationships by Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 134: 428-434
- Lai J-A, Yang W-C and Hsiao J-Y. 2001 An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Bot. Bull. Acad. Sin* 42:93-100
- Lee S, Kim J, Sano J, Ozaki Y and Okubo H. 2003 Phylogenetic Relationships among Tea Cultivars Based on AFLP Analysis. *J. Fac. Agr. , Kyushu Univ.*, 47, 289-299
- Matsumoto S, Kiriiwa Y and Yamaguchi S. 2004 The Korean Tea Plant (*Camellia sinensis*): RFLP Analysis of Genetic Diversity and Realitionship to Japanese Tea. *Breeding Science* 54: 231-237
- Mondal T K. 2002. Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica* 128: 307-315

- Prabu G. R and Mandal A. K. A. 2010 Computational Identification of miRNAs and Their Target Genes from Expressed Sequence Tags of Tea (*Camellia sinensis*). *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 8: 113-121
- Roy S C and Chakraborty B N. 2009 Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis*) cultivars as revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. *Indian Journal of Biotechnology*. 370-376
- Singh D and Singh Ahuja P. 2006 5S rDNA genediversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome* 49: 91-96
- Tanyolaç, B. 2003. Inter - simple sequence Repeat (ISSR) and RAPD Variation Among Wild Barley (*Hordeum. vulgare* subsp. *spontaneum*) Populations from West Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 611-614
- Thomas J, Vijayan D, Joshi S D, Lopez S J and Kumar R R. Genetic integrity of smoclonal variantis in tea (*Camellia sinensis* (L) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats. *Tamil Nadu* 642 127
- Ujihara T, Taniguchi F, Tanaka J and Hayashi N. 2011 Development of Expressed Sequence Tag (EST)- Based Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) Markers of tea Plant and Their Application to Cultivar Identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1557-1564
- Vijayan K, Zhang W-J and Tsou C-H. 2009 Molecular Taxonomy of *Camellia* (Theaceae) Inferred From NRITS Sequences. *American journal of Botany* 96: 1348-1360
- Wachira F N, Poqell W & Waugh R. 1996 An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* L.(cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified polymorphic DNA and organelle-specific STS. *Heredity* 78: 603-611
- Wang K. R, Du Y. Y, Shao S. H, Lin C, Ye Q, Leu J. L and Liang Y. R. 2010. Development of specific RAPD markers for identifying albino tea cultivars 'Qiannianxue' and 'Xiaoxueya'. *African Journal of Biotechnology*. 434-437
- Yalım D. 2005, Türkiye'de Yetişen Arpa Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin ISSR (Basit Dizilim Tekrarları) Moleküler Markör Tekniği ile Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü. Adana. 2003
- Yao M. Z, Chen L and Liang Y. R. 2008 Genetic Diversity among tea cultivars from China, Japan and Kenya revealed by ISSR markers and its implication for parental selection in tea breeding programmes. *Plant Breeding* 127: 166-172

ÖZGEÇMİŞ

3 Nisan 1989 yılında Trabzon'un Maça ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokulu Hamsiköy İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini de Trabzon Lisesi'nde tamamladı. 2007'de Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2010-2011 Eğitim-Öğretim yılında açılan Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifika Programına katılarak başarılı oldu. 2011 bahar yarısında aynı üniversiteden mezun oldu. Eylül 2011'de Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.