



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN ÇAY (*Camellia sinensis* L.)
GENOTİPLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ YARDIMIYLA AYRIMI**

BURÇİN YOĞURTÇU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN ÇAY (*Camellia sinensis* L.)
GENOTİPLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ YARDIMIYLA AYRIMI**

BURÇİN YOĞURTÇU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY


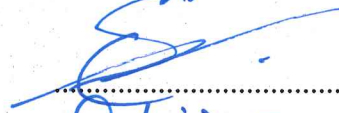
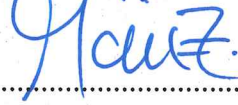
Burçin YOĞURTÇU tarafından hazırlanan "TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN ÇAY (*Camellia sinensis* L.) GENOTİPLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ YARDIMIYLA AYRIMI" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 31.07.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Doç. Dr. Ahmet AYGÜN

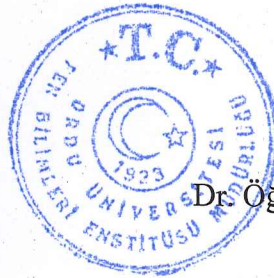
Jüri Üyeleri

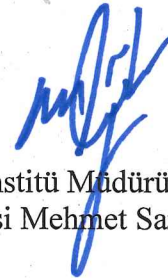
Danışman
Doç. Dr. Ahmet AYGÜN
Biyoloji, Kocaeli Üniversitesi
Üye
Dr. Öğr. Üyesi Ercan EKBİÇ
Bahçe Bitkileri, Ordu Üniversitesi
Üye
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CÜCE
Gıda Teknolojisi, Giresun Üniversitesi

İmza


.....

.....

.....

04 / 09 / 2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 20... tarih ve / sayılı kararı ile onaylanmıştır.





Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



Burçin YOĞURTÇU

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN ÇAY (*Camellia sinensis* L.) GENOTİPLERİNİN ISSR MARKÖRLERİ YARDIMIYLA AYRIMI BURÇİN YOĞURTÇU

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 35 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. AHMET AYGÜN)

Çalışma, ülkemizde çay yetiştiriciliği yapılan Karadeniz Bölgesindeki farklı illerden toplanan 18 çay (*Camellia sinensis* L.) genotipi ve 6 çeşidin genetik çeşitliliğinin tespit edilmesi amacı ile yapılmıştır. Çay genotiplerinin CTAB yöntemine göre DNA izolasyonu yapılmıştır. 59 adet ISSR primeri ile tüm DNA örnekleri için PCR yapılmıştır. Bu primerler içerisinde çay genotipleri arasında genetik ilişkiyi belirlemek amacıyla polimorfik olarak belirlenen 15 adet ISSR primeri kullanılmıştır. PCR işlemleri sonucunda oluşan bantlardan polimorfizm oranı %77 belirlenmiştir. PCR çalışmaları ile elde edilen ürünlerin analizi sonucu ISSR primerde 109 adet bant elde edilmiştir. Elde edilen bantlar var (1) ve yok (0) şeklinde skor edilerek bunların dosyaları oluşturulmuştur. Elde edilen bant sonuçlarına göre genetik ilişki dendrogramı oluşturulmuştur. Oluşturulan dendrograma göre çay genotipleri arasında yüksek benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda Karadeniz Bölgesine ait çay genotiplerinin sahip olduğu genetik çeşitlilik moleküler markörler ile ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Camellia sinensis* L., Genotip, Markör, ISSR.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF TEA (*Camellia sinensis* L.) GENOTYPES GROWN IN TURKEY BY ISSR MOLECULAR

BURÇİN YOĞURTÇU

ORDU UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED
SCIENCES DEPARTMENT OF

HORTICULTURE

MASTER THESIS, 35 PAGES

SUPERVISOR: TITLE, Assoc. Prof. AHMET AYGÜN

The aim of this study was to determine the genetic diversity of 18 tea (*Camellia sinensis* L.) genotypes and 6 varieties collected from different provinces in the Black Sea region of Turkey. DNA isolation was performed according to the CTAB method of tea genotypes. PCR was performed for all DNA samples with 59 ISSR primers. In order to determine the genetic relationship between tea genotypes among these primers, 15 polymorphic ISSR primers were used. At the end of the PCR procedures, the polymorphism rate was determined as 77% from the bands formed. As a result of the analysis of products obtained by PCR studies, 109 bands were obtained in ISSR polymer. The obtained bands were scored as (1) and none (0) and their files were created. Genetic dendrogram relation dendrogram was formed according to the obtained band results. Genetic diversity of tea genotypes of the Black Sea region was determined by molecular markers.

Keywords: *Camellia sinensis* L., Genotype, Markers, ISSR.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi ve tez yazımı esnasında yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen başta danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet AYGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Verilerin kullanılması ve değerlendirilmesi noktasında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN'a teşekkür ederim.

Araştırmada, yardımlarını esirgemeyen Zir. Yük. Müh. Muhammet Ali KÖSE'ye, Zir. Müh. İlyas KILINÇER'e ve Kayseri de çalışmam sırasında manevi destek sağlayan Zir. Müh. Şüheda DUMAN'a teşekkür ederim.

Aynı zamanda, maddi ve manevi desteklerini her an üzerimde hissettiğim babam ve anneme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1 Meyve Türlerinde ISSR Tekniği ile Yapılan Çalışmalar	4
2.2 Çay’da (<i>Camellia sinensis</i> L.) Moleküler Markörlerle Yapılan Çalışmalar	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1 Materyal	12
3.2 Yöntem.....	13
3.2.1 Yaprak Örneklerinin Toplanması.....	13
3.2.2 Yapraklardan DNA İzolasyonu.....	13
3.2.3 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	15
3.2.4 Kullanılan ISSR Primerleri	16
3.2.5 PCR Reaksiyonları	17
3.2.6 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Ayrılanması.....	18
3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi	19
4. BULGULAR	20
4.1 İzole edilen DNA’ların Konsantrasyon ve Saflık Dereceleri.....	20
4.2 ISSR Amplifikasyon Sonuçları	21
4.2.1 Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi	23
4.3 Benzerlik İndeksi ve Genetik İlişki Dendrogramı	24
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	30
7. KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	36

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 Türkiye’de çay üretim alanları.....	12
Şekil 3.2 CTAB DNA İzolasyon Yöntemi	14
Şekil 3.3 gDNA’ların saflık ve konsantrasyonlarının BioSpec-nono Shimadzu Biotech spektrofotometrede görüntülenmesi	15
Şekil 3.4 DNA örneklerinin PCR cihazına yerleştirilmesi	15
Şekil 3.5 Agaroz jel’e DNA’ların yerleştirilmesi	18
Şekil 4.1 Jelde DNA Moleküler Imager BIO-RAD ile görüntülenmiştir.	21
Şekil 4.2 UBC 825 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	21
Şekil 4.3 ISSR-7 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	21
Şekil 4.4 UBC 820 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	22
Şekil 4.5 ISSR-21 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	22
Şekil 4.6 UBC 843 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	22
Şekil 4.7 UBC 859 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	22
Şekil 4.8 UBC 858 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)	23
Şekil 4.9 Karadeniz Bölgesi çay genetik benzerlik değerleri	24
Şekil 4.10 Çay genotip ve çeşitleri arasındaki benzerlik indeksine dayanılarak çizilen dendrogram.....	25

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan çay genotip ve çeşitlerinin alındıkları yerler ve kodları.....	12
Çizelge 3.2 DNA İzolasyon Buffer.....	13
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ISSR primerleri	16
Çizelge 3.4 ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	17
Çizelge 3.5 Çay’da ISSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları	18
Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan çay genotip ve çeşitlerine ait DNA konsentre, saflık dereceleri ve 100 µl sulandırılmış DNA hazırlamada kullanılan DNA miktarları (µl)	20
Çizelge 4.224 çay genotip ve çeşitlerinde kullanılan polimorfik ISSR primerlerinin allel sayıları ve polimorfizm oranları	24

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
bç	: Baz çifti
CTAB	: Cetil trimetilamonyum bromid
°C	: Santigrat Derece
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi-Nükleozit Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
g	: Gram
H₂O	: Dihidrojen monoksit
HQ	: Headquarters
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat
LiCl	: Lityumklorür
µ	: Micron
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimol
NaCl	: Sodyumklorür
ng	: Nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PVP	: Polivinil Prolidon
RAPD	: Random Amplified Polymorphic
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
RNase	: Ribonükleaz
SDS	: Sodium Dodecyl Sulphate
SRAP	: Sequence Related Amplified Polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat
TBE	: Tris-borate-EDTA
TE	: Tris-EDTA Çözeltisi
Tris HCl	: Tris Hidroklorür
UPGM	: Unweighted Pair Goups Method with Arithmetic Mean
UV	: Ultraviolet

1. GİRİŞ

Türkiye, bitki çeşitliliği bakımından dünyada önde gelen ülkeler arasında yer almaktadır. Anadolu, birçok bitki türünün gen merkezi veya doğal yayılış alanı içinde bulunmaktadır. Ülkemiz sahip olduğu ekolojik özellikler dolayısı ile dünyada yetiştiriciliği yapılan yaklaşık 138 meyve türünden 16'sı subtropik olmak üzere 75 meyve türünün yetiştiriciliğine ev sahipliği yapmaktadır. Bu meyve türlerinden çay (*Camellia sinensis*), çaygiller (Theaceae) familyasından nemli iklimlerde yetişen, yaprak ve tomurcukları içecek maddesi üretmekte kullanılan bir meyve türüdür.

Yeşil çay, Siyah çay, ve Oolong çayı olmak üzere farklı oksidasyon seviyelerinden geçirilerek üretilmektedirler. Diğer yandan Kukicha çayı (sürgün çayı) yapraklardan ziyade sürgün ve gövdeden elde edilir. Anavatamı Güney ve Güneydoğu Asya olmasına karşın dünya üzerinde tropical ve subtropikal bölgelerde de yetiştirilmektedir. Tarım amaçlı yetiştirilenler 2 m'nin altında küçük ağaç görünümünde ve her dem yeşil olan bitkilerdir. Serbest bırakıldığında 9 m boyunda bir ağaç formunu kazanır. Kuvvetli ana köke sahiptir (Anonim, 2015). Dünyada yaş çay üretim alanları yaklaşık 5 milyon 561 bin hektar olup 45 ülkede çay üretimi yapılmaktadır. En büyük ilk 7 üretici ülke, dünya çay üretiminin yaklaşık %84'ünü karşılamaktadır. Dünya kuru çayının %36'sı Çin'de, %4'ü ise Türkiye'de üretilmektedir (Anonim, 2018).

Türkiye'de çay tarımı Zihni Derin'nin 1923 yılında Batum'a yapmış olduğu gezide, çay bahçelerini ve fabrikalarını inceleyip Rus bahçıvanlarla beraber çay tohumları ve fidanları ile Rize'ye gelmesi ile başlar. Böylece fidanlık kurulmuş olur (Süzek, 2017). Daha sonra Rize'den Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Artvin, Trabzon, Giresun ve Ordu illerine kadar yayılma göstermektedir. Bu bölgelerin dikili çay alanlarının %65'i Rize, %21'i Trabzon, %11'i Artvin, %2'si Giresun ve %1'i Ordu ilinde olmak üzere toplam 82 505 dekar alanda 212 692 çiftçi çay tarımı yapmaktadır. Her yıl bölgede 22 331 ton civarında yaş çay yaprağı hasat edilmektedir. Elde edilen bu miktardaki yaş yapraktan yaklaşık olarak 220 000-230 000 ton arası kuru çay üretimi sağlanmaktadır (Anonim, 2016). Günümüzde çay bitkisi üretimi çoğunlukla tohum ile yapılmakta, fakat tohum ile çoğaltım geniş genetik varyasyon, farklı verim ve kalite

özelliklerine sahip bitkiler meydana getirmiştir. Bu farklılık da bitkide yakın ve uzak akrabalıkların ortaya çıkmasına neden olmuştur, genetik farklılıklar araştırmacılar tarafından değerlendirilmektedir (Kafkas ve ark., 2009). Bu farklılık genetik açıdan önemli iken yetiştiricilik açısından olumsuz bir etkiye sahiptir. İslahçı açısından öneme sahip bu varyasyon olumlu yönde değerlendirilebilir. Oluşmuş populasyondan üstün özellik gösteren bireylerin morfolojik özelliklerine bakılarak seçilmesi ile yeni çeşitler ortaya çıkarılabilmektedir. Ancak morfolojik karakterler yetiştiricilik ve ekolojik faktörlerden etkilenmekte ve bunun yanında seleksiyon ıslahı uzun yıllar almaktadır.

Bu seleksiyon daha sonraki yıllarda biyokimyasal markörler kullanılarak yapılmaktaydı ancak polimorfizmin ve izoenzim sisteminin yetersiz olması bu yöntemin kullanımını sınırlandırmıştır (Tanksley, 1983). 1900'lü yılların ortalarından sonra DNA'nın varlığının tespiti ve biyokimyasal mekanizmasının anlaşılması ile birlikte moleküler biyoloji ve moleküler markör teknikleri büyük bir hızla gelişmeye başlamıştır. Kromozom üzerinde yer gösteren bir işaret veya küçük bir DNA parçası moleküler markör olarak adlandırılmaktadır. Bu işaret; gen, genin bir parçası ya da genler arası bir bölgedeki DNA dizisi olabilmektedir. Bu farklı dizilimdeki DNA uzunlukları farklı teknikler ile bitkilerin ayırımında kullanılmaktadır. Böylece bitkilerin genetik yapılarının aydınlatılması, moleküler karakterizasyon, gen haritalarının çıkarılması, genetik akrabalıklarının ortaya çıkarılması, melezlerin kontrolü, erken seleksiyon ve mutasyonların tespiti çalışmalarında yeni bir dönem başlamasına yol açmıştır. Doğadan toplanan bitkisel örneklerde ilk önceleri morfo-fizyolojik özelliklerin incelenmesiyle genetiksel varyasyonlar bulunmaya çalışılmış ve bununla birlikte moleküler seviyede genetiksel varyasyonu ortaya çıkaracak yeni teknikler geliştirilmiştir. Moleküler biyolojide kullanılmaya başlanan teknikler birçok DNA markör tekniğinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Hızla büyüyen moleküler tekniklerin kullanımı, uygulaması kolay daha geniş bir yapıya bürünmüştür (Hiloğlu, 2012).

Bitkilerde kullanılan markörler tarihsel sıraya göre morfolojik markörler, biyokimyasal markörler ve moleküler markörler olarak devam etmiştir. Son yıllarda daha güvenli ve etkin bir sonuç vermesi bakımından moleküler markörler daha çok önem

kazanmıştır ve hızla yeni teknikler gelişmiştir. Moleküler markörlerde kendi içerisinde hibridizasyona dayalı ve PCR dayalı markörler diye ayrılmaktadır ve farklı isimlerde birçok teknik geliştirilmiştir. Bitki biyoteknolojisi ve ıslahını tanımlamada kesin sonuç vermesi, uygulamada kolaylık ve ekonomiklik sağlaması moleküler markörlerin yeni tiplerinin bulunması ve geliştirilmesine yönelik çalışmalara halen devam edilmektedir (Thomas ve ark., 2002). İlk olarak RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniği geliştirilerek çeşit tanımlamada ve genetik haritaların çıkartılmasında kullanılmaya başlanmıştır (Tanksley ve ark., 1989). Ancak RFLP tekniği pahalı, uzun ve yoğun iş gücü ve radyoaktif madde kullanımını gerektirdiğinden dolayı uygulamada yeterince etkin olmamıştır. Bu teknikten sonra PCR (Polymerase Chain Reaction) esaslı teknikler geliştirilmiş olup bunların başında RAPD (Random Amplified Polymorphic) moleküler markör tekniği gelmektedir (Williams ve ark., 1990). Zietkiewicz ve ark., (1994) tarafından geliştirilen inter SSR tekniğinde hazır üretilmiş olan 2'li, 3'lü, 4'lü ve 5'li tekrarlanan primerler kullanılmaktadır. Ülkemizde çay alanlarının oluşturulmasında bitkisel materyal olarak tohum kullanılmıştır. Tohumdan oluşturulan bahçelerde büyük oranda genetik varyasyon ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı ülkemizdeki çay gen kaynaklarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu araştırmada Türkiye'de yetiştirilen çay alanlarından temsili olarak seçilen çay genotiplerinin ISSR markörleri kullanılarak ayrımlarını ortaya konmak amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Meyve Türlerinde ISSR Tekniği ile Yapılan Çalışmalar

Potter ve ark., (2002) ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) moleküler markör tekniği kullanılarak Kaliforniya'da Wolfskill araştırma bahçesinde yer alan 48 ceviz (*Juglans regia*) çeşidi arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan 8 polimorfik ISSR primerin 48 adet ceviz çeşidinin amplifikasyon sonuçlarında 54 bant elde edilmiş ve bunun 31 tanesi %57 polimorfizm göstermiştir. Primer başına düşen bant sayısı 5 ile 9 arasında değişirken, polimorfik bant sayısı ise 1 ile 7 arasında değişim göstermektedir. Araştırmacılar, ISSR moleküler markör tekniğinin ceviz çeşit ve genotiplerinin tanımlanmasında ve aralarındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılabileceğini ve RAPD ile benzer maliyete ancak daha fazla polimorfizme sahip olduğu bildirmişlerdir.

Zhebentyayeva ve ark., (2003) şeftali için geliştirilen 12 SSR (Simple Sequence Repeat) moleküler markörünü kullanarak Avrupa, Çin ve Orta Asya kökenli kayısı genotiplerini tanımlamışlardır. Araştırmacılar UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean)'ya dayalı dendrogram sonucu kayısının kültüre alınması ile ilgili farklı bölgelerin bulunduğunu, incelenen genotiplerin sağlandığı bölge ile ilişkilerinin az olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca çalışmada Çin kökenli genotiplerin *Prunus armeniaca* var. *ansu Maxim* alt türünde yer aldığı rapor edilmiştir.

Erdoğan ve ark., (2007) Ankara armudu klonları arasındaki genetik farklılıkları RAPD markör tekniği ile araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan 25 adet primerden 2 tanesinde amplifikasyon zayıf olmuş diğerleri ise açıkça okunabilen ve tekrarlanabilen bantlar vermiştir. Ancak araştırmada kullanılan genotipler arasında yeterli polimorfizme rastlanılmadığı için Ankara armudu klonlarının genetik ayrımı yapılamamıştır.

Yılmaz ve ark., (2009) *Prunus* cinsine ait 16 genotipin genetik çeşitliliği ve aralarındaki filogenetik ilişkiyi araştırmak amacıyla ISSR markörlerini kullanmışlardır. 20 ISSR markörüyle PCR sonucunda polimorfizm oranı %57 ile %100 arasında olan 180 polimorfik ISSR bandı elde etmişlerdir. Jaccard benzerlik indeksi kullanılarak UPGMA analizi ve temel bileşen analizi (principal coordinate analysis=PcoA) gerçekleştirilmiş olup, analizler sonucunda kayısı genotiplerinin daha

düşük genetik varyasyon gösterdiği, kayısı ve erik melezi olan Plumcot'un kayısıdan ziyade eriğe daha yakın olduğu ortaya koyulmuştur.

Pazouki ve ark., (2009) 10 SSR belirteci kullanarak 22 yabancı *Pistacia vera* çeşidi ile birlikte 282 yerel *Pistacia* genotipi arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* içindeki genetik çeşitliliğin *Pistacia vera* ve *Pistacia khinjuk*'dan daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar yapmış oldukları istatistik analize (ANOVA) göre türler arası, farklı populasyonlar arası ve populasyonlar içindeki varyasyonun, sırasıyla %41'i, %9'u ve %50'si olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonuçlarının, SSR belirteçlerinin kullanılarak *Pistacia* türleri ve çeşitleri arasındaki genetik ilişkilerin ve çeşitliliğin belirlenmesinin Antep fıstığı genetik kaynaklarının korunması ve toplanması için önemli bilgiler sağladığını bildirmişlerdir.

Noroozi ve ark., (2009) İran'da zengin Antep fıstığı kaynaklarının bulunduğunu, bu yüzden dünyada yerel Antep fıstığı çeşitlerinin sayısı ve çeşitliliğinin çok fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 6 ISSR primerleri ile 31 çeşit arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmalarında GA, CA, GAA tekrarlara dayalı ISSR primerlerinden iyi bir amplifikasyon ürünü elde etmişler, ancak CT, GT ve CAA tekrarlara dayalı primerler ise daha az verimli olmuştur. Araştırmacılar, üç primerden elde ettikleri toplam 28 bantın 13'ünün polimorfik olduğunu, ortalama bant sayısının ise 9.3 olduğunu bulmuşlardır. Toplam bant sayısı 7-12 arasında, polimorfik bant sayısı ise 3-5 arasında değişiklik göstermiştir. Ayrıca, araştırmacılar, analiz ettikleri çeşitler arasında düşük genetik çeşitlilik görüldüğünü ve ISSR-PCR analizinin etkili bir polimorfizme sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Baghizadeh ve ark., (2010) İran'da yetiştiriciliği yapılmakta olan 31 Antep fıstığı çeşit ve genotipleri rastgele güçlendirilmiş polimorfik DNA (RAPD), sekanslar arası tekrar (ISSR) ve basit sekanslar (SSR) markörleri ile tanımlanmıştır. Üç moleküler markörün birleştirilmiş verileri kullanılarak oluşturulan genel dendrogram, her markör ile ayrı olarak elde edilenlere bir dereceye kadar benzerdir. Genetik benzerlik matrislerine dayanan genel prensip koordinat analizi (PCA), ilk üç öz vektörün toplam moleküler varyasyonun %28.46'sını oluşturduğunu göstermiştir. SSR popülasyonu analizinde,

dört primer 31 Antep fıstığı genotipi arasında ortalama 2.75 allel değerinde 11 allel üretilmiştir. Bu lokusların hepsinde % 100 polimorfizm gözlenmiştir. 0.4374'ün düşük ortalama polimorfik bilgi içeriği değeri, genotipler arasında yüksek genetik benzerliğin varlığını göstermiştir ve İran fıstık çeşitlerinin/genotiplerinin etkili karakterizasyonu için ek polimorfik SSR primerlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Etkin multipleks oran ve test etkinliği indeksine göre, sırasıyla ISSR ve SSR markörlerinin takip ettiği genotipleri ayırt etmede RAPD markörlerinin en güçlü olduğunu göstermişlerdir.

Türkeli, (2010) ISSR, SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) VE AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniklerini kullanarak Antep fıstığı'nın ilk genetik bağlantı haritasını oluşturmayı planlanmıştır. Siirt (*Pistacia vera* L.) çeşidi ile monoik 'PA-18' genotipi (*Pistacia atlantica* Desf) arasındaki melezlemeye ait 92 F1 bitkisi arasında "double pseudo- testcross" haritalama metodu uygulanarak iki ayrı genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Siirt çeşidinin haritasına ait toplam 165 markörün (9 ISSR, 49 SRAP, 107 AFLP) %87'si 1:1 ve %13'ü ise 3:1 açılım göstermiş ve bunlara ait markör yoğunluğu 9.70 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan 'PA-18' genotipinin haritasını oluşturan toplam 156 markörden (10 ISSR, 47 SRAP, 99 AFLP) %86'sı ve %14'ü sırasıyla 1:1 ve 3:1 açılımı göstermiş olup bunlara ait markör yoğunluğu 8.21 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak Antep fıstığı'nın moleküler ıslaha geçişi için temel oluşturacak ilk genetik bağlantı haritasını ortaya çıkarmıştır.

Carrasco ve ark., (2012) 35 ISSR ve 27 SSR markörleri ile toplam 97 SSR alleli ve 232 binary ISSR lokusundan elde edilen moleküler veriler ile 29 Japon erik çeşidinin genetik karakterizasyonunu analiz etmişlerdir. Japon erikleri güçlü bir sporofitik kendine uyumsuz sisteme sahip çapraz tozlanan türlerdir. Dolayısıyla diğer *Prunus* türleri ile karşılaştırıldığında Japon erik çeşitlerinde yüksek genetik çeşitlilik gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Demirel, (2013) çalışmasında Gernik (*Triticum dicoccum*) ve Siyez (*Triticum monococcum*)'in morfolojik ve moleküler özelliklerini incelemiştir. Kastamonu'dan gelen materyallerin tarla gözlemi sonucu 9'unun tetraploid *T. dicoccum*, 14'ünün

diploid *T. monococcum* olduğu belirlenmiştir. ISSR isaretleyicileri kullanılarak da moleküler karakterizasyon analizlerini gerçekleştirip uygun bir istatistiksel program ile akrabalık ilişkilerinin incelenmesi sonucu 23 Kastamonu popülasyonu ile 9 tescilli çeşidin genotipleri arasında ki ortalama Dice benzerlik katsayısı 0.553 olarak bulunmuştur. Kullanılan 14 ISSR primeri ile ortalama polimorfik bant sayısı 10.21 olup ortalama polimorfizm oranı ise %95.42 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak bu araştırmacı kavuzlu buğday türlerinden Siyez ve Gernik'in kurak koşullar altında tescilli çeşitlerden daha yüksek bitki boyuna, bin dane ağırlığına ve protein seviyesine ulaşabilmesi bu genotiplerin kültür çeşitlerini kurağa dayanımı ve kalitesinin yükseltilmesinde genitr olarak kullanılabileceğini; ISSR isaretleyicilerinin kavuzlu buğdaylarda genotipik tanımlamada ve popülasyonlar arası genetik yakınlık ve uzaklığın belirlenmesinde etkili bir moleküler yöntem olduğunu belirtmiştir.

Kafkas ve Karadut, (2013) tarafından SSR lokuslarından yeni ISSR primerlerinin Antep fıstığı, ceviz, elma, kayısı ve kiraz türlerinde test edilmesi ile geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada her bir türden 8 çeşit veya genotip ile birlikte yeni dizayn edilen 137 adet ISSR primeri kullanmışlardır. Antepfıstığında, 618'i polimorfik olan toplamda 791 bant, cevizde 395'i olmak üzere 613 bant, elmada 496'sı polimorfik olmak üzere 696 bant, kayısıda 429'u polimorfik olmak üzere 666 bant ve kirazda ise 281'i polimorfik olmak üzere 514 bant elde edilmiştir. ISSR primerlerinin çeşit tanımlanmasında genetik kaynakların karakterizasyonunda, markör geliştirmede ve genetik haritalamada kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Najafzadeh ve ark., (2014) İran'ın vişne genotiplerinde genetik çeşitliliği belirlemiş ve değerlendirmişlerdir. Çalışmada 12 vişne genotipinin DNA'ları 23 ISSR moleküler markörü ile oğaltılmış olup toplam 489 bant elde dilmiş ve bunların 482'sinin polimorfik olduğu belirtilmiştir. Ortalama polimorfik allel sayısı 20.95 olarak bulunmuştur. Mantel testinde Kophenetik korelasyon katsayısı (r) 0.74 olarak bulunurken, genetik benzerlik katsayısı 0.56 ile 0.77 arasında değişkenlik göstermiştir.

Yorgancılar ve ark., (2015) konvansiyonel bitki ışlahının çevresel şartlara bağlı olduğunu bundan dolayı da zaman alıcı olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle bir eşitdin ışlahı uzun yıllar sürebilir. Bu nedenle araştırmacılar ışlah sürecinde daha etkili

kullanılabilecek yeni yöntemlerle ilgilenmişlerdir. Moleküler markör teknolojisi bitki ıslahında seleksiyon stratejilerini geliştirmek için geniş kapsamlı yeni uygulamaların benimsenmesini sağlamıştır. Bitki moleküler markör genetiği ile ilgili olarak son yıllarda elde edilen bilgiler, bitki ıslahı çalışmalarına yansiyabilecek niteliktedir. Bu nedenle yeni geliştirilen ya da değiştirilmiş bitki ıslahı yöntemleri, bitki moleküler biyolojisi çalışmalarından elde edilen bilgilere dayanılarak kullanılmalıdır. Bu çalışmada kullanılan moleküler markör teknikleri (ISSR, AFLP, RAPD ve SSR) ile bitki ıslahında kullanımının avantajları/dezavantajları araştırılmıştır. Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı ile geri melez ıslahı, gen piramitlerinin oluşturulması, resesif genlerin seleksiyonu, yabani gen kaynaklarından gen transferleri ve erken seleksiyon gibi avantajlar sağlanarak klasik ıslahın etkinliği artırılmakta, böylece yeni çeşitlerin geliştirilmesi hız kazanmaktadır. Moleküler markör uygulamaları tek başına klasik ıslahın yerine kullanılamamakla birlikte, klasik ıslahın başarısını artıran tamamlayıcı bir teknik olarak kabul edilmektedir.

2.2 ay'da (*Camellia sinensis* L.) Moleküler Markörlerle Yapılan alışmalar

ay genotiplerinin belirlenmesinde moleküler markörlerden oldukça fazla yararlanılmaktadır. Yapılan alışmalar sonucunda; polimorfizm bakımından SSR ve AFLP markörleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR markör teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, SRAP, ISSR ve AFLP markörlerinin avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bu markörleri içerisinde en çok tercih edilenlerden biride ISSR markörleridir.

Lai ve ark., (2001) Tayvan'da yetiştirilen çayların genetik akrabalıklarını belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada 37 farklı çay genotipi seçmişlerdir. Çalışmada toplamda 53 ve 56 RAPD ve ISSR markörleri kullanmışlardır ISSR dendrogramında Tayvanlı yerli yabani aylar, Assam ayına, ardından Çin ayı Tayvanlı hibrit çeşitlerine yakın bir şekilde kümelenmiştir. Yerli yabani çayın popülasyon gen çeşitliliği, incelenen üç popülasyon arasında en yüksek olduğu bulunmuştur. Moleküler varyans analizi (ANOVA), gruplar içindeki varyans bileşeninin gruplar arasında olduğundan daha büyük olduğunu ortaya koymuştur. RAPD ve ISSR'ye dayanan benzerlik matrisleri arasındaki korelasyon katsayısı 0.811 olarak gerçekleştirmiştir. Bir Mantel testi korelasyonun bu iki moleküler markörün sonuçları arasında iyi bir uyum olduğunu ($p<0.001$) ortaya çıkarmıştır.

Yao ve ark., (2008) Çin, Japon ve Kenya'dan gelen 48 çay çeşidinin genetik çeşitliliği ve ilişkisini, basit sekans tekrarı (ISSR) moleküler markör tekniği ile değerlendirmişlerdir. Toplam 382 ISSR band belirlemişlerdir. Bunlardan 381'i (% 99.7) polimorfik olarak belirlenmiştir. Nei'nin gen çeşitliliğinin (H) ve Shannon'ın bilgi endeksinin (I) ortalamasını sırasıyla 0.22 ve 0.35 olarak bulmuşlardır. Çin'deki çeşitler arasında, Japonya ve Kenya'dakilerden daha çok miktarda çeşitlilik ortaya çıkması olduğunu saptamışlardır. Çin nüfusu içinde, Doğu Çin'deki çeşitlilik diğer bölgelerinkinden daha fazladır. Genetik farklılaşma katsayısı (GST) bu bölgede 0.202 olarak belirlenmiştir ve bu popülasyonlar içinde yüksek derecede bir genetik çeşitlilik olduğunu göstermiştir. Bu, ay popülasyonları arasında sık görülen doğal çapraz tozlaşma ve tohum dağılımı ile açıklanabilir. Çeşitler arasındaki çift yönlü benzerlik katsayısı 0.162 ile 0.538 arasında değişmiştir. Test edilen bütün çeşitlerin iki gruba ayrıldığı 48 çay çeşidinden oluşan bir dendrogram yapılmıştır. Veriler ay çeşitlerinin

genetik ilişkisinin ISSR moleküler markör teknikleri tarafından belirlenebileceğini göstermiştir.

Roy ve ark., (2009) 21 çay genotipinde 7 ISSR ve 12 RAPD primeri kullanarak Çin, Assam ve Kamboçya çayları arasında karşılaştırma yapmışlardır. Araştırmacılar, yaptıkları bu çalışmada %88.54 polimorfizm ISSR bandı, %77.77 RAPD bandı bulmuşlardır. Dendrogram, üç küme (Çin tipi, Assam tipi ve Kamboç tipi) gösteren UPGMA algoritması kullanılarak genetik benzerlik matrisi temel alınarak oluşturulmuştur. Tüm gruplarda genetik çeşitlilik ortalama olarak 0.38, popülasyonlardaki çeşitlilik 0.27 ve tüm bölgelerdeki popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma 0.25 olarak tespit edilmiştir. Çin çeşitliliği en büyük grup içi çeşitliliği göstermiştir (Hs: 0.285-0.291). Kamboçya çayı en az çeşitliliğe (Hs: 0.193-0.207) sahiptir ve orta derece çeşitlilik Assam çayında (Hs: 0.223-0.241) bulunmuştur. Interpopulation gen akışı [$Nm: 0.5 (1-Gst) / Gst$] 0.76; $Nm < 1.0$ popülasyonlar arasındaki sınırlı genetik değişimi göstermiştir.

Jı ve ark., (2011) çok uzun yıllar önce Çin'in Yunan eyaletine ekilmiş olan çay popülasyonlarını (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) ISSR markör tekniğini kullanarak 10 antik çay plantasyonunda genetik çeşitlilik ve farklılaşma incelemişlerdir. Nei'nin genetik çeşitliliği (HE) ile tahmin edilen popülasyonlardaki ortalama genetik çeşitlilik yaklaşık olarak 0.2809 iken Shannon endeksleri (H_o) 0.4179 olarak bulunmuştur. 10 antik çay popülasyonunun (P) yüzdesi %56.5 ila %90.91 arasında değişmektedir. Gen farklılaşma katsayısı (GST) 0.3911 ile varyans (ANOVA) %39.70 olduğu belirlenmiş. Bu değerlerin sonucunda çaylar arasındaki genetik farklılaşmanın orta düzeyde olduğunu saptamışlardır. Çay türlerinde genetik açılımlar ve ciddi habitat parçalanması olduğu için çay popülasyonlarını koruma yoluna gidilmiştir.

Ben-Ying ve ark., (2010) Yunan eyaletindeki 134 çay genotipinin genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Çayın ıslahı için 18 basit baz dizi tekrarı ISSR primeri kullanılarak toplam 475 fragman büyütülmüş, bunlardan 470 bant polimorfik olarak bulmuşlardır. Kalımlar arası benzerlik (GS), ortalama 0.512-0.445 ile 0.819 arasında değişmiştir. Bu sonuçlar, test edilen çayların genetik germplazmasındaki zengin çeşitliliğini

göstermiştir. Türler arasındaki genetik çeşitlilik ortalama (GS) 0.92 iken 0.850 ile 0.987 arasında değişmiştir.

Liu ve ark., (2012) Yunanistan'da yetişen 40 yabancı çay bitkisi arasındaki genetik ilişkileri belirlemek için basit dizi tekrarları (ISSR) moleküler markör tekniğini kullanmışlardır. Toplam 275 bant oluşturulmuş 15 ISSR primeri ile bunların 274'ü (% 99.6) polimorfik olarak bulunmuştur. Araştırmacılar ortalama genetik benzerlik katsayısını, Nei gen çeşitliliğini (H) ve çay çeşitlerinde ortalama Shannon bilgi indeksini (I) 0.4180, 0.3797 ve 0.5586 olarak bulmuşlardır. Farklı primerler tarafından sağlanan bant desenleri kombinasyonu, son olarak 40 çaylık ISSR parmak izi germiplas bant desenleri kombinasyonu oluşturmuşlardır. Bu araştırma da, ISSR işaretleyicileri, yabancı çayın çeşitlerini ayırmada çok etkili olmuşlardır.

Kaç, (2013) Rize bölgesinden alınan 19 çay varyetesinin genetik benzerliğini belirlemek için ISSR moleküler markör teknikleri kullanılarak çay varyetelerindeki genetik farklılığı tespit etmek için 21 adet ISSR primeri denenmiş ve 15 tanesinin çalışmaya uygun olduğu görülmüş ve bu 15 ISSR primerinin 12 tanesinin de polimorfik olduğunu belirlemiştir. Bu primerler kullanılarak yapılan ISSR markör çalışması sonucunda elde edilen PCR bantları NTSYS-PC Ver. 2.0 programı ile dendrogramı oluşturulmuştur. Analiz sonucunda, Rize bölgesindeki çay varyetelerinin benzerlik oranları dikkate alındığında örneklerin ekolojik olarak birbirleriyle bağlantılı olabileceği görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu araştırmada toplam 18 genotip ve 6 çeşit olmak üzere 24 ay (*Camellia sinensis* L.) varyetesi materyal olarak kullanılmıştır. Bitkisel materyallerin, 6'sı aykur Atatürk ay ve Bahçe Kùltùrleri Araştırma Enstitùsù Mùdùrlùėù (Rize), 8'i Rize, 2'si Artvin, 2'si Trabzon, 5'i Giresun, 1'i Ordu illerine bağlı ilçelerden alınmıştır.



şekil 3.1 Tùrkiye'de çay ùretim alanları

Çizelge 3.1 çalışmada kullanılan çay genotip ve çeşitlerinin alındıkları yerler ve kodları

No	Kod	Genotipin alındığı yer	Kaynak
1	G01	Pazar	RİZE
2	G02	Pazar	RİZE
3	G03	Hopa	ARTVİN
4	G04	Arhavi	ARTVİN
5	G05	Fındıklı	RİZE
6	G06	Ardeşen	RİZE
7	G07	Hayrat1	TRABZON
8	G08	Of	TRABZON
9	G09	İyidere	RİZE
10	G10	Derepazarı	RİZE
11	G11	Gùneysu	RİZE
12	G12	Çayeli	RİZE
13	01	Fener3	RİZE ve ABKAE
14	02	Fener	RİZE ve ABKAE
15	03	Hayrat2	RİZE ve ABKAE
16	04	Hamzabey	RİZE ve ABKAE
17	05	Muradiye10	RİZE ve ABKAE
18	06	Enstitù	RİZE ve ABKAE
19	G13	Tirebolu1	GİRESUN

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan çay genotip ve çeşitlerinin alındıkları yerler ve kodları (devamı)

No	Kod	Genotipin alındığı yer	Kaynak
20	G14	Tirebolu2	GİRESUN
21	G15	Tirebolu3	GİRESUN
22	G16	Tirebolu4	GİRESUN
23	G17	Tirebolu5	GİRESUN
24	G18	Perşembe	ORDU

(ÇBKAE: Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü)

3.2 Yöntem

3.2.1 Yaprak Örneklerinin Toplanması

Ülkemizde yoğun olarak çay yetiştiriciliği yapılan farklı bölgelerden 18 genotip ve 6 çay çeşidinin taze yaprak örnekleri bitkilerin yeni sürmüş sürgünlerinden toplanmıştır. Yapraklar canlılıklarını kaybetmemesi için ağzı kilitli poşetlere konulmuş ve buz kaplarında laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.2.2 Yapraklardan DNA İzolasyonu

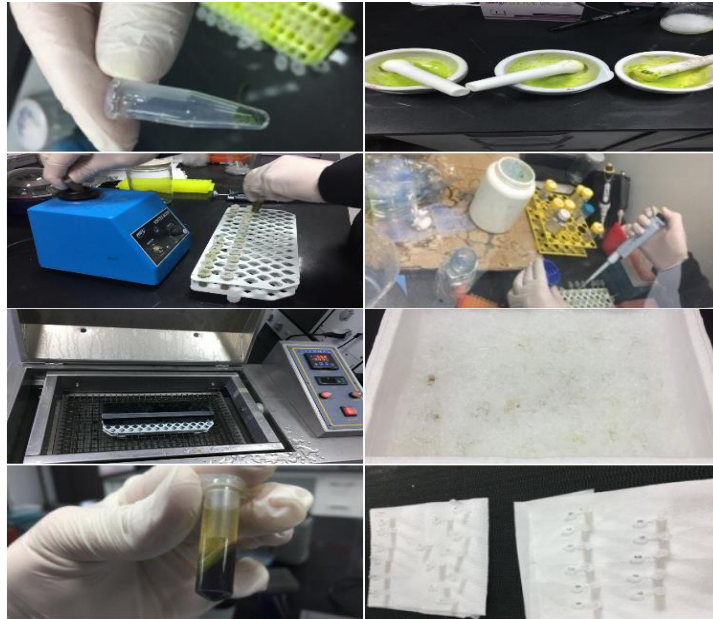
DNA izolasyonu Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu CTAB yöntemi ile yapılmıştır (Şekil 3.2). Elde edilen sonuçlarla benzerlik indeksi'ne dayalı dendrogram verileri UPGM metoduna göre analiz edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 3.2 DNA İzolasyon Buffer

Kimyasallar	100 ml için
1 m Tris HCl	5 µl
0.5 m EDTA	4 µl
3.5 m NaCl	20 µl
4 m LiCl	10 µl
CTAB	1 g
PVP	1 g
SDS	1 g

Bu yöntemde 100 mg taze yaprakların içerisine 1ml CTAB DNA izolasyon Buffer'dan eklenerek çay yaprakları havan içerisinde ezilmiştir. 2 ml ependorf tüplerin içerisine ezilen bu yaprak örneklerinden 1 ml konulmuştur. Örnekler vortekslelendikten sonra

üzerine 15 µl Betamerkopto etanol ilave edildikten sonra 10 saniye tekrar vorteks yapılmıştır. Örnekler daha önce ısıtılan 65°C su banyosunda 15 dk bekletilmiş ve 5 dk'da bir ters düz edilmiştir. Sonrasında örnekler oda koşullarında soğutulmaya bırakılmıştır. Örneklerin üzerine çeker ocak da (24:1) oranında 70 µl kloroform izoamil eklenmiş ve 20-25 defa ters düz edildikten sonra 30 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin üst kısmındaki yaklaşık 700-750 µl süzöntü yeni tüpe aktarılmıştır ve üzerine eşit oranda soğuk isopropanol eklenerek karıştırılmış ve -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 1 dk 14000 rpm'de santrifüj edilmiş çöken DNA'yı oynatmadan üstteki su süzöntü dökülmüş ve örnekler 2 kez %70 etanol ile yıkanmıştır. Etanol kuruması için ters çevirilip 30 dk bekletilir. Elde edilen DNA örnekleri 100 µl TE (Tris-EDTA) (pH:8) çözeltisi eklenerek çözülmüştür. DNA içerisinde bulunan RNA'ların uzaklaştırılması amacı ile Ribonükleaz (RNase) eklenmiş ve 30 dk 37°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 3.2 CTAB DNA İzolasyon Yöntemi

Elde edilen genomik DNA'ların spektrofotometre ile okumaları gerçekleştirilip, konsantre ve saflık A260/A280 değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Okumaların ardından DNA'ların yapılacak olan ISSR-PCR çalışmaları için yeterli kalitede olduğu

saptanmıştır. ISSR çalışmasına başlamadan önce her genotip için izole edilen DNA konsantrasyonları eşitlenip kullanıma kadar -20°C 'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.3 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

PCR'ye dayalı DNA moleküler markör tekniklerinde konsantrasyonun belirlenmesi önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada çay varyetelerine ait DNA örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi için BioSpec-nono Shimadzu Biotech spektrofotometre cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.3). Her bir örnek için 2 μl izole edilmiş DNA örneklerinden alınarak konsantrasyonları belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlar 20 ng/ μl olacak şekilde sulandırılmış ve PCR analizleri için her bir DNA örneği 10 μl kullanılacak şekilde son hacim 80 μl 'de hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). Böylece tüm örnekler PCR'ye hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.3 gDNA'ların saflık ve konsantrasyonlarının BioSpec-nono Shimadzu Biotech spektrofotometrede görüntülenmesi



Şekil 3.4 DNA örneklerinin PCR cihazına yerleştirilmesi

3.2.4 Kullanılan ISSR Primerleri

ISSR reaksiyonunda kullanılan 59 primere ait veriler Çizelge 3.3’de, reaksiyonda kullanılan kimyasallar Çizelge 3.4’de, ISSR analizlerinde kullanılan PCR sıcaklık ve döngü şartları Çizelge 3.5’de verilmiştir.

PCR uygulamaları Bio-Rad T100™ cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ISSR primerleri

No	Primer Adı	Primer Sekansları (5’--3’)
1	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
2	UBC 809	GAGAGAGAGAGAGAGAT
3	UBC 816	CACACACACACACACAT
4	UBC 825	ACACACACACACACACT
5	UBC 826	ACACACACACACACACC
6	UBC 827	ACACACACACACACACG
7	UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
8	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
9	UBC 844	CTCTCTCTCTCTCTRC
10	UBC 850	GTGTGTGTGTGTGTGYC
11	UBC 855	ACACACACACACACACYT
12	UBC 868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
13	UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
14	UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
15	UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
16	UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
17	UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTTA
18	UBC 815	CTCTCTCTCTCTCTTG
19	UBC 818	CACACACACACACACAG
20	UBC 819	GTGTGTGTGTGTGTGTA
21	UBC 820	GTGTGTGTGTGTGTGTT
22	UBC 821	GTGTGTGTGTGTGTGTT
23	UBC 822	TCTCTCTCTCTCTCTCA
24	UBC 823	TCTCTCTCTCTCTCTCC
25	UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG
26	UBC 825	ACACACACACACACACT
27	UBC 826	ACACACACACACACACC
28	UBC 828	TGTGTGTGTGTGTGTGA
29	UBC 830	TGTGTGTGTGTGTGTGG
30	UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
31	UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
32	UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
33	UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
34	UBC 843	CTCTCTCTCTCTCTRA
35	UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTRG
36	UBC 847	CACACACACACACARC
37	UBC 848	CACACACACACACARG

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ISSR primerleri (devamı)

No	Primer Adı	Primer Sekansları (5'--3')
38	UBC 850	GTGTGTGTGTGTGTGTGYC
39	UBC 851	GTGTGTGTGTGTGTGTGYA
40	UBC 852	CTCTCTCTCTCTCTCTRA
41	UBC 855	ACACACACACACACACYT
42	UBC 856	ACACACACACACACACYA
43	UBC 857	ACACACACACACACACYG
44	UBC 858	TGTGTGTGTGTGTGTGTGRT
45	UBC 859	TGTGTGTGTGTGTGTGTGRC
46	UBC 860	TGTGTGTGTGTGTGTGTGRA
47	UBC 866	CTCTCTCTCTCTCTCTC
48	UBC 887	DVDTCTCTCTCTCTCTCTC
49	UBC 888	BDBCACACACACACACACA
50	UBC 889	DBDACACACACACACACAC
51	UBC 890	VHVGTTGTGTGTGTGTGTGT
52	UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTGTG
53	ISSR 7	AGAGAGAGAGAGAGAGAYC
54	ISSR 9	CTCTCTCTCTCTCTCTCTRC
55	ISSR 15	TCCTTCCTTCCTTCCRY
56	ISSR 21	AGAGAGAGAGAGAGAGAYT
57	ISSR 28	AGAAAGAAAGAAAGAAAG
58	ISSR 43	GTGTGTGTGTGTGTGTGYA
59	ISSR 47	AGAGAGAGAGAGAGAGAY

3.2.5 PCR Reaksiyonları

Çizelge 3.4 ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR Bileşenleri	Konsantrasyon
10x0 Taq Buffer	1.5 µl
HQ Buffer	1.5 µl
dNTP (2 mM each)	1.2 µl
Primer	1 pmol
DNA	5 µl
Taq DNA Polymerase	1 µl
H ₂ O	3.8 µl

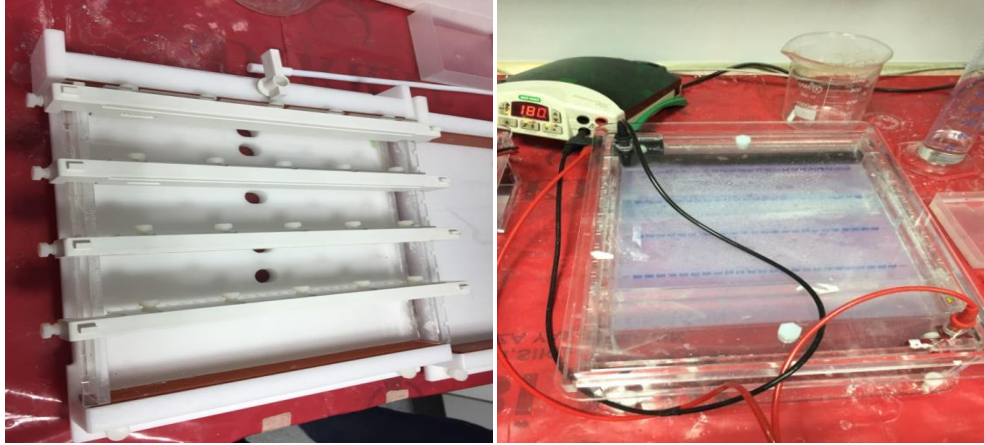
(dNTP = dATP:100 mµ, dCTP: 100 mµ, dGTP: 100 mµ, dTTP: 100 mµ)

Çizelge 3.5 Çay'da ISSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

	Sıcaklık(°C)	Süre(sn)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	180	1
Denatürasyon	95	45	40
Primerlerin DNA'ya bağlanma safhası (annealing) (primere göre değişmekte)	55	45	40
Uzama safhası (extension)	72	120	40
Son uzama safhası (final extension)	72	300	1

3.2.6 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Ayrılması

Önce 1X TBE tampon içeren %2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jele 20 µl etidyum bromür eklenerek 70°C'ye kadar soğutulmaya bırakılmıştır. Soğuma işlemi gerçekleşen jel, elektroforez tankına konulmuş ve örnekler yüklenmiştir. Agaroz jel üzerinde ayrılan bantların ağırlıklarının tahmini amacıyla jele en az 1 sıra 5 µl DNA (ladder) yüklenerek (Şekil 3.5), 90 volt elektrik akımında 3 saat süreyle büyüklüklerine göre ayrılmıştır. Daha sonra jel UV transilluminatör üzerine konularak fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 3.5 Agaroz jel'e DNA'ların yerleştirilmesi

3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi

Agaroz jel görüntülerinde çay genotiplerine ait bantlar, var olma ve olmama durumuna göre “1” veya “0” Şeklinde skorlanmıŐtır. Skorlamada kuvvetli bantlar değerlendirmeye alınmıŐ ve benzerlik indeksi oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 18 çay genotipi ve 6 çay çeşidinin CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflık dereceleri A260/280 ölçümleri arasında değiştirilmiştir (Çizelge 4.1). Bu değerler kabul edilebilir sınırlar içerisinde ve çay DNA'larının saf olduğu anlamına gelmektedir.

4.1 İzole edilen DNA'ların Konsantrasyon ve Saflık Dereceleri

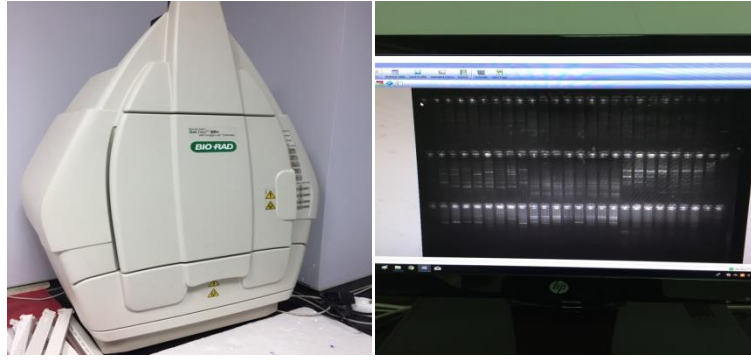
Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan çay genotip ve çeşitlerine ait DNA konsantrasyon, saflık dereceleri ve 100 µl sulandırılmış DNA hazırlamada kullanılan DNA miktarları (µl)

Genotip ve Çeşitler	Konsantrasyon (ng/µl)	Saflık Dereceleri (A260/ A280)
Pazar1	661.14	2.05
Pazar2	577.16	2.09
Hopa	394.21	2.08
Arhavi	316.89	2.14
Fındıklı	281.06	2.11
Ardeşen	726.59	2.05
Hayrat1	583.58	2.10
Of	300.84	2.11
İyidere	526.17	2.07
Derepaazarı	377.67	2.08
Güneysu	575.03	2.10
Çayeli	1157.26	2.07
Fener3	869.21	2.07
Fener	489.79	2.09
Hayrat2	696.38	2.13
Hamzabey	415.93	2.10
Muradiye10	853.58	2.11
Enstitü	703.89	2.15
Tirebolu1	718.18	2.17
Tirebolu2	706.86	2.16
Tirebolu3	774.43	2.14
Tirebolu4	917.02	2.05
Tirebolu5	622.79	2.17
Perşembe	718.75	2.17

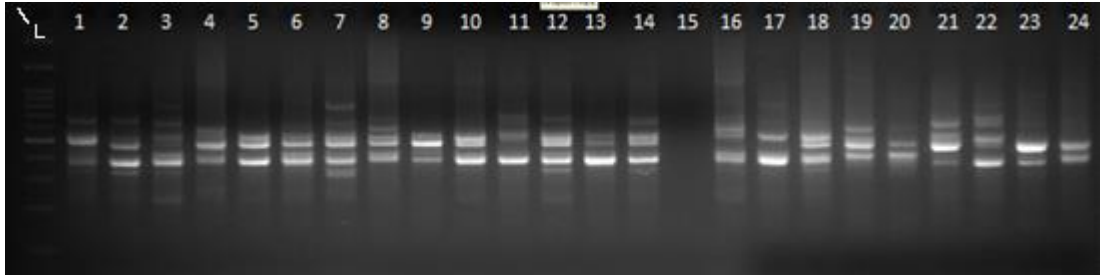
Spektrofotometre değerlerine bakıldığında DNA miktarlarının yeterli olduğu ve saflık sınırlarının genel olarak kullanılabilir DNA'larda olması gereken 1.7–2 değerleri arasında bulunduğu görülmektedir.

4.2 ISSR Amplifikasyon Sonuçları

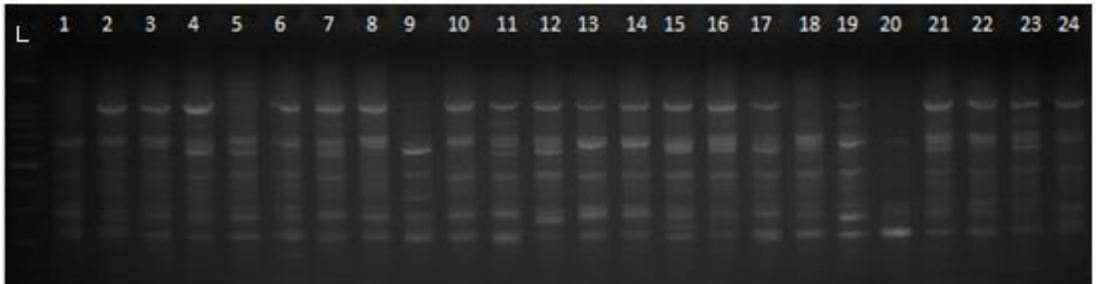
Doğu Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen 24 adet çay varyetesinin moleküler karakterizasyonu için ISSR tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak 59 adet ISSR primeri 8 farklı çay örneğinde denenmiş ve tekrarlanabilir bantlar veren 59 adet ISSR primeri arasından polimorfik olan 15 ISSR primeri tüm örneklerin moleküler karakterizasyonunda kullanılmıştır (Çizelge 4.2). Denenmiş olan ISSR primerlerin jeldeki görünümü (Şekil 4.1) verilmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 4.2 – Şekil 4.8’de verilmiştir.



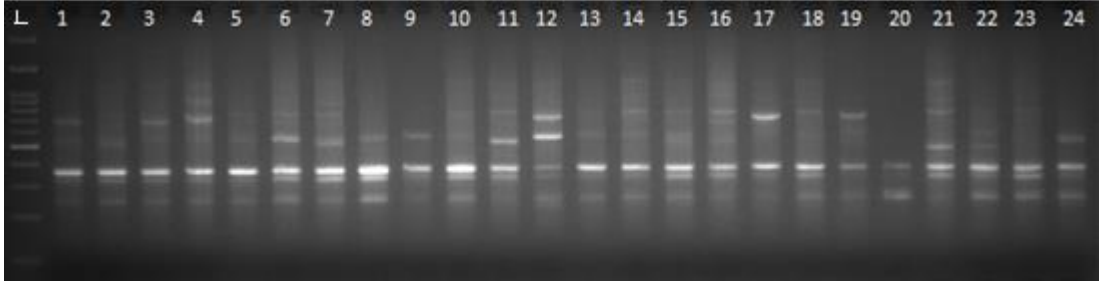
Şekil 4.1 Jelde DNA Moleküler Imager BIO-RAD ile görüntülenmiştir.



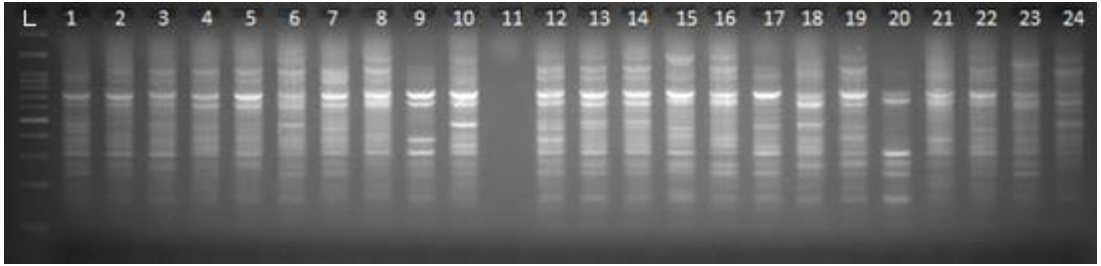
Şekil 4.2 UBC 825 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)



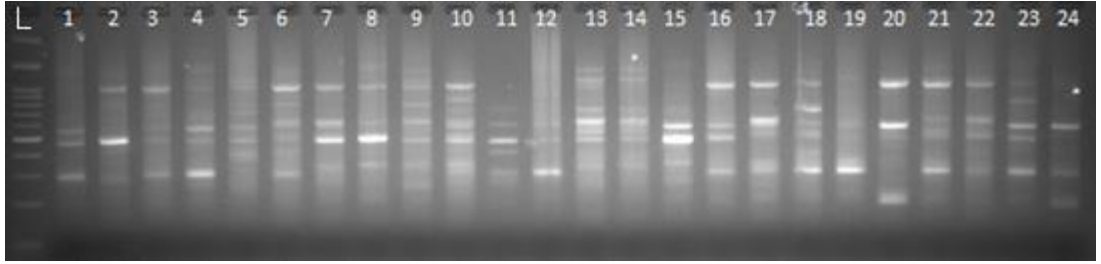
Şekil 4.3 ISSR-7 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)



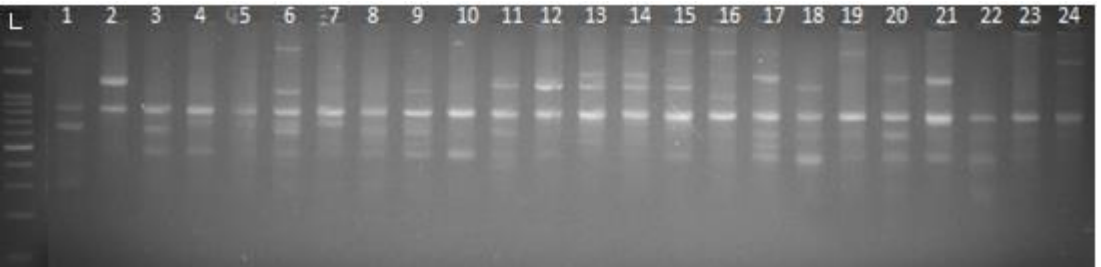
Şekil 4.4 UBC 820 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)



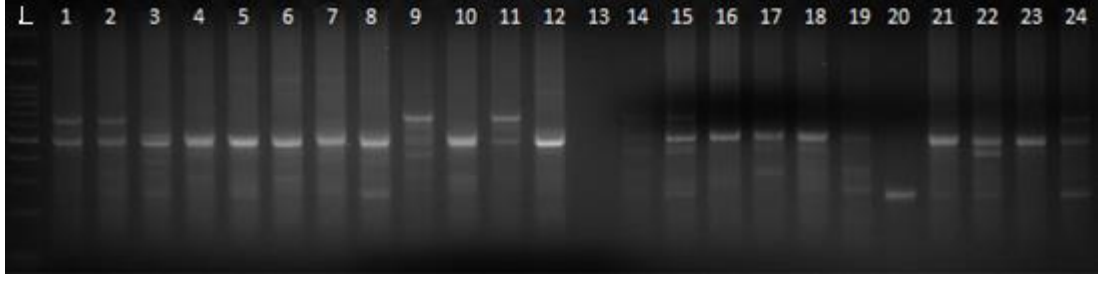
Şekil 4.5 ISSR-21 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)



Şekil 4.6 UBC 843 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)



Şekil 4.7 UBC 859 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)



Şekil 4.8 UBC 858 ISSR Primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi. L: 5 µl DNA (ladder)

ISSR analizinde tarama işlemi sonucu elde edilen değerlere göre belirlenerek 15 polimorfik primer 24 çay örneğine uygulanmıştır. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden çok güçlü ve belirgin olanlar dikkate alınarak bantlar var (1) ve yok (0) şeklinde değerlendirilmiştir. Bu bant sayılarının her biri dikkate alınmamış belirgin olan bantlar dikkate alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Bant büyüklükleri 150-1500 Baz çifti (bc) arasında değişmiştir. Bu değerlendirme sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS) 109, bunların 84 adeti polimorfik, polimorfizm oranı (PO) ise %77 olarak bulunmuştur.

4.2.1 Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin polimorfizm oranları, primerlerden elde edilen polimorfik bant sayılarının toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile bulunmuştur.

$$\text{Polimorfizm Oranı (\%)} = \text{Polimorfik Bant Sayısı} / \text{Toplam Bant Sayısı} \times 100$$

15 polimorfik ISSR primerlerinde toplam bant sayıları 3-12 arasında olup en az bant sayısı olan UBC 858, en fazla bant sayısı gösteren ISSR 21 primeridir. Polimorfik bant sayıları da 2 ila 8 arasında değerler gözlenmiş en az polimorfizm gösteren UBC 858, en fazla polimorfizm gösteren UBC 820 ile UBC 843 primerleri olmuştur. Polimorfizm oranlarına bakıldığında %50 ile %100 arasında değiştiği en düşük polimorfizm gösteren ISSR 21 primeri olup en yüksek polimorfizimi gösteren UBC 843, UBC 850, UBC 860 ve UBC 852 primerleri olmuştur.

Çizelge 4.224 çay genotip ve çeşitlerinde kullanılan polimorfik ISSR primerlerinin allel sayıları ve polimorfizm oranları

Primer Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı
UBC 827	6	4	66.6
UBC 840	6	4	66.6
UBC 841	8	6	75.0
UBC 820	10	8	80.0
UBC 825	8	6	75.0
UBC 843	8	8	100.0
UBC 850	7	7	100.0
UBC 855	6	5	83.3
UBC 858	3	2	66.6
UBC 857	6	5	83.3
UBC 859	5	4	80.0
UBC 860	6	6	100.0
UBC 852	7	7	100.0
ISSR 7	11	6	54.5
ISSR 21	12	6	50.0
Toplam	109	84	-
Ortalama	7.2	5.6	0.78

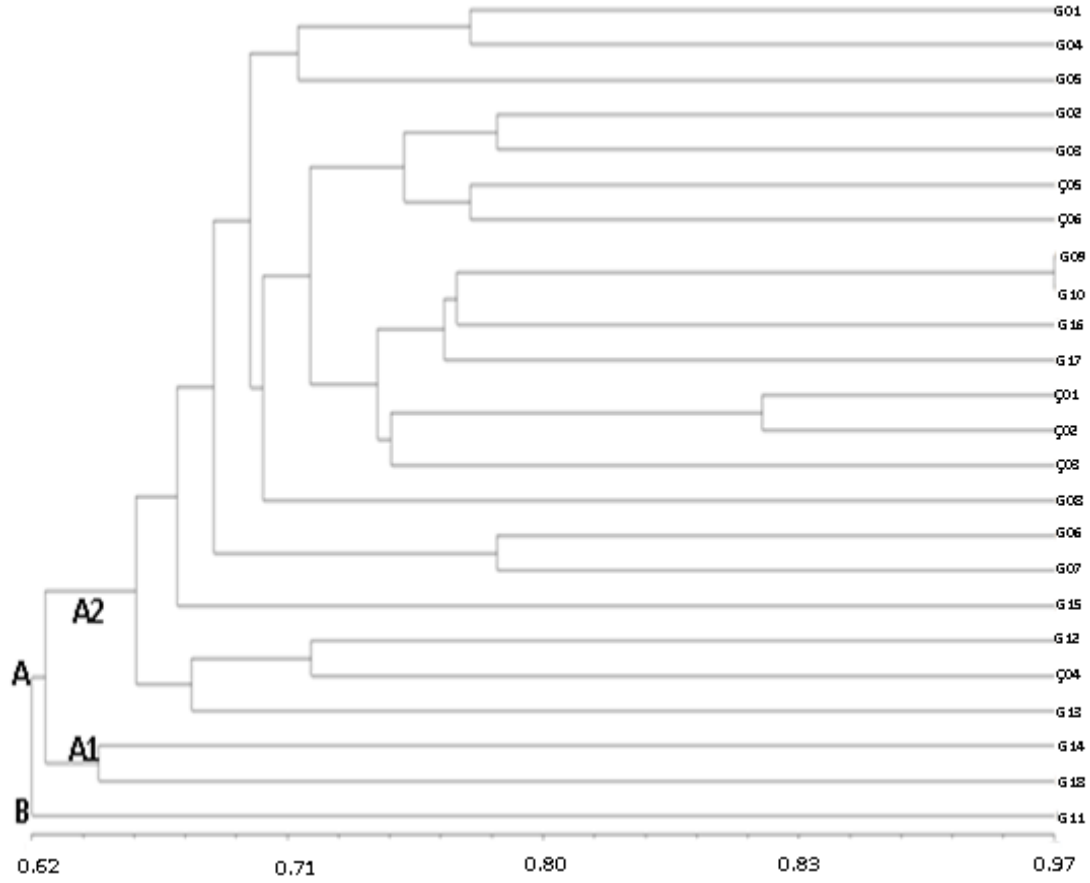
4.3 Benzerlik İndeksi ve Genetik İlişki Dendrogramı

Çay genotip ve çeşitlerinin numaralandırma sırası Şekil 4.9'deki gibidir.

Row#	Col#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1	0.000000																							
2	2	0.706422	1.000000																						
3	3	0.669724	0.779816	1.000000																					
4	4	0.770642	0.660505	0.678899	1.000000																				
5	5	0.680734	0.680734	0.651376	0.733945	1.000000																			
6	6	0.680734	0.669724	0.706422	0.660505	0.651376	1.000000																		
7	7	0.651376	0.706422	0.651376	0.642201	0.669724	0.779816	1.000000																	
8	8	0.678899	0.752296	0.697247	0.651376	0.697247	0.697247	0.660505	1.000000																
9	9	0.697247	0.770642	0.678899	0.743119	0.752296	0.752296	0.743119	0.000000																
10	10	0.669724	0.743119	0.669724	0.715563	0.724770	0.761467	0.743119	0.715563	0.972477	1.000000														
11	11	0.651376	0.633027	0.614678	0.623853	0.669724	0.680734	0.651376	0.678899	0.568878	0.556330	1.000000													
12	12	0.633027	0.633027	0.614678	0.642201	0.633027	0.633027	0.680734	0.623853	0.678899	0.669724	0.566330	1.000000												
13	13	0.633027	0.724770	0.633027	0.697247	0.680734	0.651376	0.633027	0.660505	0.752296	0.761467	0.614678	0.680734	1.000000											
14	14	0.669724	0.706422	0.651376	0.733945	0.669724	0.669724	0.651376	0.697247	0.770642	0.761467	0.614678	0.761467	0.871556	1.000000										
15	15	0.660505	0.715563	0.660505	0.743119	0.623853	0.660505	0.623853	0.669724	0.743119	0.733945	0.642201	0.715563	0.752296	0.733945	1.000000									
16	16	0.642201	0.587156	0.623853	0.633027	0.623853	0.660505	0.623853	0.706422	0.706422	0.697247	0.605046	0.715563	0.642201	0.715563	0.651376	1.000000								
17	17	0.680734	0.706422	0.779816	0.697247	0.706422	0.743119	0.669724	0.660505	0.733945	0.724770	0.596330	0.596330	0.724770	0.706422	0.715563	0.623853	1.000000							
18	18	0.733945	0.733945	0.770642	0.743119	0.715563	0.697247	0.660505	0.669724	0.724770	0.697247	0.660505	0.678899	0.715563	0.733945	0.724770	0.651376	0.770642	1.000000						
19	19	0.651376	0.669724	0.680734	0.623853	0.669724	0.633027	0.577917	0.660505	0.660505	0.633027	0.577917	0.706422	0.633027	0.669724	0.605046	0.642201	0.680734	0.733945	1.000000					
20	20	0.724770	0.669724	0.651376	0.660505	0.669724	0.633027	0.541294	0.642201	0.697247	0.669724	0.614678	0.492385	0.651376	0.651376	0.550487	0.623853	0.669724	0.660505	0.556330	1.000000				
21	21	0.642201	0.678899	0.697247	0.706422	0.623853	0.642201	0.715563	0.577917	0.651376	0.642201	0.605046	0.623853	0.660505	0.678899	0.669724	0.596330	0.678899	0.724770	0.587156	0.550487	1.000000			
22	22	0.706422	0.706422	0.761467	0.715563	0.669724	0.680734	0.680734	0.697247	0.770642	0.761467	0.596330	0.706422	0.724770	0.724770	0.733945	0.678899	0.761467	0.752296	0.651376	0.651376	0.678899	1.000000		
23	23	0.697247	0.733945	0.715563	0.706422	0.715563	0.678899	0.678899	0.724770	0.779816	0.752296	0.605046	0.697247	0.715563	0.743119	0.680734	0.733945	0.706422	0.697247	0.605046	0.706422	0.752296	1.000000		
24	24	0.587156	0.623853	0.623853	0.577917	0.587156	0.623853	0.631101	0.633027	0.651376	0.623853	0.587156	0.680734	0.623853	0.623853	0.651376	0.669724	0.587156	0.605046	0.642201	0.596330	0.660505	0.669724	1.000000	

Şekil 4.9 Karadeniz Bölgesi çay genetik benzerlik değerleri

ISSR yöntemi ile 18 genotip ve 6 çeşidin bant profilleri oluşturulmuş ve UPGMA metodu ile kümeleme analizi yapılarak dendrogram çizilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Çay genotip ve çeşitleri arasındaki benzerlik indeksine dayanılarak çizilen dendrogram

Çalışmada kullanılan 24 çay örnekleri için UPGM metodu ile kümeleme analizi yapılmış ve bunların dendrogramı elde edilmiştir (Şekil 4.10). Dendrogramda görüldüğü gibi benzerlik düzeyleri 0.62 ve 0.97 arasında değişmiş, A ve B olmak üzere iki dallanma olduğu gözlenmiştir. B grubunun 1 genotipi içerdiği geriye kalan 23 genotipin de A grubunu oluşturduğu, aynı zamanda A grubunun da kendi içerisinde esas olarak A₁ ve A₂ olarak ikiye ayrıldığı, A₁ grubunun 2 genotipi içerdiği, A₂ grubunun 21 genotipi içerdiği ve A₂ grubunun da kendi içerisinde alt gruplara ayrıldığı saptanmıştır. Dendrogram incelendiğinde birbirine en uzak olan bireylerin Güneysu ve Pazar genotipleri olduğu, en yakın bireylerin ise İyidere ve Derepazarı olduğu belirlenmiştir. A₂ grubu 6 alt gruptan oluşan çeşitli genotiplerle ana grup oluşturmaktadır. Dendrogram kümelenmesinde aşağıdan yukarıya ilk alt grup

Tirebolu1-Hamzabey-Çayeli'dir. İkinci alt grupta Tirebolu3-Hayrat1-Ardeşen genotip ve çeşitleri iç içedir. Üçüncü alt grupta 8 genotip vardır ve bu Of-Hayrat2-Fener3-Fener-Tirebolu4-Tirebolu5-İyidere-Derepazarı genotip ve çeşitleri de iç içedir. Bu grup içindeki İyidere-Derepazarı genotipleri genetik olarak özdeşirler. Dördüncü alt gruptaki Pazar2-Hopa-Muradiye-Enstitü genotip ve çeşitleri de kendi aralarında bir grup oluşturmuşlardır. Son alt grup 3 genotip içermektedir ve yakın illerden örneklenmiştir. Bu gruptaki Pazar-Arhavi-Fındıklı genotipleri kendi içerisinde yakın ilişki göstermektedirler.

5. TARTIŞMA

Bitki gen kaynaklarının karakterizasyonunda PCR teknolojisine dayalı birçok DNA moleküler markör tekniği geliştirilmiştir. Bunlardan en fazla bilinen ve birçoğu araştırmacı tarafından gen kaynaklarının karakterizasyonunda kullanılan DNA markör teknikleri ISSR, RAPD, AFLP, SRAP'dır. Özellikle uygulamadaki kolaylığı ve tekrar edilebilme özelliğinden dolayı ISSR DNA moleküler markör tekniği birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (Kafkas ve ark., 2006).

RAPD markörleri ile ayırt edilemeyen çeşitlerin ISSR markörleri ile ayrılabilir oldukları incelemeler sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgu, ISSR'lerin evrim oranının, çalışılan çay örneklerinde RAPD'lerden daha hızlı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle ISSR markör tekniği, genetik çeşitlilik ve yakından ilişkili çay çeşitlerinin genetik ilişkilerinin belirlenmesi çalışmasında kullanım için uygundur. Farklı çalışmalarla ISSR markörlerinin RAPD markörlerinden daha yüksek seviyede polimorfizm gösterdiği de belirtilmiştir (Yang ve ark., 1996; Nagaoka ve Ogihara, 1997; Parsons ve ark., 1997; Esselman ve ark., 1999).

Bu çalışmada, kullanılan çay örnekleri Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu illerinden rastgele şekilde örneklenmiştir. Böylece farklı bahçelerde yetişen çay genotip ve çeşitleri karşılaştırılmıştır. 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. Türk çay varyetelerinde çalışan primerlerin optimum PCR şartları belirlenmiştir. Ön çalışmalarımız sonucunda 59 ISSR primerinden tüm varyetelerimizde çalışabilen 15 ISSR primeri belirlenmiş ve kullanılmıştır. Bu işlemde yola çıkılarak yapılan çalışma sonucunda, çay varyetelerinin benzerlik düzeyleri 0.62 ve 0.97 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Dendrogram incelendiğinde birbirine en uzak bireylerin Güneysu ve Pazar genotipleri olduğu, en yakın bireylerin ise İyidere ve Derepazarı olduğu belirlenmiş olup diğer çay varyeteleri de kendi aralarında alt gruplar oluşturmaktadırlar.

Çay da toplam 59 ISSR primeri kullanılmış ve bunların 15 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu primerlerde polimorfizm oranlarına bakıldığında %50 ile

%100 arasında değerler aldığı ve ortalama polimorfizmin %78 olduğu belirlenmiştir. En az polimorfizm gösteren ISSR 21 primeri olup en yüksek polimorfizm gözlenen UBC 843, UBC 850, UBC 860 ve UBC 852 primerleri olmaktadır. Kullanılan 15 adet ISSR primerlerinin her biri çay genotip ve çeşitlerinde rahatlıkla bir DNA bölgesini çoğalttığı belirlenmiştir. Mevcut tüm primerler her bitki türünde kullanılamaz bu yüzden her bitki türü ve çeşidi için uygun primelerin geliştirilmesi ve seçilmesi gerekmektedir. Nitekim, Doğan, (2006) cevizde 108 adet ISSR primeri denemiş 25 adet primerin; Atgüden, (2016) Ankyropetalum Fenzl cinsinde 48 adet ISSR primeri denemiş, 11 adet primerin; Atalmış, (2007) kavunda 21 adet ISSR primerimeri kullanılarak 17 adet primerin; Demirel, (2013) buğdayda 54 adet ISSR primeri içerisinden 14 adet primerin; Kaç, (2013) ayda 21 adet ISSR primeri denemiş 12 adet primerin; çeker, (2008) nohutta 65 adet ISSR pirimeri kullanılarak 11 adet ISSR primerinin polimorfik olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar ile yapmış olduğum çalışma benzerlik göstermektedir. Çalışmada belirlenen primerler daha sonraki ayda yapılacak çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bant sayıları incelendiğinde çay genotip ve çeşitlerinin 15 adet polimorfik ISSR primerinden toplamda 109 adet bant elde edilmiş. Kafkas ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada Antep fıstığı, ceviz, elma, kayısı ve kiraz çeşitlerinde 137 adet ISSR primeri kullanmış. Antep fıstığı'nda 791 bant, cevizde 613 bant, elmada 696 bant, kayısıda 666 ve kirazda ise 514 bant elde etmişlerdir. eker, (2008) Türkiye orjinli 91 nohut genotipi ile 2 nohut çeşidinde 11 polimorfik ISSR primerinden toplamda 242 bant üretmiştir. Atgüden, (2016) Türkiye'de bulunan Ankyropetalum Fenzl cinsinde 11 polimorfik ISSR primeriden 391 bant elde etmiştir. Bu çalışmalara göre çalışmamda daha az sayıda bant elde edilmiştir. Ancak elde edilen bu 109 bantın çay genotip ve çeşitlerini birbirinden ayırt etmede yeterli sayıda olduğu belirlenmiştir.

Dendrogram sonuçları incelendiğinde çay genotip ve çeşitlerindeki benzerlik Kaç, (2013) Rize bölgesinden alınan 19 çay varyetesi arasındaki genetik benzerliği belirlemek için ISSR DNA moleküler markör tekniği kullanarak aralarındaki benzerlik düzeyleri (0.26-0.75) olduğu sonucuna ulaşmıştır. Mevcut ay yetiştiriciliği yapılan bölgelerden toplanan çay genotipleri incelendiğinde %62 oranında bir benzerlik ortaya çıkmıştır. Liu ve ark., (2012) Yunanistan'da yetişen 40 yabani çay bitkisi arasındaki

genetik ilişkileri belirlemek için ISSR moleküler markör tekniği kullanılmıştır ve genetik benzerlik oranları 0.4180, 0.3797 ve 0.5586 olarak belirlenmiştir. Yao ve ark., (2008) Çin, Japon ve Kenya'dan gelen 48 çay çeşidinin genetik çeşitliliğini ve ilişkisini belirlemek için ISSR moleküler markör tekniğini kullanmış olup, Çin'deki çeşitler arasında, Japonya ve Kenya'dakilerden daha çok miktarda çeşitlilik ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Genetik farklılaşma katsayısı (GST) 0.202 bulunmuş olup bu popülasyonlar içinde yüksek derecede bir genetik çeşitlilik olduğunu göstermektedir. Genel olarak çay çeşitlerine bakıldığında genetik açılımların ortaya çıktığı görülmektedir. Bu açılımın da çapraz tozlaşmadan dolayı olduğu savunulmaktadır.

6. SONUÇ

Çay, Türkiye için önemli bir meyve türüdür. Dünya üzerinde ülkemizde kişi başına çay tüketimi 3.5 kg/kişi ile en fazladır. Ülkemize yetiştiriciliği çok uzun yıllara dayanmasa bile insanlarımız bu ürünü benimsemiş hatta milli içeceğimiz olarak ilan etmişlerdir. Bu türün yetiştiriciliği Artvin, Rize, Trabzon, Giresun, Ordu illerinde yapılmakta olup tüm bahçeler tohumla kurulmuştur. Ayrıca çay kalitesi ekolojik faktörler ve işleme teknolojisine göre değişmekle birlikte genotip çay kalitesinin belirlenmesinde önemli bir etkidir.

Çalışma, 24 farklı çay varyetesi ile gerçekleştirilmiştir. Genotipler ülkemizde çay yetiştiriciliği yapılan Artvin, Rize, Trabzon, Giresun ve Ordu illerinden çay bahçelerinden temsili olarak seçilmiştir. Her bir genotip için bir bitkiden alınan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar spektrofotometre ile okunmuş, agaroz jelde degradasyona uğramadıkları ve yeter kalitede oldukları belirlenmiştir. Çalışmada 54 farklı ISSR primeri kullanılmış ve primerlerden 15 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada çay yetiştirilen illerimizdeki genetik farklılık/benzerlik ortaya konmaya çalışılmıştır. Tohumla çoğaltılan çay genotiplerinin %62 oranda genetik olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. %38 oranında ki çay popülasyonunda farklılık belirlenmiş ve bu farklılık genetik açılamdan dolayı ortaya çıktığı bulunmuştur. Çalışmada kullanılan çay genotiplerinin benzerlik düzeylerinin 0.62-0.97 arasında değiştiği iki ana grupta toplandığı genetik olarak en uzak olan bireylerin Güneysu ve Pazar genotipleri olduğu, en yakın bireylerin ise İyidere ve Derepazarı olduğu belirlenmiştir. Çalışma bu yönü ile çeşit karmaşasınıda ortaya çıkarmış olmaktadır.

Sonuç olarak çalışmada kullanılan 15 adet ISSR primerlerinin çayda, genotipik tanımlamada ve genotipler arası genetik yakınlık ve uzaklığın belirlenmesinde etkili bir moleküler yöntem olduğu doğrulanmıştır.

Piyasada farklı firmaların ya da yörelerin çayının daha kaliteli olduğu fikrinin tamamen genotipten kaynaklanmadığı, bunun yanında çayın yetiştiği ekolojinin iklim

ve toprak özelliklerin yanında işleme teknolojisinde etkili olduğu ön plana çıkmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Anonim, (2015). Çayın öyküsü. Yeditepe Sağlık Hizmetleri A.Ş-Çay Tarımı, Rize.
- Anonim, (2016). Çay sektörü raporu. Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Rize.
- Anonim, (2018). Çay tarım ürünleri piyasaları. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Ürün No:04, Rize.
- Atalmış, F. (2007). Ege Bölgesi'nde yetişen kavun çeşitlerinin morfolojik ve ISSR DNA markörler kullanılarak tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, İzmir.
- Atgüden, C. (2016). Türkiye' de doğal olarak yayılış gösteren ankyropetalum fenzi (*Caryophyllaceae*) taksonları arasındaki akrabalık ilişkilerinin ISSR yöntemi ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
- Baghizadeh, A., Noroozi, S., & Javaran, M. J. (2010). Study on genetic diversity of some Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD), INTER sequence repeat (ISSR) and simple sequence repeat (SSR) markers: a comparative study. *African Journal of Biotechnology*, 9(45), 7632-7640.
- Ben-Ying L., You-Yong L., Yi-Chun T., Li- Yuan W., Hao C., & 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.
- Carrasco, B., Diaz, C., Moya, M., Gebauer, M., & Garcia-Gonzalez, R. (2012) Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers. *Ciencia e Investigacion AGRARIA*, 39(3), 533-543.
- Çeker, A. (2008). Türkiye'nin bazı bölgelerinden toplanmış nohut genotiplerinin moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Demirel, F. (2013). Kastamonu'ndan toplanan diploid (*T. monococcum*) ve tetraploid (*T. dicoccum*) kavuzlu buğday köy çeşitlerinin moleküler ve morfolojik tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Bölümü, Anabilim Dalı, Kayseri.
- Doğan, Y. (2006). Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) çeşit ve genotiplerinin moleküler markör teknikleri ile karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Erdoğan, V., Aygün, A., Şan, B., Koltarla, A., Güneş, N., & Dumanoglu, H. (2007). 'Ankara' armudu (*Pyrus communis* L.) klonlarının RAPD tekniği ile moleküler analizi. Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Bildiriler Kitabı, 1: 56-59.

- Esselman, E. J., Jianqiang, L., Crawford, D. J., Windus, J. L., & Wolfe, A. D. (1999). Clonal diversity in the rare *calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 8, 443-451.
- Hiloğlu, M. (2012). Türkiyede yayiliş gösteren petrorhagia türleri arasındaki genetik akrabalığın moleküler belirteçlerle tespit edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Ji, P. Z., Li, H., Gao, L. Z., Zhang, J., Cheng, Z. Q., & Huang, X. Q. (2011). ISSR diversity and genetic differentiation of ancient tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) plantations from china: implications for precious tea germplasm conservation. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1), 281-291.
- Kafkas, S., Ercisli, S., Doğan, Y., Ertrk, Y., Haznedar, H., & Sekban, R. (2009). Polymorphism and genetic relationships among tea genotypes from turkey revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(4):428-434.
- Kafkas, S., Ozkan, H., A. K. B. E., Acar, I., Atlı, H. S., & Koyuncu, S. (2006). Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. *Journal Of The American Society For Horticultural Science*, 131 (4),522-529.
- Kafkas, S., & Karadut, . (2013). Antepfistiğı SSR lokuslarından yeni ISSR primerlerinin geliştirilmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 29-2, 139-148.
- Kaç, M. (2013). ay varyetelerinin ISSR markörleri ile tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Rize.
- Lai, J. A., Yang, W. C., & Hsiao, J. Y. (2001). An assessment of genetic relationships incultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Botanical Bulletin-Academia Sinica*, 42:93-100.
- Liu, B., Sun, X., Wang, Y., Li, Y., Cheng, H., Xiong C., & Wang P. (2012). Genetic Diversity and Molecular Discrimination of Wild Tea Plants from Yunnan Province Based on Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) Markers. *African Journal of Biotechnology* .11 (53), 11566-11574.
- Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597-602.

- Najafzadeh, R., Arzani, K., Bouzari, N., & Saei, A. (2014). Genetic diversity assessment and identification of new sour cherry genotypes using intersimple sequence repeat markers. *International Journal of Biodiversity, Article ID 308398*, 1-8.
- Noroozi, A., Mokhtar, J. J., Baghizadeh, M. (2009). The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation*, 9, 1308-8084.
- Parsons, B. J., Newbury, H. J., Jackson, M. T., & Ford-Lloyd, B. V. (1997). Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Molecular Breeding*, 3, 115-125.
- Pazouki, L., Mardi, M., Shanjani, P. S., Hagidimitriou, M., Pirseyedi, S. M., Naghavi, M. R., Avanzato, D., Vendramin, E., Kafkas, S., Ghareyazie, B., Ghaffari, M. R., & Nekoui, S. M. K. (2009). Genetic diversity and relationships among *pistacia* species and cultivars. *Conserv Genet*, 11, 311-318.
- Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leshe, C., & Mcgranahan, G. (2002). Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*juglans regia*) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127 (1), 75-81.
- Roy, S. C., & 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*, 8, 370-376.
- Süzek, S. (2017). Türkiye'ye çay'i getiren mühendis: Zihni Derin, *Magazine Dergisi*, 5. Sayı.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., & Bonierbale, M. W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for old science. *Bio/technology*, 7, 257-264.
- Tanksley, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 3-8.
- Thomas, J., Vijayan, D., Joshi, S. D., Lopez, S. J., & Kumar, R. R. (2002). Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* L. O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats. *Plant Physiology and Biotechnology*, 123 (2), 54-149.
- Türkeli, Y. (2010). *Pistacia vera* L. X *Pistacia atlantica* Desf. Melez populasyonunda genetik haritalama. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.

- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Yang, W., Oliveira, A. C., Godwin, I., Scheritz, K., & Bennetzen, J. L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghums. *International Journal of Crop Science and Technology*, 36, 1669-1676.
- Yao M. Z, Chen L., & 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.
- Yılmaz, K. U., Ercişli, S., Asma, B. M., Doğan, Y., & Kafkas, S. (2009). Genetic relatedness in prunus genus revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Horticultural Science*, 44(2), 293-297.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E., & Tunur Erkoyuncu, M. (2015). Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4 (2), 1-12.
- Zhebentyayeva, T. N., Reighard, G. L., Gorina, V. M., & Abbott, A. G. (2003). Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 435 – 444.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, J. A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Burçin YOĞURTCU
Doğum Yeri	Pazar
Doğum Tarihi	11.11.1993
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05434187023
E-Posta Adresi	burcin.ygrtc53@gmail.com
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	ORDU ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	ZİRAAT FAKÜLTESİ
Bölümü	Bahçe Bitkileri
Mezuniyet Yılı	16.05.2016
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	

