

Basit (Sekans) Baz Dizilimi Arası Tekrarlamaları Yoluyla Ortaya Çıkarılan (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) Çay'da ki Somaklonal Değişkenlerin Genetik Bütünlüğü

Jibu Thomas, Deepu Vijayan, Sarvottam D. Joshi, S. Joseph Lopez, R. Raj Kumar
Bitki Fizyolojisi ve Biyoteknolojisi, UPASI Çay Araştırma Enstitüsü, Nirar Dam BPO,
Valparai, Coimbatore District, Tamil Nadu 642 127, (2002) Hindistan.

Özet

Somatik embriyodan türeyen çay bitkilerinin genetik değişkenliğini analiz etmek için **Basit (Sekans) Baz Dizilimi Arası Tekrarlamalar (ISSR)**'in benimsenmesi değerlendirildi. Tarlada büyüyen bitkilerin morfolojik karakterizasyonu, UPASI-10 ebeveyni ile özdeş karakter düzeninde olmadığını ortaya çıkardı. 40 primer'in dışında, rastlantısal polimorfizm gösteren 15 tanesi araştırma için seçildi. **Tek hat kotiledon kültüründen** elde edilen somaklonların genetik bütünlüğü; %33.0'den %55'e kadar sıralanmaktaydı. 0,6 kb'lik uzunluğun altında kalan fragmentler değişkenlerin sadece %50'si içinde dikkat çekerken, aksasyonların çoğunda 1,2 kb'lik tek fragment görüldü. Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak incelenen 120 interaksiyonun dışında sadece, somaklonların %9.2'si genetik düzeyde önemli bir benzerlik göstermişti. Yalın uyum katsayısına dayalı olarak yapılan dendrogram da ki son kümeler arasında 2.257 – 3,317'lik bir mesafe ortaya çıktı. Bu, somaklonlar arasındaki geniş genetik varyasyonun varlığını güçlendirmiştir.

Takdim

Güney Hindistan Çay (*Camellia* spp.) germplazmı, türler arası ve içi doğal hibridizasyonlara dayalı niteliklerin oluşturduğu, doğal genetik varyasyonlarıyla tanınır (Saravanan et al.,2005).

Belirli spesifik karakterdeki elit bitkiler, çok geniş germplazm kaynakları altındaki dar dönüşüm içinde vejetatif olarak çoğaltılan ve ticari olarak kullanılan klonlardır. Son yıllarda, spesifik karakterli germplazmları korumak ve genetik havuzu genişletmek için geleneksel ıslah programlarının yanı sıra, çay'da somatik hibridizasyonda denenmektedir (Plain et al.,1991). Somatik dokulardan yeniden üretilen bitkilerde somaklonal varyasyon oluşur ve morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik karakter için gözlemlenir. Bu prototipler ticari olarak kullanılmamasına rağmen önemli bir gen havuzu sağlar ki bu, yaygın varyeteler arasında ve varyantlar içinde ki genetik ilişki sonucu türler arası gen geçişi yoluyla oluşan somatik embriyogenesis sonucudur ve gen transfer tekniğiyle karşılaştırıldığında oldukça yapılabilir ve daha ekonomiktir.

Somaklonal değişkenler üzerindeki farklı çalışmalar, küçük bir bitki popülasyonunda göze çarpan morfolojik varyasyonlar ile daha çok fizyolojik/biyokimyasal araçlar kullanılarak yapılmaktadır (Raj Kumar et al.,2001). **Zaten, zahmetli ve zaman alıcı bir işlem olan geleneksel seleksiyon metodunda, ön görülen bir zaman çerçevesi içinde elit prototipi tanımlamak için alternatif bir yol aranmaktaydı.** Biyoteknoloji çağında; AFLP, RAPD ve ISSR gibi moleküler markörler, mevcut çay germplazmının karakteristik özelliklerini analiz etmek için kullanıldı ki bunlar, gözlemlenen genetik farklılıkların olası dizilimini de sunar (Devarumath et al.,2002; Balasaravanan et al.,2003). Diğer tarım ürünleriyle karşılaştırıldığın da Güney Hindistan çay germplazmındaki genetik farklılık araştırmalarında DNA tabanlı markör sisteminin kullanımı sınırlıdır. O nedenle, çok düşük düzeyde morfolojik varyasyon gösteren somaklonlarda ISSR tekniği, farklılaşmayı güç ayırt edebilen diğer moleküler markör araçlarından, genetik farklılığı analiz etmek için kullanımda daha avantajlıdır (Rostiana et al.,1999).

ISSR, sıralanmaları yanlardan (sağ ve sol) yüksek derecede korunmuş olan ve tek parça gen içinde dağılmış olan kimi nükleotidlerin ikili dizi tekrarlarına dayalıdır (Chambers ve MacAvay,2002). Mikrosatellitlerin bazı tiplerinde spesifik veya daha çok belirli bir bitki grubu için

uygun olduğu görülmüştür (Morgente ve Vogel,1994). Bu markör sisteminin avantajları; genetik değişkenliklerin incelenmesi için diğer bir çok moleküler markör sisteminden teknik olarak daha basit ve ayrıca in vitro kültürün ön aşamalarında bile bol polimorfizm doğuran, çoğaltılabilir sonuçlar sağlamasıdır (Tsumura et al.,1996). Ayrıca, varyete tanımlaması ve genetik farklılığın değerlendirilmesinde filogenik araştırmalar içinde uygun olduğu görülmüştür (Jain et al.,1999; rain et al.,2001).

Jha et al.(1992)'nin somatik embriyodan türeyen çay bitkilerinin **chroma-somal** araştırmalarına rağmen, somatik embriyodan türetilen Camellia bitkilerinin genetik bütünlüğü üzerine markör incelemeleri rapor edilmemiştir.

Bu bağlamda, bu araştırmada Zietkiewicz et al.(1994) ve Wolfe et al.(1998) tarafından açıklanan ve geliştirilen ISSR tekniği kullanılarak somaklonlar arasında var olan genetik değişkenliği belirlemek amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitkisel Materyal

Özellikle “Çin” hibrid klonu UPASI-10'un **kotiledon dokularından elde edilen somatik embriyoid**lerin işlevselliğini referans alan in vitro çalışmalarda ; çimlenme ve başarılı tarla transferleri Hindistan, Tamil Nadu Anamallais'de yerleşik Güney Hindistan Çay Araştırma Enstitüsü (UPASI) tarafından Birleşik Ekiciler Birlięi'nde 1997 ve 2001 arasında gerçekleştirilmiştir (Raj Kumar,2001). Tüm yetiştirme uygulamaları, UPASI'nın önerdiği standartlara uygun olarak yapılmıştır (Hudson et al.,2002).

2.2. Morfolojik Karakterizasyon

Benzer morfolojik değişkenleri karşılaştırmak için Yeni Delhi (NBPGR) Bureau Ulusal Bitki Genetik Kaynakları'na göre ; renk, tekstür, damar düzeni, testere dişli olma ve yaprak ucu ile yaprak açısı gibi yaprak karakteristikleri incelendi.

2.3. Moleküler Karakterizasyon

2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Yaprak örnekleri dikimden 3 yıl sonra, 15 tarlada büyüyen somaklonal varyantların tümünden toplandı. Genomik DNA, Kabayashi et al (1998)'in modifiye edilmiş protokolü kullanılarak **cteryltrimethyl ammonium bromide (CTAB)** ile ekstrakte edildi. Elde edilen DNA kütlesi %70'lik etanol ile üç kez yıkandı, vakumda kurutuldu ve 100 µl'lik TE tamponu (10 mM Tris-HCL ve 1 mM EDTA(pH:8.0)) içerisinde çözüldü. Sonra 5µl RNaseA (10 mg/ml) ile muamele edilerek, (%0.8) **agaroze jel elektroforezi** ve **spektrometre** (Genosys 10UV, USA) ile kantitatif ve kalitatif olarak kontrol edildi. Absorbans oranı 260 ve 280 nm aralığında hesaplandı ve genomik DNA kalitesi de doğrulandı. Örnek son olarak, sonraki genetik analizler için 4 °C'de depolandı.

2.3.2. ISSR Analizi

ISSR primerleri (Sigma Genosys, USA), 40.0-55.0'lık Tm değeri aralığı ile temel dizilim olan (GA-GT-CT ve GTC) di- ve tri- nükleotit tekrarlamalarına dayalı olarak sentezlendi. Eleme, 40 primerle yapıldı. Net bir bant deseni veren 15 primer, doğrulama çalışmaları için kullanıldı. Nükleotitlerin seçimi, çay genomu içindeki oransal miktarlarının bulunabilirliğine dayalıydı (Mondal,2002). Her biri 0.1 mM dNTP içeren reaksiyon karışımına 150 nM primer, PCR ana karışımına (MBI Fermantas, USA) 50 ng DNA ve enzim ilave edilmiştir. DNA'sız reaksiyon karışımı negatif kontrol olarak işlev görmüştür. Amplifikasyon, programlanabilir bir termo karıştırmacı PTC 200 (MS Research, USA)'da yapılmıştır.

Amplifikasyon protokolü; ilk denaturasyon için 94 °C'de 4 dakika ardından, 94 °C'de denaturasyonlar için 40 saniyelik art arda 42 dönüş, seçilen primerin kendi Tm değerinde 2 dakika süreyle tavlama ve 1.45 dakika süreyle 72 °C'de uzatma (boylama). Bu son uzatma, 72 °C'de 8 dakika süreyle yapılır.

Amplikonlar, sürekli tampon (1000 ml destile su içinde; 2.0 ml EDTA(0.5M ve pH:8.0) ve 1.14 ml galcial asetik asit, 4.84 gr TRIS baz) 1xTAE ile 75 V'luk sabit bir sıcaklıkta 3 saat süreyle %1.4 agarose jel elektroforez üzerinde ayrıştırma yoluyla test edildi. Sonuç olarak jel, (0.5 µg/ml) ethidium bromide ile renklendirilerek ultraviyole ışın altında görüntülendi ve kayıt edildi. Analiz, seçilen her bir primer ile en az üç kez tüm örnekler için tekrarlandı.

2.3.3 Veri Analizi

Taranan (basılan) jel görüntüsü, fragment uzunluk kalibrasyonları için Total Lab. Version 3.1 (Amersham Bioscience, USA) özel yazılımı kullanılarak analiz edildi. Amplifiye edilen fragmentler, mevcutlu (1) ve mevcutsuz (0) bant için elle işaretlendi. Polimorfik zon'u bulmak için her bir primerin karakterize etme kabiliyetini, polimorfizm yüzdesini bulmak içinde her bir primer reaksiyonunda ortaya çıkan polimorfik bant miktarının toplam bant miktarına oranı hesaplandı. İkili veriden varyantlar arası özdeş katsayı değerleri, Nei's hesaplaması ile bir varyant'tan diğerinde bulunabilecek amplifiye edilebilir fragment varlığına dayalı olarak türetildi (Nei ve Li, 1979). Varyantlar arasındaki ilişkiye dayalı benzerlik, NTSYS-Pc Version 2.0 SAHN küme analizi kullanılarak aritmetik ortalama logaritması ile tartılmamış çift grup metodu (UPGNA) uygulanarak geliştirilen dendrogram formunda sunuldu (Rohlf, 1992). Başlıca bileşen analizi (PCO), Windows için Sosyal Bilimler (SPSS) Version 7.5 istatistik paketi kullanılarak yapıldı. PCO'nun ilk iki bileşeni, varyantlar arasındaki ilişkiyi belirlemek için çizilen grafikte kullanıldı.

3. Sonuçlar ve Tartışma

SE5, SE13 ve SE14 varyantları hariç diğer tümü UPASI-10 bitki kaynağına benzeyen pürüzsüz damar deseni ile eliptik yaprak şeklinde olup çok az sayıda bir varyant soluk sarımsı yeşil yapraklara sahipti (**Tablo 1**). SE13 hariç, diğer tüm varyantlar sivri yaprak ucu ve çoğunlukla yatay yaprak duruşuna sahipti. SE15 hariç diğer tüm varyantların yaprakları yakın/çift testere dişliydi. Varyantların çoğu yaprak boyutu olarak orta yaprak boyutuna uygun ve sadece bir varyant (SE7) küçük yapraklara sahipti. Tüm durumlarda, olgun yaprak tekstürünün kırılğan olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1: UPASI-10 klonundan türeyen somaklonal varyantların yaprak karakteristiklerindeki morfolojik varyasyonlar

Variant number	Leaf characteristics						
	Colour	Shape	Venation	Tip	Posture	Serration	Size (cm ²) ^a
SE1	Yellowish	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE2	Yellowish	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE3	Yellowish	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE4	Yellowish	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE5	Dark	Eliptic	Smooth	Acute	Semiect	Distant	>50
SE6	Pale	Eliptic	Smooth	Acute	Semiect	Close	35–50
SE7	Yellowish	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	<25
SE8	Pale	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE9	Pale	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE10	Pale	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	35–50
SE11	Pale	Ovate	Rugose	Acute	Horizontal	Close	>50
SE12	Yellowish	Eliptic	Rugose	Acute	Semiect	Close	35–50
SE13	Dark	Ovate	Rugose	Blunt	Semiect	Close	>50
SE14	Dark	Eliptic	Smooth	Acute	Erect	Close	>50
SE15	Pale	Ovate	Rugose	Acute	Semiect	Close	>50
UP-10	Dark	Eliptic	Smooth	Blunt	Erect	Distant	>50

^a <25 (small); 35–50 (medium); >50 (large).

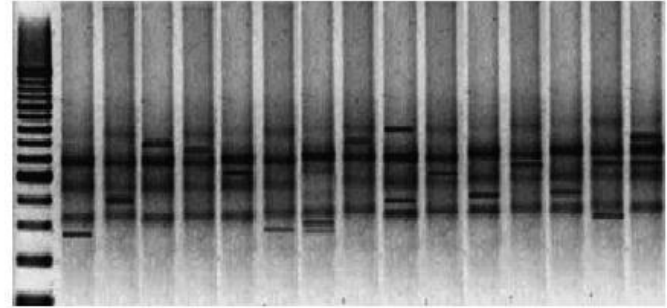
Varyantlar UPASI-10 Çin hibridinden türemiş olmasına rağmen çok az sayıdaki varyant Çin karakteristiklerine (eliptik, koyu yeşil, pürüzsüz, dik-yarı dik, küçük/orta boyutlu yaprak) sahipken diğerleri Assam karakteristikleri (geniş/oval, mat sarımsı yeşil, buruşuk (kırımlı), yatay, orta-büyük yaprak) göstermiştir. Bununla birlikte, ebeveyn ile tümüyle benzer morfolojik karakterler gösteren varyant mevcut değildi. Hem Assam hemde Çin karakteristiklerine sahip olan varyantlar kendi grupları içinde kategorize edilemedi.

Bu çalışmada test edilen primerler arasında 15 primer, polimorfik amplifikasyonda oluşan yan yana dizilenebilen PCR ürünleriyle (Tablo 2) seçildi. **Amplifiye olan polimorfik fragmentlerin boyu 150'den 1200 bp'ye kadar sıralanmaktadır (şekil 1). Sonuçlardan görüldüğü üzere ISSR, genotip tanımlamada yüksek çözünürlüğe sahiptir ve bu Yang et al. (1996) ve Esselman et al.(1996)2ın bulgularıyla da doğrulanmıştır.** Somaklonların morfolojik varyasyonlarına rağmen yaklaşık olarak ortalama %50 polimorfizm gösteren bu primerlerin bant desenleri kayda değer değildi (Tablo 2). Barnet ve Branchard (2001) tarafından rapor edildiği üzere ISSR, amplifikasyonlarının spesifikliği ve çoğaltılabilirliği reaksiyon planlandığında dikkate alındı. Amplifiye edilen 1.2 ve 0.65 kb'lik fragmentler çalışılan tüm aksesyonlarda hemen hemen mevcutken sadece SE7 varyantı 0.5 kb'de sıralanmıştı.

Tablo 2: Kullanılan ISSR Primerlerinin detayları ve analizleri yoluyla ortaya çıkarılan polimorfizm.

Code	Sequence	Polymorphism (%)
SGIP1	GAGAGAGAGAGAGAT	78.0
SGIP2	GAGAGAGAGAGAGYG	68.0
SGIP3	GAGAGAGAGAGAGARGY	62.0
SGIP4	GAGAGAGAGAGAGARGY	60.5
SGIP6	GAGAGAGAGAGAGAC	65.0
SGIP7	ACACACACACACACYT	50.0
SGIP8	ACACACACACACACYG	50.0
SGIP10	GTGTGTGTGTGTGTYR	45.0
SGIP14	CACACACACACAAC	33.0
SGIP15	CACACACACACAGT	30.5
SGIP16	CACACACACACAAG	38.0
SGIP17	CACACACACACAGG	40.0
SGIP18	GAGAGAGAGAGAGG	65.0
SGIP20	GAGAGAGAGAGACC	60.5
SGIP23	GAGAGAGAGAGGC	62.0

where $R = A + G$ and $Y = C + T$.



Şekil 1: SGIP3 primeri kullanılarak amplifiye edilen DNA'nın elektroforetik deseni. (Solda ki) ilk şerit 1-200 bp'lik ana hat (ana skala) (MBI Fermentas, USA), 2-14.Şerit: SE1-SE15 örnekler.

Pearson's korelasyon katsayısının ortaya koyduğu matris; SE1, %1 olasılıkla SE2,SE6 ve SE9'la önemli bir benzerliğe sahipken %5 düzeyinde SE4 ve SE6 ile önemli bir ilişkiye sahiptir. Benzer eğilim SE9 ve SE13 arasında gözlemlenirken SE8 ve SE10 çok yüksek katsayı değeri gösterdi (1.00) ki o, %1 olasılıkla önemliydi. İncelenmiş olan 120 interaksiyonun haricinde sadece %9.2'si moleküler düzeyde önemli benzerlik ortaya koydu. Bu somaklonal bitkiler arasında geniş genetik varyasyonun varlığını güçlendirir.

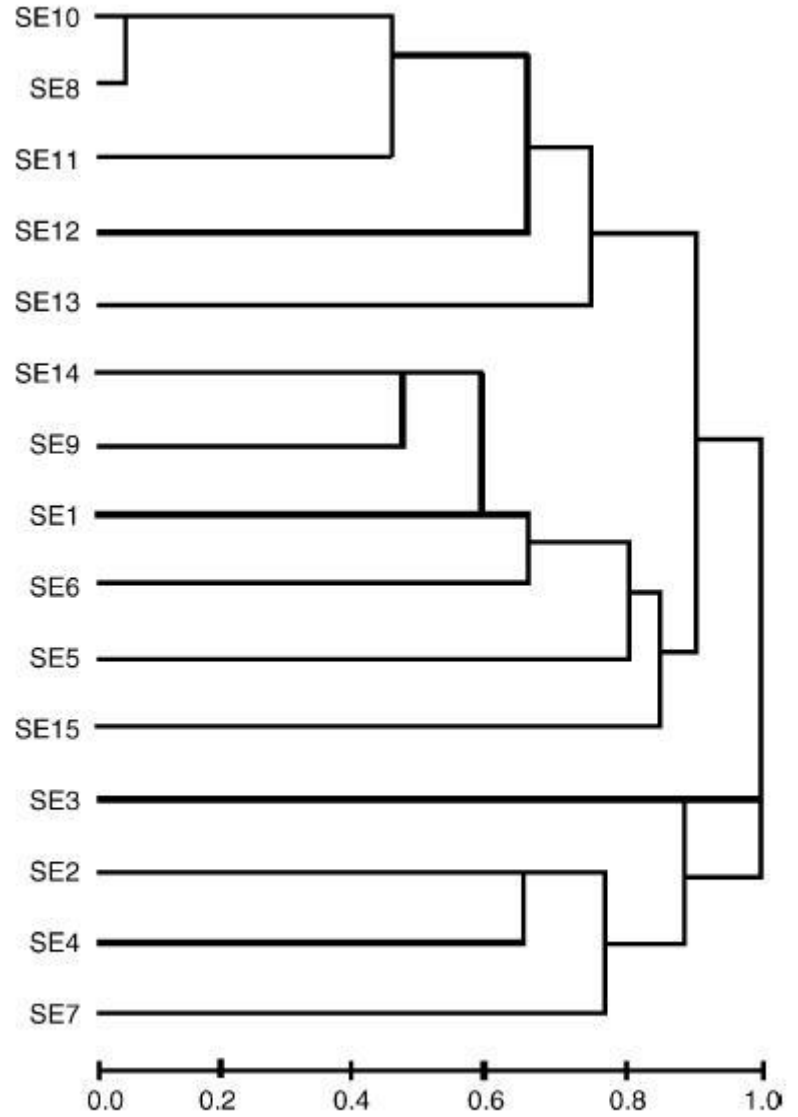
Dendrogram, yoğunlukları dikkate alınmadan bantların mevcutlu veya mevcutsuz luğuna göre basit katsayı eşleştirmesine dayalı olarak yapıldı. Kümeler içindeki benzer bireyler hiyerarşik küme yoluyla analiz edildi ve başlıca bileşen analizinde üç farklı grup içinde 15 aksesyona ayrıldı. **Son küme merkezleri arasındaki uzaklık 2.257'den 3.317'ye kadar değişmektedir.** Dendrogram; gruplar arasındaki bağlantı ve bireyler arasındaki genetik ilişki hakkında bir fikir sağlar (Şekil 2).

Daha önceleri, germplazm kaynakları arasındaki farklılık morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyon kullanılarak gösterilmekteydi.

Aseksüel üremeye rağmen, somatik embriyogenesis genetik gelişim içinde seleksiyonu sağlayan morfolojik karakteristikler deki farklılıklara refakat eder (Raj Kumar et al.,2001).

Moleküler markörler genomik düzeyde varyasyonun tanımlanmasını sağlar (Bornet et al.,2003; Mondal ve Chand,2002) ve doku kültürü varyasyonlara neden olduğunda, genetik mutasyonu belirlemeye de olanak sağlar (Sanzhez-Teyar et al.,2003).

Çay'da AFLP kullanılarak moleküler markörlerin gelişimi ilk kez Rajsekaran (1997) tarafından denemişti. Bu çalışmada sadece küçük bir genetik farklılık bilgisi mevcut olduğunda bile, ISSR analizinin bitki türleri içindeki genetik varyasyonu ayırmanın ön değerlendirilmesi için kullanılabilir olduğu kanıtlandı. Bu, Devarumath et al. (2002)'nin bulguları ile de desteklendi.



Şekil 2:
Somaclonal varyantların hiyerarşik küme analizi

Bu araştırmanın sonuçları, rejenerasyonların doğal kalıtımı içindeki değişkenlikleri ve somaklonlardaki tek (benzersiz) moleküler markörleri doğruladı. Böylece, somaklonal varyantlarda göz önüne getirilerek (boyanarak) gözlenebilen genetik varyasyon, Güney Hindistan germplazmlarının benzersiz kalıtsallığına katkı sağlayan, genotiplerde stabillenen ve hücre ile hücre altı düzeyde oluşan kontrol dışı (istenmeyen) manipülasyonların olasılığına da bağlıdır. Somaclonal varyasyon hızlı gerçekleşmiş olsa bile, bir çok gene bağlılığından dolayı gerçeğini tespit etmek güçtür. Bu, bitki ıslahı için kullanılabilir. Somatik embriyogenesis; somatik embriyonun üretiminden çimlenmeye kadar optimum doğru sonuçlar için tatmin edici koşullar arasında güç algılanan interaksiyonlarda çoklu faktörler tarafından kontrol edilen bir işlemdir ki o, klon'dan klon'a farklı olup, eksplant gereksinimleri de farklıdır.

Genetik havuzun varlığını ortaya koyan çalışmalarda kullanılan sınırlı sayıdaki örnekle, üstün genotipler ile çevre arasındaki ilişkiyi tanımlamak için araştırma yapmak gereklidir. Değerlendirme yönteminde, istenilen tarımsal karakterleri sergileyen prototip, koruma ve ticari kullanım için gelecekteki ıslah programlarına entegre edilebilir. Tek (benzersiz) bölgelerin (kromozom üzerindeki) tanımlanmasında ISSR markörleri bir kaynak olarak hizmet ederler. Onlar, varyete tanımlama ve genetik bütünlüğü değerlendirmek için uygundur. Böylece elde edilen tek (benzersiz) fragmentler, markör destekli seleksiyon için Baz Dizilimi Belirlenmiş Çoğaltılan Bölge'lere (SCAR) dönüştürülebilir.

Teşekkür

Araştırmacılar, araştırma süresince sürekli destekleri için UPASI Çay Araştırma Kurumu Yöneticisi Dr. N.Muraleedharan'a müteşekkirdir. Alınan finansal destek içinde Hindistan Hükümeti Biyoteknoloji Bölümü (DBT)'ne teşekkürlerini sunar.

Kaynak : Jibu Thomas, Deepu Vijayan, Sarvottam D. Joshi, S. Joseph Lopez, R. Raj Kumar. 2002. [Genetic integrity of somaclonal variants in tea \(*Camellia sinensis* \(L.\) O Kuntze\) as revealed by inter simple sequence repeats](#). Plant Physiology and Biotechnology, UPASI Tea Research Institute, Nirar Dam BPO, Valparai, Coimbatore District, Tamil Nadu 642 127, India.

Tercüme: Kamil Engin İSLAMOĞLU, Ziraat Mühendisi, [E-Mail](#)