

## Çin'de Türler Arası Düzeyde Çay Germplazmlarını Ayırt Etmek İçin RAPD Markörleri

L. Chen ve S. Yamaguchi  
Çin Tarım Bilimleri Akademisi Çay Araştırma Enstitüsü  
Germplazm, Islah ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı  
Yunqi Yolu, Hangzhou, Zhejiang 310008, ÇİN.  
Plant Breeding 124, 404—409 (2005)

### Özet

Çin Ulusal Çay Germplazm Depolarında (CNGTR) korunan 20 yabancı tür ve onlarla akraba varyeteler (*Camellia sinensis*, *C. sinensis* var. *assamica*, *C. sinensis* var. *pubilimba*, *C. sinensis* var. *kucha*) ile dört çay türü, türler arası düzeyde çay germplazmlarının ayırımı için **Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Markerleri** kullanılarak (RAPD) incelendi. RAPD amplifikasyonlarına göre elenen (ayrılan) 61 tane içinden, 15 primer seçildi. **Türler arası düzeyde RAPD primerlerinin ortalama polimorfik DNA frekansları 0.16'dan 0.60'a kadar değişmekte olup 0.30 ile tür içindekinden daha düşüktü.** Bazen, tek (benzersiz) RAPD markerinin bulunmaması durumunda incelenen germplazmların 14'ünü ayırmayı olanaklı kılmıştır. 24 gerplazmın tümü, tek bir primerle ayrılabilir değildi. Bununla birlikte, zengin bir örnek deseni sunan OPO-13 ile 10 genotip ayırt edilebildi. İki ve üç primerin kombinasyonu sırasıyla; 15. ve 21. germplazmları ayırt etmeyi mümkün kılmıştı. Ayrıca, OPO-13, OPO-18, OPG-12 ve OPA-13 yoluyla üretilen spesifik RAPD markerlerine dayalı, DNA parmak izi veya örnek bant kombinasyonu incelenen 24 germplazmın tamamını ayırmayı sağlamıştı. Bu nedenle, RAPD markerleri, türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırmak için güçlü birer araçtır.

### Takdim

Çay, dünyadaki en popüler alkolsüz yumuşak içecektir. Çay bitkisi Theaceace, *Camellia* cinsi, *Thea* bölümüne aittir ve genel olarak bir tür, örneğin *Camellia sinensis*; *Camellia sinensis*, *C. sinensis* var. *assamica*, *C. sinensis* var. *pubilimba* (Chang 1981,1984, Ming 1992, Chen et al. 2000) ve kimi zamanda *C. sinensis* var. *kucha* (Chang 1981,1984) gibi iki veya üç varyete içerir. Güneybatı Çin, Yunnan eyaleti orijinli çay bitkileri (Hashimoto ve Takasi 1978, Yu 1986) bölgedeki en önemli ticari türler ve varyetelerdir. Çay germplazm larının hem türler arası hem de tür içi düzeydeki belirgin farklılıkları; koleksiyon, koruma, değerlendirme ve kullanım için kritik öneme sahiptir. Genetik arka planı anlamak, çay ıslah programlarının günümüzde ve uzun dönemde başarısı için ebeveynlerin seçimine büyük katkı sağlayacaktır.

Büyük miktarlardaki çay germplazmları ve onlarla akraba olan türler Çin, Japonya, Hindistan ve Kenya'da toplanmakta ve koruma altına alınmaktadır (Takeda 2000). **Çin Ulusal Çay Germplazm Depolarında (CNGTR)** 2003 yılı sonundan buyana yaklaşık olarak 2665 çay germplazm aksyonu koruma altına alınmıştır. Güneybatı Çin'den toplanan *Camellia*'ların önemli bir bölümü, 200'den fazlasını yabancı çaylardı (Yu ve Chen 2001). Türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırmak oldukça güç ve bir dereceye kadar yetersizdir. Çay bitkileri ve onlarla akraba türleri sınıflandırmak ve filojenik değerlendirmeler için; morfolojik karakterler (Sealy 1958, Chang 1981,1984, Ming 1992, Chen et al.,2000), başlıca kimyasal bileşenler (Du et al.,1990), esteraz isoenzimi (Lu et al.,1992) ve karyotip (Liang et al.,1994) kullanılmaktaydı. Bununla birlikte, bilim adamları çay germplazmlarını ayırmak için daha güvenilir ve etkin metotlar aramaktaydı.

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) (Williams et al.,1990)'nın bitki ayırma çalışmalarında oldukça yararlı olduğu ispatlanmıştı (Hu and Quiros 1991, Yang and Quiros 1993, Khasa and Dancik 1996, Sedra et al. 1998, Jia et al. 2000, Belaj et al. 2001, Conner and Wood 2001, Rajora and Rahman 2003). **Günümüzde RAPDs, genetik ilişkilerin incelenmesi için kullanılmaktadır (Wachira et al.**

al.,1995;1997): Ebeveynin tanımlanması (Tanaka et al.,2001), **genetik farklılık** (Kaundun et al., 2000 , Chen et al.,2005), **Thea bölümünün moleküler sistematigi** (Chen ve Yamaguchi, 2002) **ile birlikte çay bitkilerinin (Camellia sinensis) genetik haritalarının yapılması** (Hacket et al.2000). Bununla birlikte çay bitkileri ve onlarla akraba olan türler arasındaki farklılıkları ayırt etmek için spesifik DNA markerleri hala üstündür. Bu makalenin amacı, RAPD analizi kullanılarak Thea bölümü Camellia türü içindeki çay germplazmlarını türler arası düzeyde ayırmak için spesifik DNA markerlerinin üretimidir.

## Materyal ve Metot

**Bitkisel materyaller : Chang's taksonomik sistemine dayalı olarak (Chang 1981,1984) (Tablo 1) Thea bölümü Camellia türü içindeki 4 varyeteyi içeren ; C. sinensis (L.) O.Kuntze, C. sinensis var. assamica (Masters) Chang, C. sinensis var. pubilimba Chang, C. sinensis var. kucha Chang et Wang ve bunlarla akraba olan 20 türle, toplamda 24 çay germplazmı CNGTR'de halen korunmakta olup RAPD markerleri kullanılarak incelendi.** Bu bölümdeki 4 tür, bu türleri temsil etmektedir. 24 klonal germplazm bitkilerinin her birinden elde edilen taze yapraklar sırasıyla; TRI, Yunnan Tarım Bilimleri Akademisi (TRIYAAS) ve Çin tarım Bilimleri Akademisi Çay Araştırma Enstitüsü (TRICAAS)'de ki CNGTR'den toplanmıştır. Yapraklar, DNA örneklemesine kadar 10 saat süreyle -86 °C'de ki depolarda biriktirildi. Her bir DNA örneğine karşılık gelen bitki tipleri TRICAAS'de ki Çay Bitki Herbaryumu'nda (TEA) koruma altına alındı.

Tablo 1: Çay germplazm orijinleri, RAPD bant desenleri ve onların ayırma kapasiteleri

Number	Species and varieties	Origin	Voucher number	OPO -13	OPO -18	OPG -12	OPA -13	OPO -13	OPO-13 and OPO-18	OPO-13 and OPG-12	OPO-13 and OPO-18 and OPG-12	OPO-13 and OPO-18 and OPG-12 and OPA-13
1	<i>C. grandibracteata</i> Chang and Yu	Yunnan, China	MH76-1	A <sup>1</sup>	A	A	A	√ <sup>2</sup>	√	√	√	√
2	<i>C. tachangensis</i> F. C. Zhang	Yunnan, China	MH731-1	B	B	B	B	√	√	√	√	√
3	<i>C. kwangnanica</i> Chang and Chen	Yunnan, China	MH734-1	C	B	A	B	√	√	√	√	√
4	<i>C. taliensis</i> (W.W.Smith) Melchior	Yunnan, China	MH129-1	D	A	C	B	√	√	√	√	√
5	<i>C. irrawadiensis</i> Barua	Yunnan, China	MH 614-2	E	B	C	C	√	√	√	√	√
6	<i>C. crassicolumna</i> Chang	Yunnan, China	MH728(Z)	F	A	A	B	√	√	√	√	√
7	<i>C. crispula</i> Chang	Yunnan, China	MH727(Z)	G	C	A	B	√	√	√	√	√
8	<i>C. mukuanica</i> Chang and Tang	Yunnan, China	MH821	H	D	A	B	√	√	—	√	√
9	<i>C. rotundata</i> Chang and Yu	Yunnan, China	MH144-1	I	A	A	C	—	—	—	√	√
10	<i>C. atrothea</i> Chang and Wang	Yunnan, China	MH728	H	E	A	B	—	√	—	√	√
11	<i>C. gymnogynoides</i> Chang and Yu	Yunnan, China	MH732	J	A	A	B	√	√	√	√	√
12	<i>C. parvisepaloides</i> Chang and Wang	Yunnan, China	MH350-1	I	B	C	D	—	—	—	√	√
13	<i>C. dehangensis</i> Chang and Chen	Yunnan, China	MH113-1	I	D	D	B	—	√	√	√	√
14	<i>C. manglaensis</i> Chang and Tang	Yunnan, China	MH440-1	I	B	C	B	—	—	—	√	√
15	<i>C. sinensis</i> var. <i>kucha</i> Chang and Wang	Yunnan, China	MH129-1	I	B	A	C	—	—	—	√	√
16	<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> (Masters) Chang	Yunnan, China	MH244-1	K	A	A	B	√	√	√	√	√
17	<i>C. polyneura</i> Chang and Tang	Yunnan, China	MH630-1	I	B	C	C	—	—	—	—	√
18	<i>C. pubicosta</i> Merr.	Vietnam	MH864-1	I	A	C	B	—	—	—	√	√
19	<i>C. fangchengensis</i> Liang and Zhong	Guangxi, China	HZ612-1	L	B	C	B	—	√	√	√	√
20	<i>C. pubescens</i> Chang and Ye	Hunan, China	HZ433(S)	L	A	B	B	—	√	√	√	√
21	<i>C. yankiangcha</i> Chang and Wang	Yunnan, China	MH135-1	I	F	C	B	—	—	—	√	√
22	<i>C. sinensis</i> var. <i>pubilimba</i> Chang	Yunnan, China	MH127-1	I	F	E	B	—	—	√	√	√
23	<i>C. arborescens</i> Chang and Yu	Yunnan, China	MH714-2	I	A	F	B	—	—	√	√	√
24	<i>C. sinensis</i> (L.) O.Kuntze	Yunnan, China	MH143-1	N	B	C	B	√	√	√	√	√
Total				13	6	6	4	10	15	15	21	24

1,2,3 işaretleri her bir primer için bant desenini ifade eder

√ Primerler tarafından ayrılabilen germplazmlar

— Primerler tarafından ayrılamayan germplazmlar

**DNA izolasyonu :** Genomik DNA, modifiye edilmiş CTAB metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir (Doyle ve Doyle 1987). Konsantrasyon ve kalite, %0.7 agarose jel ayrımı yoluyla GENE QUANT II RNA/DNA hesaplayıcısı tarafından değerlendirilmiştir (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). DNA, stoklu çalışma için Steril MilliQ su ile 25 ng/μl'e kadar seyreltikten sonra -30°C'de depolanmıştır.

**Polimeraz zincir reaksiyonu: Kullanılan dört germplazm ; C. crassicolumna, C. parvisepaloides, C. pubicosta ve C. sinensis , 61 decamer oligo nükleotit primer'le (OPA,OPG ve OPO kit'i , Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA; Ready-To-Go primer 2, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) ayırt edildi.** Bunlardan 15'i daha sonra 24 germplazmın tümünü analiz etmek için kullanıldı. RAPD

reaksiyon karışımının bazı modifikasyonları orijinal protokole göre yapılmıştır (Operon Technologies Inc.) : 25 ng DNA örneği içeren 12.5 µl reaksiyon karışımı , 12.5 pmol primer , 1xTaq reaksiyon tamponu, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 birim Taq DNA polimeraz (Amersham Pharmacia Biotech Inc) ve her biri 0.4 mM'luk dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech Inc). Bunlar, bir RoboCycler içinde amplifiye edildi. Cycler gradient ısı 96 °C'ye programlanmış olup aşağıdaki gibidir ; 94 °C'de 5 dakikalık ilk dönüşün ardından 94 °C'de 1 dakikada 45, 36 °C'de 1 dakikada 45 ve 72 °C'de 2 dakikada 45 dönüş. Sonucu dönüşü takibinde 10 dakika süreyle 72 °C'de son inkübasyona bırakılır. Ayrılan (elenen) primerler için amplifikasyon, RAPD markerlerinin sürekliliğini ve çoğaltılabilirliğini kanıtlamak için benzer prosedürle iki veya üç kez bağımsız olarak yürütülmüştür.

**RAPD ürünlerinin görselliği ve elektroforez :** Her bir RAPD amplifikasyon örneğine 6x1 mikro litre tampon (%30 gliserol, %0.125 bromophenol blue, 20 mM Tris-HCl , pH=8.0) dolduruldu. Örnekler 3.5 saat süreyle 110 V'luk sabit bir voltajda 0.5xTBE tamponu (100 mM Tris-HCl, 89mM borik asit, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH=8.3) içinde %1.8 agarose jel elektroforezi yoluyla fraksiyonlarına ayrıştırıldı. Jel'ler 15–20 dakika süreyle 0.5 µg/ml Ethidium Bromide içinde bekletildikten sonra 1 saat süreyle destile su ile yıkandı. Jel, ultra vişyole ışık altında görüntülenmiş ve TOYOBO FAS III (TOYOBO Biochemicals, Osaka, Japan) kullanılarak fotoğraflanmıştır. Amplifiye edilen fragmentlerin boyutları, λ-EcoT 14 DNA ladder 'le (Takara Shuzo Co. Ltd., Tokyo, Japan) değerlendirildi.

**Veri kayıt ve analizi :** Her bir tam bandın, tek bir genetik lokusta ki dominant bir alleli temsil ettiği düşünülerek, 1 (mevcutlu) ve 0 (mevcutsuz) olarak kayıt edildi. Sadece belirgin, iyi tanımlanan ve kopyaları çoğaltılabilir olan bantlar, primerleri ve bant numaraları kullanılarak potansiyel DNA markerleri olarak kayıt edildi. Örneğin; OPO-13 primeri ilk markeri temsilen OPO-13(1) şeklinde. Her bir RAPD primerinin, polimorfik DNA nispi frekansı (türler ve varyetelerin polimorfik bantları = mevcutlu/tür ve varyetelerin toplan miktarı) Belaj et al., (2001)'in metodu kullanılarak hesaplanmıştır.

**Benzersiz (tek) spesifik RAPD markerleri, bant desenleri ve DNA parmakizi'de çay germplazmalarını türler arası düzeyde ayırt etmek için kullanılmıştır.**

## Sonuçlar

### Çay germplazmalarının genetik poliporfizmi

Elenmiş 61 tane içinden analiz için seçilen 15 informatif primer Tablo 2'de listelenmiştir. Toplamda 102 polimorfik bandın dışında 107 belirgin (tam) ve çoğaltılabilir ürün, %95.3'lük polimorfizme göre seçilen primerlerden çoğaltılmıştır (Chen ve Yanaguchi 2002). Polimorfik DNA nispi frekansı 0.04'den (incelenen 24 varyete veya türün sadece birinde bulunan polimorfik bant) 0.96'ya kadar (incelenen 24 varyete veya türün sadece birinde bulunmayan polimorfik bant) sıralanmıştır. Tek bir primer yoluyla çoğaltılan polimorfik DNA ortalama frekansı 0.16 (OPO-19)'dan 0.60 (OPG-15)'e kadar değişmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Seçilen primerlerin amplifikasyon sonuçları

Primer	Relative frequency of polymorphic bands
OPA-03	0.42 (0.08–0.96)
OPA-13	0.48 (0.17–0.79)
OPA-14	0.28 (0.05–0.83)
OPA-16	0.18 (0.04–0.29)
OPG-07	0.32 (0.08–0.79)
OPG-12	0.40 (0.08–0.96)
OPG-13	0.23 (0.08–0.5)
OPG-14	0.28 (0.04–0.63)
OPG-15	0.6 (0.13–0.96)
OPO-05	0.19 (0.08–0.25)
OPO-13	0.18 (0.04–0.46)
OPO-15	0.18 (0.08–0.46)
OPO-18	0.30 (0.04–0.92)
OPO-19	0.16 (0.04–0.54)
Ready-to-go primer 2	0.24 (0.08–0.5)
Average	0.3

Parantez içindeki sayılar, incelenen 24 germplazm içinde ki primerin minimum ve maksimum sıklığını ifade etmektedir.

## Türler arası düzeyde germplazmları ayırmak için spesifik markerler

Çeşitli bağımsız metotlar kullanılarak türler arası düzeyde bitki germplazmlarını ayırma imkanı veren değişkenlikler belirlenmiştir;

- Benzersiz (tek) RAPD markerleri
- Spesifik bant desenleri
- Farklı primerler tarafından üretilen bant desenlerinin kombinasyonu (Belaj et al.,2001).
- DNA parmak izi (Jia et al.,2000 , Conner ve Wood 2001)

### (a) Benzersiz (tek) RAPD markerleri:

Benzersiz (tek) RAPD markerleri yoluyla Çay germplazmlarını ayırmak için sağlanan veri Tablo 3'de sunulmuştur.	<b>Tablo 3: Türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırmak için kullanılan tek (benzersiz) markerler</b>		
	Discriminated germplasms	Unique marker	Criteria
<b>C. grandibracteata, C. irrawadiensis, C. crassicolumna, C. crispula, C. rotundata, C. atrothea, C. gymnogynoides, C. dehungensis, C. sinensis var. assamica, C. pubicosta, C. fangchengensis, C. yankiangcha, C. sinensis var. pubilimba, C. sinensis</b> gibi 14 germplazmın türler arası ayrılmasını olanaklı kılan 12 primerden, 3 adet mevcutsuz tek marker ve 16 adet mevcutlu tek marker elde edilmişti (Tablo 3). Sırasıyla ; Camellia grandibracteata, C. pubicosta ve C. sinensis var. pubilimba iki farklı spesifik DNA markerinin mevcudiyeti yoluyla ayrılabilir.	<i>C. grandibracteata</i>	OPO-13 (1), OPA-13 (1)	Presence
	<i>C. irrawadiensis</i>	OPG-14 (1)	Presence
	<i>C. crassicolumna</i>	OPG-07 (1)	Presence
	<i>C. crispula</i>	OPO-18 (1)	Presence
	<i>C. rotundata</i>	OPA-03 (3)	Absence
	<i>C. atrothea</i>	OPO-18 (5)	Presence
	<i>C. gymnogynoides</i>	OPO-19 (5)	Presence
	<i>C. dehungensis</i>	OPO-15 (1)	Presence
	<i>C. dehungensis</i>	OPG-12 (5)	Absence
	<i>C. sinensis var. assamica</i>	OPA-16 (10)	Presence
	<i>C. pubicosta</i>	Ready-to-go primer 2 (7), OPG-14 (10)	Presence
	<i>C. fangchengensis</i>	OPA-14 (6)	Presence
	<i>C. yankiangcha</i>	Ready-to-go primer 2 (6)	Presence
	<i>C. yankiangcha</i>	OPG-15 (2)	Absence
	<i>C. sinensis var. Pubilimba</i>	OPG-12 (3), OPO-19 (1)	Presence
	<i>C. sinensis</i>	OPA-16 (11)	Presence

Parentez içindeki sayılar, primeri'in bant numarasını ifade etmektedir.

Benzer şekilde sırasıyla; C. dehungensis ve C. yankiangcha tek spesifik DNA markerinin mevcudluluğu yoluyla ayrılabilir.

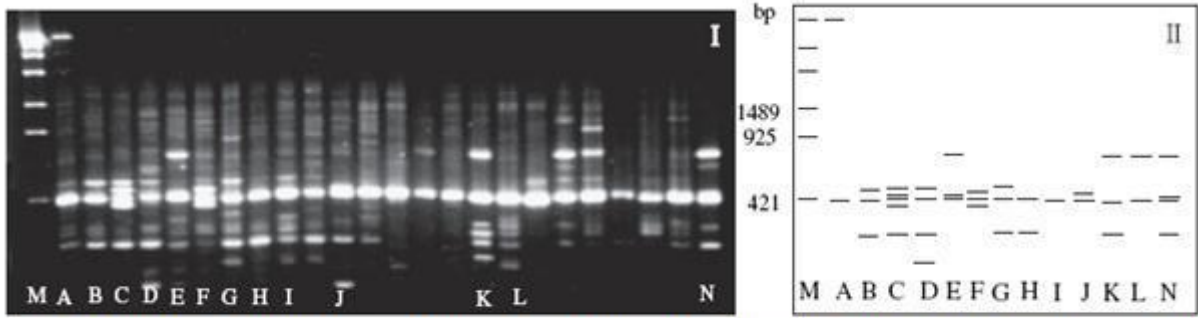
### (b)Spesifik bant desenleri yoluyla :

Bol miktarda örnek desenleri sağlayan bazı primerler germplazmların ayrılmasını olanaklı kılar. Örneğin: OPO-13; 10'u spesifik olan 13 bant deseni verir. Bu spesifik bant desenleri kullanılarak ; **C. grandibracteata, C. tachangensis, C. kwangnanica, C. taliensis, C. irrawadiensis, C. crassicolumna, C. crispula, C. gymnogynoides, C. sinensis var. assamica ve C. sinensis** gibi 10 çay germplazmı ayrılabilmiştir (Tablo 1, Şekil 1).

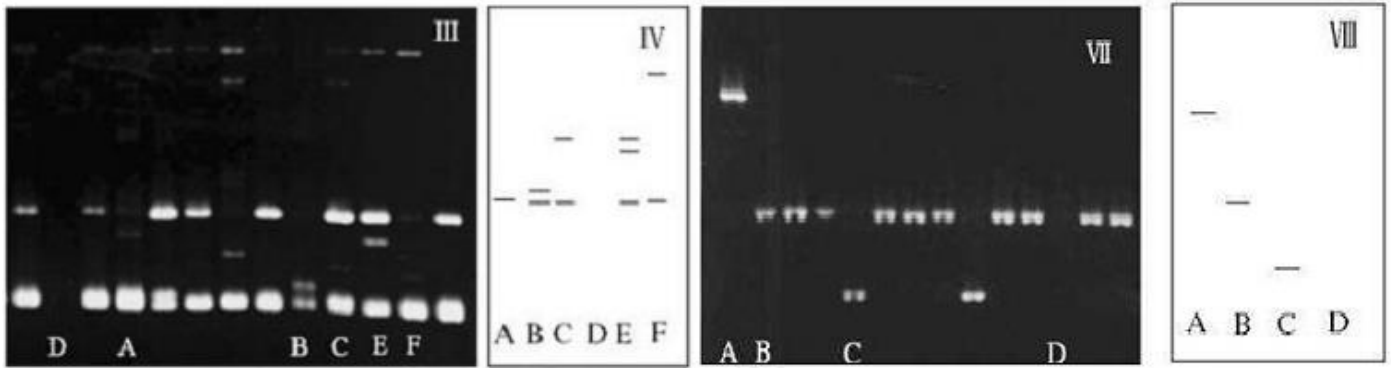
### (c) Farklı primerler tarafından üretilen bant desenlerinin kombinasyonu yoluyla:

24 germplazmın tümü tek bir primerle ayrılamaz. Bununla birlikte, farklı primerlerin bant deseni kombinasyonları onları ayırmak için güçlü bir metot sunar. Tüm germplazmları ayırmak için büyük kapasiteli primerleri, minimum miktarlarda saptamakla mümkün olmuştur. OPO-13 ve OPO-18 veya OPG-12 gibi iki primerin bant deseni kombinasyonu sırasıyla, 15 tür ve varyeteyi ayırabilir (Tablo 1). OPO-13, OPO-18 ve OPG12 gibi üç primerin kombinasyonu C. parvisepaloides, C. manglaensis ve C. polyneura hariç 24 çay germplazmının 21'ini ayırmayı olanaklı kılar (Tablo 1). Büyük miktarlarda bant

desenleri sağlayan OPO-13, OPO-18, OPG-12 ve OPA-13 gibi dört primerin kombinasyonu türler arası düzeyde incelenen 24 germplazmın tümünü ayırabilir (Tablo 1, Şekil 1-4).



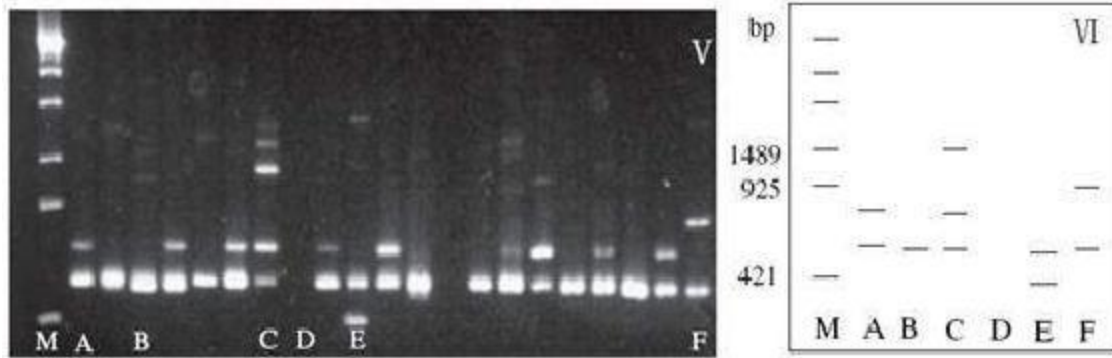
**Şekil 1:** OPO-13 (I ve II)'den üretilen bant desenlerinin şeması ve RAPD amplifikasyonu. Tabandaki harfler, bant desenlerini ifade etmektedir. I ve II'nin solundaki ilk şerit  $\lambda$ -EcoT 14 DNA makeridir.



**Şekil 2:** OPO-12 (III ve IV)'den üretilen bant desenlerinin şeması ve RAPD amplifikasyonu.

Tabandaki harfler, bant desenlerini ifade etmektedir

**Şekil 4:** OPO-13 (VII ve VIII)'den üretilen bant desenlerinin şeması ve RAPD amplifikasyonu.



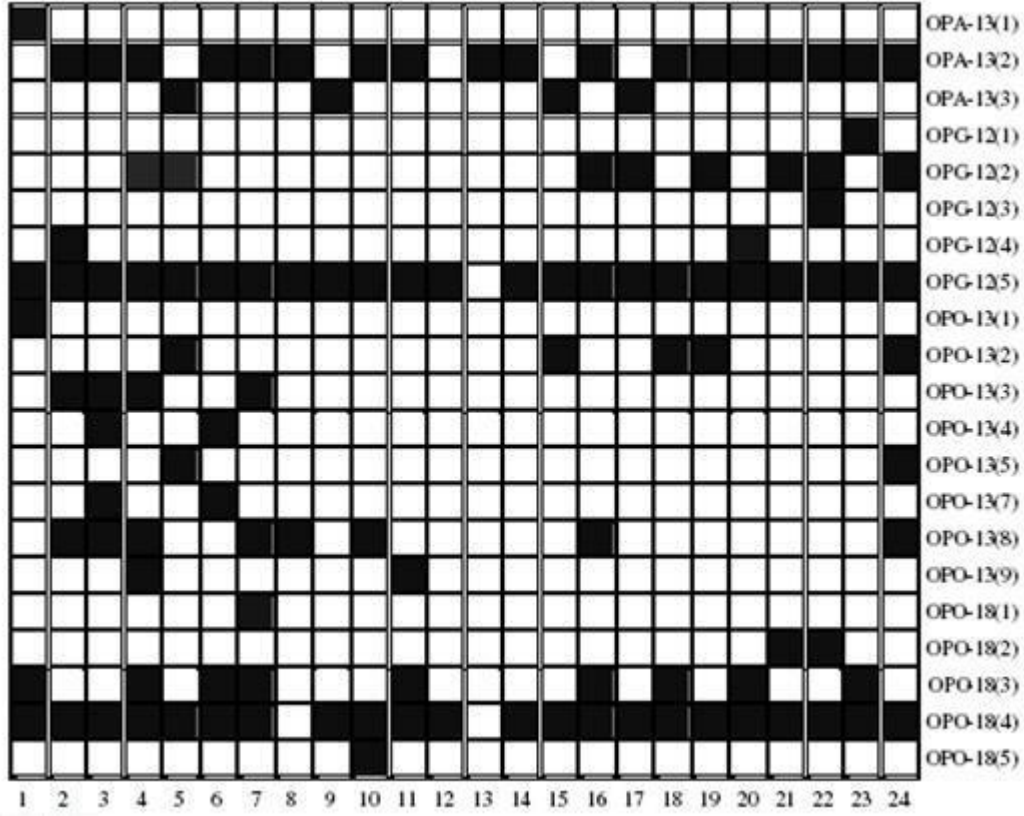
**Şekil 3:** OPO-18 (V ve VI)'den üretilen bant desenlerinin şeması ve RAPD amplifikasyonu

Tabandaki harfler, bant desenlerini ifade etmektedir.

V ve VI'nin solundaki **ilk şerit  $\lambda$ -EcoT 14 DNA makeridir.**

(d) DNA parmak izi yoluyla:

**102 polimorfik banttan potansiyel olarak güvenilir ve çoğaltılabilir 21 RAPD markeri, DNA parmak izi oluşturmak için seçildi (Şekil 5).** Bu bantlar sırayla; OPO-13, OPO-18, OPG-12 ve OPA-13'den elde edilmişti. DNA parmak izinde her bir tür ve varyete birini diğerinden kolaylıkla ayırabilecek benzersiz (tek) parmak izlerine sahiptir.



Şekil 5:

### RAPD markerlerine dayalı olarak 24 çay germplazmının DNA parmak izi

Alt çizgideki sayılar 24 germplazmın seri numaralarıdır (detaylar için Tablo 1'e bakınız).

Koyu renkli bloklar RAPD markerlerinin bulunma durumunu göstermektedir.

Sağ kenar üzerinde de ayırmak için kullanılan spesifik markerler gösterilmiştir.

### Tartışma

**İncelenen çay türleri ve varyeteleri, özellikle yabancılarıyla akraba olanlar çoğunlukla Yunnan eyaletinde ki (Tablo 1) orijinal çay plantasyon merkezinden toplanmış ve Çin, Sun Yat-Sen Üniversitesinde tanınmış bir Theaceae taksonomisti tarafından tespit edilmiştir (Chang 1981,1984). Onlar sırasıyla, TRIYAAS ve TRICAAS'de ki CNGTR'de korunmuş ex-situ ve çelik üretiminde kullanılan yerel tip içindeki örnek bitki tiplerinden doğrudan elde edilmiş yavru döllerdi.** Yabani türlerin çoğu, çok küçük popülasyonlara sahip olurken kimi zamanda bir tür içinde ki büyük bir bitkide olabilmektedir (Yu 1986). Thea bölümü içindeki türler arası genetik polimorfizm %94.2 ile önceden incelenmiş 15 çay varyetesiyle tutarlıydı (Chen et al.,2005). Thea bölümü içindeki türler ve varyeteler; bitki boyu, bitki şekli, yaprak boyu ve biçimi, özellikle çiçek ve tohum karakterlerinden geniş morfolojik varyasyonlar göstermişti. Onlar ; 5-15 petal'e, eril veya olmayan 3 veya 5 yumurtalığa, (2)3-5(7) iki bölmeli style, aksis merkezi farklı boyutlardaki düz veya yassı kapsüllere, kalın veya ince perikarp'a ve farklı türdeki tohum şekillerine sahipti (Chen at al., 2000). Bununla birlikte, çay bitkileri ve onlarla akraba türlerden seçilen 15 primer'in ortalama DNA polimorfik frekansı 0.24'den 0.83'e kadar değişen ve 0.47'ye karşılık gelen 15 çay varyetesiyle karşılaştırıldığında düşüktü (Chen at al.,2005). Olası nedenlerinden biri, dar bir coğrafik dağılım ve küçük bir popülasyon oluşturan yabani türler arasında meydana gelen daha az **introgressive hibridizasyon (geriletici hibridizasyon)**'dur. Aksine uzun süreli allogamy ve yarı uyumsuzlıkla yetişen çay bitkilerinde yüksek heterojenik ve sonuçta geniş genetik varyasyon ortaya çıkar (Chen et al.,2005). Camellia cinsi içinde, türler arası polen morfolojisi farklılığındaki diğer benzerlikler, çay bitkilerinde tür içi farklılıklardan daha dardı (Chen et al.,1997)

Önceden, çay bitkileri ve yabancılarıyla akraba olan türlerini ayırmak için ; morfolojik karakterler (Sealy 1958, Chen 1981,1984, Ming 1992, Chen et al.2000), kimyasal bileşenler (Du et al.1990), esteraz isoenzimi (Lu et al.1992) ve karyotip (Liang et al.1994) kullanılmıştı. Bununla birlikte bunların; büyüme ortamının, gelişme aşamalarının, mevsimlerin ve hatta deneme koşullarının farklılığından dolayı çoğaltıla bilir olmadıkları tespit edildi. Hem türler arası hem de tür içi düzeylerde germplazmları ayırmak için RAPD markerlerinin bir çok başarılı örnek vardır. DNA parmak izi analizleri de ayrıca, türler arası düzeyde germplazmları ayırmak için iyi bir metot sağlar (Ji et al.2000, Conner ve Wood 2001). Mevcut sonuçlar ayrıca, spesifik RAPD markerleri kullanılarak türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırmak için bazı bağımsız ve farklı yollarıda göstermiştir. Spesifik bant deseni kullanılarak 10 ve tek (benzersiz) RAPD markerleri kullanılarak 14 genotip ayrılabilmiştir. Dört primerle üretilmiş 21 RAPD bandıyla inşa edilen DNA parmak izi veya sadece bant deseni kombinasyonu kullanılarak tür veya varyete düzeyinde 24 çay germplazmının tümünü ayırmak kolaydır. **Böylece, RAPD analizi sadece Thea bölümü Camellia türü içindeki çay bitkileri ve onlarla akraba türler arasında ki yüksek genetik polimorfizmi ortaya çıkarmakla kalmaz (Chen ve Yamaguchi, 2002) aynı zamanda türler arası düzeyde çay germplazmlarını ayırmak için etkili bir yöntem ve pratik bir metot sunar. Sonuçta bu yöntem, çay ıslahı için ebeveyn seçmek ve gelecekteki çay germplazmlarını tanımlamamıza yardımcı olacaktır.**

---

**Teşekkür :** Araştırmacılar, Yapıcı yorumları için bilir kişilere ve Drs Koichi Akiyama, Qi-kang Gao ve Professor Ping-sheng Wang'a teşekkür eder. Bu çalışmaya Çin Bilim ve Teknoloji Bakanlığı'nın Ulusal Bilimsel Projeler (2001BA511B09-04, 2001BA502B02 and 2003DKA3N013-08) kapsamında, Çin Ulusal Doğa Bilimleri Kurumu (30070486) tarafından kısmen destek sağlanmış ve bir bölümü de Japonya Ehime Üniversitesinde tamamlanmıştır.

---

**Kaynak:** L. Chen ve S. Yamaguchi. 2005. [RAPD markers for discriminating tea germplasms at the inter-specific level in China. Laboratory for Germplasm, Breeding and Molecular Biology, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 1 Yunqi Road, Hangzhou, Zhejiang 310008, China, E-mail: liangchen@mail.tricaas.com; 2Laboratory of Vegetable and Flower Science, Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama 790-8566, Japan. Plant Breeding 124, 404—409 \(2005\).](#)

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