

Bu çalışmada, "mamul çayın" genetik analizi ile orijinin nasıl belirlenebileceği anlatılmaktadır

Çay'da ki Yüksek Dereceli Polimorfik Mikrosatellitlerin Karakterizasyonu ve İzolasyonu

Susan Freeman, Jon West, Celia James, Vince Lea ve Sean Mayes
Cambridge Üniversitesi, Genetik Bölümü, Cambridge CB2 3EH
Nottingham Üniversitesi, Tarım ve Çevre Bilim Dalı, LE12 5RD (2004) İngiltere.

Özet

Çayın orijini ve farklılıkları hakkında oldukça az bilgi mevcuttur. En yüksek değer biçilen çay ürünleri, orijin bölgeleri temel alınarak satışa sunulanlardır ancak halen paketler üzerindeki etiketleri doğrulamak için kullanılabilir bir metot yoktur. Biz, çay için geliştirilmiş 15 mikrosatellit lokus'u elde ettik. Bunların, doğruluğu kanıtlama amacına yönelik yararlılık larını belirlemek için bir dizi çay klonu içerisindeki polimorfizm değerlendirildi. Geliştirilen mikrosatellitlerin bir çoğu hem farklı coğrafik orijinler içinde hem de arasında yüksek derecede polimorfizm olduğunu kanıtlamış oldu ve çayın genetik orijini ile popülasyon genetiğini araştırma potansiyeli sundu.

Takdim

Dünya mamul çay üretimi 2002'de üç milyon tonu (kuru ağırlık) aşmış ve yıllık 4.5 milyar \$US'lık bir pazar arz etmektedir (FAOSTATS, www.fao.org). İki çay türü : "Çin tipi" *Camellia sinensis* ve "Assam tipi" *Camellia assamica*, Güneybatı Çin ve Kuzeydoğu Hindistan (Assam), Myanmar civarı kaynaklı olmakla birlikte yerli varyetelerin insanlıkla tanışması ve kültüre alınışının tarih (kronoloji) ile aydınlatılması güçtür (Sealy, 1958). Avrupalılar, 18. ve 19. yüz yıllarda çay bitkilerini Çin'den elde etmiş ve kolonilerinde plantasyonlar tesis etmiştir. Daha sonra, yetiştiriciliği daha elverişli olan Assam'da ki yerel çay bitkileri keşfedilince (Griffiths, 1967) Assam tipleri, Çin tipi bitkilerin yerini almış ve sonraki dönemlerde meydana gelen (kontrolsüz) hibridizasyon sonucu "saf" Assam denilebilecek bitkilerden söz edilememiştir (Banerjee, 1992). Büyük miktarda, çay tohumuna dayalı çay yetiştiriciliğinin yaygınlaşmasından sonra bazı tohum stokları içinde özellikle Assam tipleri sık sık köken karışıklığı gösterdi. Vejetatif üretim (klonlar) 1960'larda tohumla üretimin yerini almaya başlamış ancak bu kez de çay varyeteleri içindeki genetik çeşitlilik azalmıştır (Visser, 1976). Her bir çay üretim bölgesindeki tarihi süreç –özellikle baskın yerel klonlar- bölgeler arasındaki allel'lik farklılıklarını incelemek için bir fırsat sundu.

Çayın (genetik) farklılıkları, RAPD makörleri (Wachira 1995, Chen et al.,1998; Liyanage et al.,2001; Wachira et al., 2001; Kaundun & Park 2002) ve AFPL markörleri (Wachira et al.,2001; Balasaravanan et al.,2003) ile incelenmekteydi. Bununla birlikte, bu tekniklerin her ikisi de dominant makörler üretir ve RAPD markörlerinin kullanılması durumunda da, laboratuvarlar arasında yeniden elde edilebilirliğe dair bir dizi şüpheler oluşmuştu. Mamul çayın genetik analizi yoluyla, üretim bölgesini belirleme olasılığını araştırmak için bir mikrosatellit lokus dizisi geliştirdik. Oluşturulan bu markörler aynı zamanda, çay materyallerinin popülasyon yapılarını da değerlendirmek için bir araç işlevi görmüştür.

Zenginleştirilen bir mikrosatellit kütüphanesi, Edward's et al.,(1969)'ın zenginleştirme protokolüne göre yapılandırılmış ve Haddrill et al.,(2002)'tarafından tanımlanmış olan optimal tavlama ısısı için test edilmiş ve mikrosatellit primerleri geliştirilene kadar sürdürül müştür.

Mikrosatellitlerin polimorfizmini değerlendirmek için 10 ng'lık DNA örnekleri, 12.5 µL'lik reaksiyon karışımı : 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, %0.1 Triton X-100, 0.2 mM dNTP içerisinde amplifiye edilmiş ancak daha önceden ters primerler 0.5 µM ABI 0.1 U Taq DNA polimeraz (Promega) fluozeran boya ile işaretlenmiştir.

#: Değerlendirilen çay genotiplerinin sayısı. Ta: Primer çiftleri için tavlama sıcaklığı. Bu genotipler için allel'lerin boy sırası otomatik genotip verisine dayalı olup allel'ler; değerlendirilen 14 veya 15 genotip arasında belirlenen farklı allel sayısını verir. Polimorfik Bilgi İçeriği (PIC) değerleri bu verilerde yararlanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 1: Çay (*Camellia sinensis*) için 15 mikrosatellit lokusu'nun geliştirilmesi ve ayrılması

Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	EMBL Accession no.	#	Size range (bp)	T _a (°C)	Alleles	PIC value
CamsinM1	F: GAATCAGGACATTTATAGGAATTAA R: GGCCGAATGTTGTCITTTTGT	(GT) ₁₆	AJ621786	15	280-300	50	9	0.88
CamsinM2	F: CCTCTGGTGGTCCCTACACCT R: AAAGCCTTGATGCCCTTTTCG	(GT) ₁₇	AJ621787	15	240-260	55	10	0.91
CamsinM3	F: GGTGTGGTGTTTTGAAGAAA R: TGTTAAGCCGCTTCAATGC	(CA) ₁₈	AJ621788	14	190-210	65	8	0.86
CamsinM4	F: ACATTCACAGCANTCCACATATGTGAAA R: CCTGNTGCAGGACTGTCTATAGATGA	(GA) ₁₉	AJ621789	15	358-370	60	5	0.72
CamsinM5	F: AAACCTCAACAACCAGCTCTGGTA R: ATTATAGGATGCCAACAGGCATGA	(GT) ₁₅ (GA) ₈	AJ621790	15	170-205	60	10	0.81
CamsinM6	F: TGTTTTCTTAGGGTTGGATAAAGG R: TTTTGTGTAAATGACGAAAATTC	(TG) ₁₂ (T) ₁₅	AJ621791	15	280-300	55	11	0.89
CamsinM7	F: TGGTAAGGGTCCCTAAGAGGTACAC R: TTCCAATCTTTTCTATAACATCTGC	(GT) ₁₆	AJ621792	15	210-235	55	10	0.87
CamsinM8	F: CCATCATGGCCATTACTACAA R: CCATATGTGTGTAATGATAAAAACC	(CA) ₁₇ ((TA) ₅	AJ621793	15	154-170	65	10	0.92
CamsinM9	F: CTCATGGAGTCCAAGGAAGC R: AAAGCAGTCTGGAACTTGC	(CT) ₁₅ (CA) ₁₂	AJ621794	15	170-205	55	7	0.88
CamsinM10	F: TTACATCTCTTTTGCAGCTGTCCG R: CTTCCGGAACCTTCTGCTTCATC	(GT) ₁₆	AJ621795	14	170-195	65	8	0.86
CamsinM11	F: GCATCATCCACCCTCAAC R: GTCATCAAACAGTGGCTCA	(CA) ₁₂	AJ621796	14	82-160	65	9	0.81
CamsinM12	F: CATATCGTCACTTGCAAAAGAGGT R: CGAGAAGAAGAGCTCTATTTGGTT	(GT) ₁₂ (GA) ₁₈	AJ621797	14	135-190	65	12	0.89
CamsinM13	F: CACATTTGTGGCGTGTATTAATTT R: ACATTTGGCTATCTCTCATCATGG	(TG) ₁₃	AJ621798	14	160-246	60	13	0.92
CamsinM14	F: TGGACTTGAAGGACTGAGG R: ACAAAGCTCAACCTGCCATT	(GA) ₁₆	AJ621799	14	236	65	1	0
CamsinM15	F: CAACCTTGAGCATCAAACGTCA R: TGAAGCTGTGGAGATGTCA	(CT) ₁₃ (CA) ₂₃	AJ621800	14	222	55	1	0

Yukarıda belirtilmiş olan tavlama sıcaklığı, polimeraz zincir reaksiyon (PCR) protokolü kullanılarak optimize edildi ve Tablo 1'de sunuldu. PCR ürünleri, yükmeden önce 2 dakika süreyle 95 oC'de denatüre edilen ve buzda soğutulan Hi-Di Formamide (1:20) ve standart boyutta 9.5 µL GeneScan-500 ile karıştırılarak, 0.5 µL ürün ile yüklenebilen GeneScan Polymer 3100POP-4 kullanılarak kapillar array ABI PRUM 3100 Genetik Analizör'de belirlendi.

Mikrosatellitlerin değerlendirilmesi; Kenya (6), Güney Hindistan (4), Malawi (3), Japonya (1) ve Assam (1)'den elde edilen bir dizi klondan türetilmiş DNA'lar kullanılarak yapılmıştır. Bir çoğu, Cambridge Üniversitesi Botanik Bahçesi'nde yetiştirilen (çay) bitkilerden alınmıştır. DNA'ların hazırlanması, modifiye edilmiş Dellaparta metoduna dayalı olarak yapılmıştır (Dellaparta et al.,1983). Yaklaşık olarak 0.2 gr kurutulmuş yaprak dokusu 60 dakika süreyle 65 oC'de 1.5 mL mikrofuge tüp içerisinde ki 0.75 mL tampon ekstraksiyon unda (0.1 M tris, 0.5 M NaCl2, 0.05 M EDTA, %1 PVP, 10 mM 2-mercaptoethanol, %1 sodyum dodecyl sülfat) bekletildi. Örnekler daha sonra, 10 dakika süreyle 16.060 gr'lık bir Biofuge Pico (Heraeus) mikrofuge'de santrifüj edildi. Süpernatant kaldırıldıktan sonra çökelen DNA, 20 dakika süreyle 16.060 gr'lık Biofuge Pico (Heraeus) mikrofuge'ye eşdeğer hacimdeki propan-2-ol ile santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelte, 100 µL TE tanponu (10 mM Tris-HCl pH:8.0, 1 mM EDTA) içerisinde tekrar süspanse edildi ve 10 ng/mL'ye kadar seyreltili.

14 veya 15 farklı genotip ile bunları primer gruplara ayırmanın sonuçları ve amplifiye edilen mikrosatellitlere ait temel veri Tablo 1’de sunulmuştur. Görülebileceği gibi, Polimorfik Bilgi İçeriği (PCR) değerleri 5’den 13’e kadar sıralanmış olan (CasmnM14+15 hariç) farklı miktardaki allel’de genel olarak yüksektir. Bu, çaydan elde edilen bir mikrosatellit grubuna ait ilk rapordur. Yüksek polimorfik çay mikrosatellit’leri dizisinin geliştirilmiş olması, çayların orijinleri üzerinde genetik bilginin toplanabilmesine imkan sağlayacak ve dünya çapında çay karşılaştırmaları için bir Genetik Bilgi Hattı oluşturacaktır.

Teşekkür: Araştırmacılar, Q01048 referanslı "DNA Parmak İzi Profiline Kullanımı Yoluyla Yüksek Kaliteli Çay Ürünlerinin Orijinal Kökeninin Belirlenmesi" projesi kapsamında UK Gıda Standartları Ajansı tarafından sağlanan finansal desteğe ve ilaveten "DNA-İz Projesi 1999/C64/14" kapsamında EU tarafından sağlanmış olan desteğe teşekkür eder.

Kaynak: Susan Freeman, Jon West, Celia James, Vince Lea and Sean Mayes. 2004. [Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea \(Camellia sinensis\)](#). NIAB, Huntingdon Road, Cambridge, CB3 0LE, UK, Department of Genetics, Cambridge University, Cambridge, CB2 3EH, UK,HRI, East Malling, West Malling, Kent, ME19 6BF, UK,Division of Agriculture and Environment, Nottingham University,Loughborough, LE12 5RD, UK.

Mikrosatellit (Simple Sequence Repeats (SSRs): Mikrosatellit’ler genom içerisinde, mono, di, tri yada tetra nükleotid permutasyonların her hangi bir formu şeklinde “tandem” olarak (birbiri ardına) tekrarlanan (tandem repeated) ve polimorfik özellik gösteren kısa DNA sekanslarıdır.

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Microsatellite>)

Yüksek dereceli polimorfik mikrosatellitlerin çay genotipinin tanımlanmasında kullanımını konu alan diğer güncel araştırma örnekleri:

PCR-based amplicon length polymorphisms (ALPs) at microsatellite loci and indels from non-coding DNA regions of cloned genes as a means of authenticating commercial Japanese green teas. Journal of the science of food and agriculture ISSN 0022-5142 2004, vol. 84

<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15778818>

Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. Euphytica ISSN 0014-2336 (2002), vol. 128

<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14355030>

The Korean Tea Plant (*Camellia sinensis*): RFLP Analysis of Genetic Diversity and Relationship to Japanese Tea. Vol. 54 (2004) , No. 3 231-237.

http://www.jstage.jst.go.jp/article/jsbbs/54/3/54_231/article

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