Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دهم ـ شماره دوم ـ تابستان ۱۳۸۲
www.magiran.com/jasnr

ارزیابی فاصله ژنتیکی ارقام چای (*Cammellia sinensis* L.) با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌ها و پلی مورفیسم ایزوزیم استراز

احمد محمودزاده، رضا حیدری، معصومه جمال‌امیدی

گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۸۰/۸/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۱/۷/۱۵

چکیده

دراین تحقیق پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، پروتئین‌های محلول برگ و یک سیستم آنزیمی (استراز) در ۱۲ رقم چای (*Camellia sinensis* L.) مورد مطالعه قرا گرفت. باندهای پروتئینی به روش الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات ژل پلی آکریل آمید و باندهای آنزیمی به روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید جدا سازی شدند. در مجموع ٤٧ نوار بدون ابهام و تکرارپذیر مشاهده شد که از آنها برای برآورد فاصله ژنتیکی ارقام چای استفاده شد. ارقام در فاصله ۰/۱ تا ۰/۵ خوشه‌بندی شدند و میانگین فاصله ژنتیکی آنها ۰/۳۱٦ برآورد شد. خوشه‌بندی ارقام برحسب ٤٧ نوار، با استفاده از ضریب جفت و جور شدن ساده[1] و به روش UPGMA[2] انجام گردید. برش دندروگرام از نقطه‌ای نزدیک به میانگین، ارقام را به سه کلاس گروه‌بندی می‌نماید. کلاس ۱: ارقام DN، ٦٢/٥، B٢٧٥، ۱۱ و ٢٤، کلاس۲: ارقام ۱٤،۱۰، ۱۹، ۲۰ و ۳۱ و کلاس۳: ارقام ۲۸ و ۱۰۰. حضور ارقام سریلانکایی در یک کلاس و ارقام انتخابی در کلاس دیگر حاکی از عدم تشابه آنها و زیاد بودن فاصله ژنتیکی آنها است. البته در داخل هر کلاس نیز تنوع ژنتیکی واضحی مشاهده می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، SDS – PAGE، استراز، فاصله ژنتیکی، ارقام چای

مقدمه

جنس *Camellia* از خانواده *Camelliaceae* (*Theaceae*) شامل ۸۲ گونه است که اکثر آنها بومی مناطق مرتفع جنوب شرقی هند می‌باشند(۱۳). از بین گونه‌های جنس *Camellia*، *C.sinensis* یکی از وسیع‌ترین گونه‌های منتشر شده است که بطور تجارتی در اکثر نقاط دنیا بویژه در ژاپن کاشته می‌شود و منبعی برای چای نوشیدنی است. البته برخی گونه‌های دیگر نظیر *Irrawadiensis, aliensis* نیز واحد پتانسیل اقتصادی برای تولید چای نوشیدنی

1- Simple matching coefficient
2- Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

www.SID.ir

Archive of SID

هستند و در بخش‌هایی از آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرند. از سوی دیگر بذر حاصل از گونه‌های *japonica* و *oleifera* بطور وسیعی در ژاپن و چین برای روغن کشی استفاده می‌شود و بخش عظیمی از گونه‌های *Camellia* صرفاً ارزش تزئینی دارند (۱۸).

بطور کلی در گذشته منشأ و طبقه‌بندی چای منحصراً بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی بررسی می‌شد اما خصوصیات مورفولوژی به‌دلیل انعطاف‌پذیر بودن و اینکه توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند، اعتبار کمتری در تاکسونومی چای دارند. با این وجود، هنوز هم از ویژگی‌های رویشی اغلب در تشخیص تفاوت‌های ابتدایی میان تاکسون‌ها استفاده می‌شود (۲، ۸، ۱۵و ۱۹).

امروزه از روش‌های بیوشیمیایی نظیر الکتروفورز و کروماتوگرافی که ساده، سریع و دقیق‌تر هستند و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند در طبقه‌بندی گیاهان استفاده می‌کنند. پروتئین‌ها بطور مستقیم توسط اسیدهای نوکلئیک کدگذاری می‌شوند بنابراین از نظر ژنتیکی، اختلاف در پروتئین‌ها باید در تغییر رفتار الکتروفورزی بیان شود. از طرفی ایزوزیم‌ها به علت داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد خود بطور گسترده‌ای برای مطالعه جمعیت‌های طبیعی و به‌نژادی در گیاهان به کار می‌روند (۷ و ۱۷). تحقیقات زیادی در زمینه‌های شیمیایی، پلی مورفیسم ایزوزیم‌ها و مارکرهای RAPDs و AFLP در گونه‌های متعلق به جنس کاملیا بویژه چای زراعی (*Camellia sinensis* L.) انجام شده است (۲، ۵، ۱۱، ۱۲ و ۱۴).

استرازها در میان سایر سیستم‌های آنزیمی بطور وسیعی برای نشان دادن تغییرات ژنتیکی موجود در ارقام چای (*Camellia sinensis* L.) مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۱۰).برخی محققین، برای روشن ساختن روابط درون‌گونه‌ای در چای تنوع ایزوزیم‌های استراز را با استفاده از روش الکتروفورز (PAGE) در سه گروه آسامی، چینی و ژاپنی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان می‌دهد که گروه ژاپنی تنوعات گروه چینی را نیز در برمی‌گیرد و گروه آسامی فاصلهٔ بیشتری نسبت به آنها دارد (۱۳).

چای یک گیاه دگرگشن است و از احداث باغات چای در ایران مدت زمان‌زیادی می‌گذرد و احتمال تداخل ارقام در یکدیگر داده می‌شود. هدف از اجرای این کار تحقیقی، تعیین نقش مارکرهای شیمیایی در خویشاوندی تاکسون‌های چای و تعیین جایگاه ویژه هر تاکسون است تا با تعیین فاصله ژنتیکی بین دو فرد (جمعیت یا کولتیوار) بتوان با دورگ‌گیری مناسب و انتخاب والدین براساس میزان حداکثر فاصله ژنتیکی حداکثر قدرت دورگ[1] را به دست آورد.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این تحقیق از ۱۲ رقم چای از گونهٔ *Camellia sinensis* استفاده شد. بذرها و برگ‌های ارقام مورد مطالعه در شرایط مشابه نمونه‌برداری از دو ایستگاه تحقیقات و خدمات فنی کاشف سیاهکل و ایستگاه تحقیقات و خدمات فنی املش جمع‌آوری شدند. ارقام انتخابی (۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۹، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۱) از هیبریدهای تیپ چینی بوده و بومی مناطق چایکاری ایران هستند و در جریان یک برنامه بلند مدت به‌نژادی گزینش شده‌اند. ارقام خارجی (DN، ۶۲/۵، $B_{۲۷۵}$) منشأ سریلانکایی دارند و آخرین رقم کلون ۱۰۰ می‌باشد. برای الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای از بذور کاملاً رسیده استفاده شد و برای الکتروفورز پروتئین‌های محلول برگ و همچنین آنزیم استراز از نمونه‌های برگی تازه (برگهای رسیده و بالغ) استفاده گردید (۲، ۱۳ و ۱۴).

1- Heterosis

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر: نیم‌گرم بذر له شده با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۰۹M تریس-۰/۴۹٤درصد اسید بوریک pH=۸/٤ و۰/۰۹۳ درصد کمپلکس سدیمی‌دی‌آمین ترا استات[1]) مخلوط گردید. غلظت بافر مزبور با افزودن ۰/۲۵میلی‌لیتر ساکارز ٤۵ درصد برای جلوگیری از انتشار نمونه‌ها افزایش می‌یابد. برای حفظ پروتئین‌ها ۳ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول،۲ میلی‌گرم اسید اسکوربیک و ۲ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدین (PVP) به هر نمونه اضافه می‌شود. نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شوند. محلول رویی حاوی پروتئین است که برای تزریق به ژل استفاده می‌شود (٤).

استخراج پروتئین‌های محلول برگ: مقادیر مختلفی از برگ (۱/۵، ۱، ۰/۵ گرم) با نسبت‌های مختلفی از بافر استخراج (۱:۳، ۱:۲، ۱:۱/۵) آزمایش شدند. بهترین ترکیب بافر استخراج در این آزمایش بدین ترتیب به‌دست آمد: ۰/۱۱ M تریس ـ اسید کلریدریک pH=۷/٦، ۷ درصد ساکارز، ۱ درصد سرم آلبومین، ۵ میلی‌مولار سدیم متابی سولفیت، ۳ درصد پلی‌اتیلن گلیکول، ۱ درصد پلی وینیل پیرولیدین ۲/۵درصد ۲- مرکاپتواتانول. بهترین نسبت بافر به وزن نمونه ۱:۲ بود. نمونه‌های برگ در هاون چینی در ٤درجه سانتی‌گراد کوبیده شدند و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. عصاره رویی جهت تزریق استفاده شد (۱).

استخراج استراز: نیم‌گرم برگ کاملاً رسیده (۱، ۱۱ و ۱۲) با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (۱/۲۱ درصد تریس ـ اسید کلریدریک pH=۷/۵، ۳/٤ درصد ساکارز، ۰/٦درصد پلی‌اتیلن گلیکول و ۰/۰۳۵ اتیلن دی آمین ترا استات[2]) مخلوط گردید. سپس در زمان استفاده به ازاء ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول ٦۰ میکرولیتر محلول ۲ـ مرکاپتواتانول به آن اضافه شد، محلول را به مدت ۱۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ نموده و پس از جدا سازی، فاز رویی تا زمان تزریق در فریزر نگهداری گردید (۱۷).

روش الکتروفورز: الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و پروتئین‌های محلول برگ با تکنیک SDS-PAGE براساس روش لایملی و با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد انجام گردید(۹). نمونه‌های پروتئینی با اختلاط ۵ میکرولیتر مایع استخراج شده، ۱/۲۵ میکرولیتر از ۲ـ مرکاپتواتانول و ۳/۷۵ میکرولیتر رنگ تهیه شد. رنگ شامل آبی برومونفل ۰/۰۰۵ درصد در محلول M ۰/۰٦۲۵ تریس ـ اسید کلریدریک(pH=٦/۸) بود که به آن ۸ درصد گلیسرول و ٤ درصد سدیم دو دسیل سولفات[3] اضافه شده بود (۳). رنگ آمیزی پروتئین‌ها با ۰/۰۲۵ درصد کوماسی بلو، ۲۵درصد ایزوپروپانول و ۱۰ درصد اسید استیک انجام شد. الکتروفورز ایزوزیم استراز به روش PAGE، با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵درصد انجام گرفت. در هنگام تزریق به نسبت ۲:۱، عصاره‌های آنزیمی به دست آمده با ۵۰درصد گلیسرول و ۰/۰۵ میلی‌لیتر / میلی‌گرم برومونفل آبی مخلوط گردید. رنگ‌آمیزی ژل برای سیستم آنزیمی استراز به روش زیر صورت گرفت:

در این روش ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار NaH_2PO_4 با ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار Na_2HPO_4 مخلوط و حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۵۰ میلی‌گرم نمک فست بلو RR به محلول اضافه شد. ۱۰۰ میلی‌گرم α- نفتیل استات در ۲ میلی‌لیتر استون ۵۰ درصد و ۵۰ میلی‌گرم β- نفتیل‌استات در۱ میلی‌لیتر استون ۵۰ درصد حل شده و به محلول فوق اضافه شد. محلول نهایی بر روی ژل

1- Na2EDTA

2- EDTA

3- SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

www.SID.ir

Archive of SID

افـزوده شـد و ژل بـه‌مدت ۳-۲/۵ سـاعت در درجـه حرارت اتاق نگهداری گردید. سپس ژل‌ها با ستفاده از محلول ۵۰ درصد اتانول تثبیت شدند(۱۷).

تجزیه داده‌ها: ابتدا تعداد و مکان باندهای پروتئینی در هر نمونه محاسبه شد و Rm هر باند بـه دسـت آمـد. چنین ارزش‌گذاری توسط محققین مختلفـی در مـورد گیاهان متفاوتی صـورت گرفتـه اسـت. از جملـه ایـن تحقیقات، مطالعه‌ای است که درمورد یـولاف صـورت گرفته است (٦). سپس براساس حضور یا غیـاب، هـر باند کدگذاری گردید. بدیـن ترتیـب کـه در صـورت حضور، کد یک و عدم حضور باند در هر نمونـه کـد صفر تعلق گرفت. وزن مولکولی بعضـی از نوارهـا بـا استفاده از پروتئین‌های استاندارد مشـخص گردیـد. بـا استفاده از ضریب جوربندی ساده، میزان تشابه هر رقم با بقیه ارقـام محاسـبه گردیـد (١٦). مـاتریس فاصلـه ژنتیکـی بـر اسـاس مـاتریس تشـابه بـه دسـت آمـد (ضریب تشابه -۱ = فاصله ژنتیکی) و ماتریس فاصلـه ژنتیکی حـاصل توسـط برنامـه رایانـه‌ای SPSS و بـه روش UPGMAمـورد تجزیـه قـرار گرفـت. نتـایج حاصل به صورت دندروگرام نشان داده شده است.

نتایج و بحث

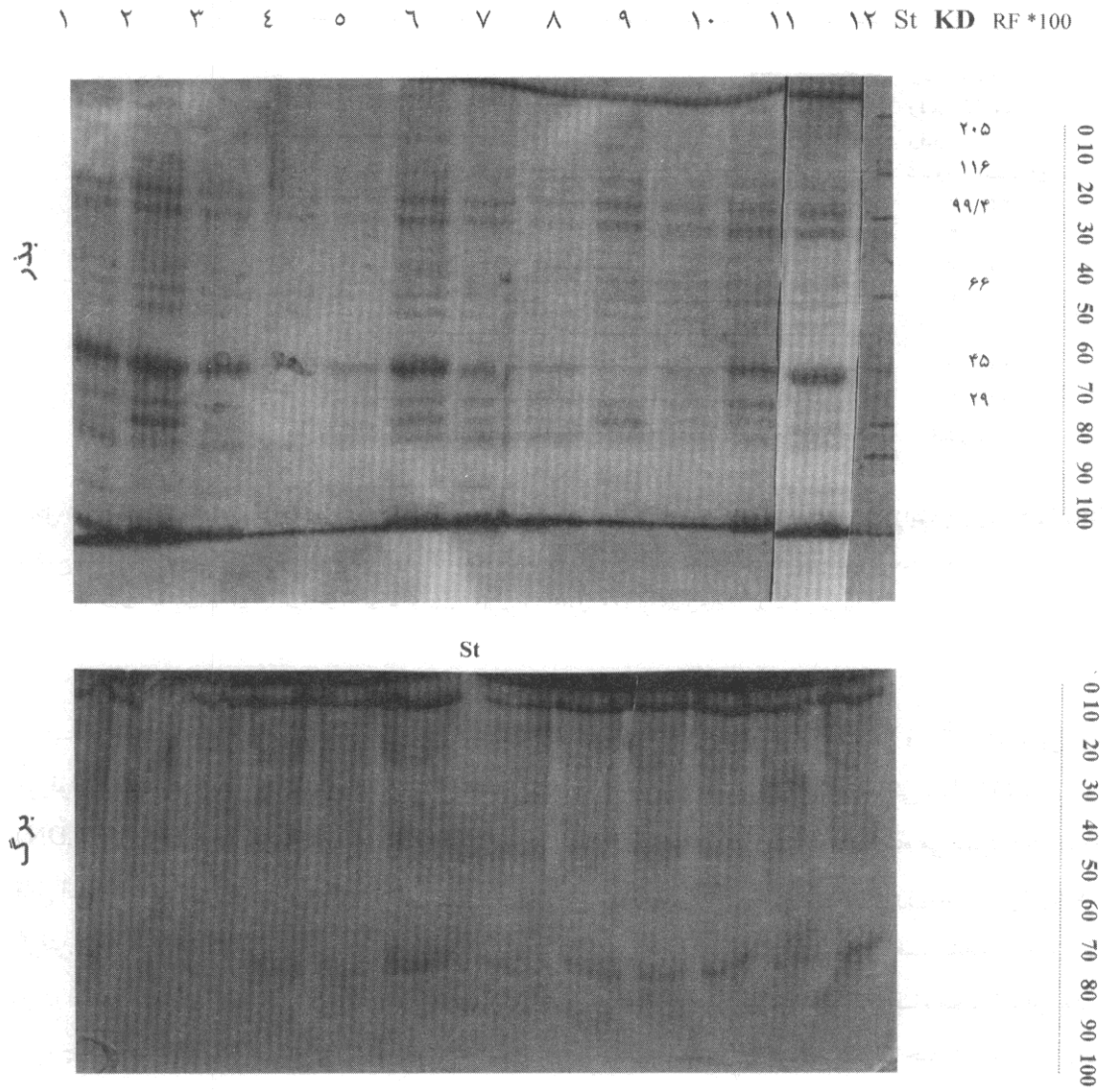
درمجموع ٤٧ نوار بدون ابهام و تکرارپذیر در بذر و برگ ۱۲ رقم چای به‌دست آمد. برای سـادگـی، هـر نـوار برحسـب نسـبت حرکـت آن در ژل بـه مقـدار حرکت آبی، بروموفنل نام‌گذاری شد. حضور یک نـوار با کد۱ و عدم حضور آن با کـد صفـر مشـخص شـد. هشت نوار در تمام ارقام مشترک اسـت ودر ۳۹ نـوار چند شکلی(پلی مورفیسم) وجود دارد. ماتریس فاصله ژنتیکی برای کل داده‌ها در جدول ۱ نشـان داده شـده است. میانگین کل فاصله ژنتیکـی بـرای ارقـام مـورد مطالعه برحسب کل داده‌ها ۰/۳۱٦ به دست آمد. بـرای روشن شدن طرز نامگذاری نوارها و مشـخص کـردن Rm آنها الگوی نواربنـدی پروتئین‌هـای بـذر و بـرگ ارقام چای در شکل ۱ منعکس شـده اسـت. همـانطور که ملاحظه می شود علی‌رغم قرار دادن حجم مسـاوی از نمونه پروتئینـی، شـدت رنگ‌آمـیزی بـرای برخـی نوارها در داخل ارقام متفاوت است.

جدول۱ ـ فاصله ژنتیکی در ۱۲ رقم چای برای ٤٧ مارکر (۱۰۰۰ × فاصله)

	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱	-											
۲	۲۳٤	-										
۳	۲۷۷	۳٤۰	-									
٤	۲۷۷	٤۲٦	۲٥٥	-								
٥	۲۱۳	۳٦۲	۲۳٤	۱۹۱	-							
٦	۲٥٥	۲۳٤	٤۰٤	۳٦۲	۳٤۰	-						
۷	۲۹۸	۳٦۲	۳٦۲	۳۱۹	۲٥٥	۳۸۳	-					
۸	۲۳٤	۲۹۸	۲٥٥	۲۱۳	۱۰٦	۲۷۷	۱۹۱	-				
۹	۳٦۲	۳۸۳	٤۲٦	۳٤۰	۲۷۷	٤۰٤	۲۷۷	۱۷۰	-			
۱۰	۳٦۲	۲۱۳	٤٦۸	٤۲٦	۳٦۲	۲۳٤	۳٦۲	۲۹۸	۳۸۳	-		
۱۱	٤۲٦	۳۱۹	٤٤۷	٤۸۹	٤۲٦	۲۹۸	۳۸۳	۳٦۲	۳٦۲	۱۹۱	-	
۱۲	۳٦۲	۲۹۸	٤۲٦	٤۲٦	۳٦۲	۲۳٤	٤۰٤	۳٤۰	۳۸۳	۱۲۸	۱۰٦	-

www.SID.ir

Archive of SID

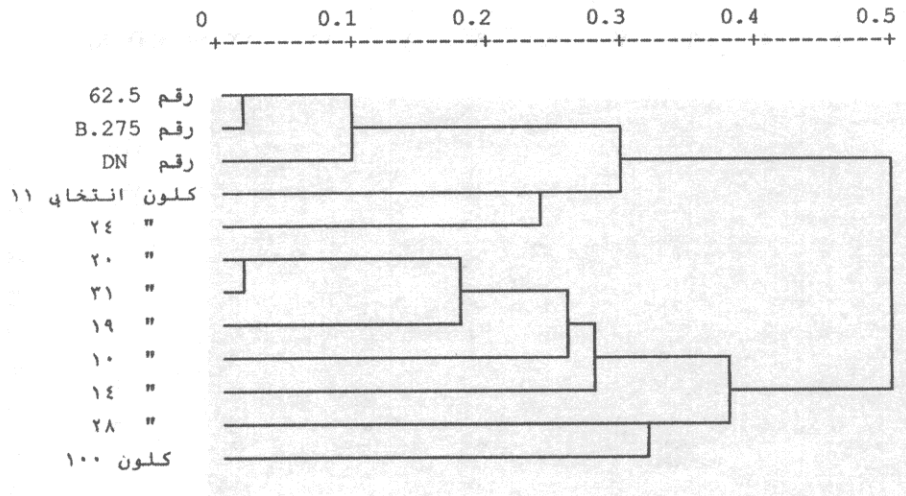


شکل ۱ـ طرح های الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و محلول برگ در ۱۲ رقم چای با استفاده از روش PAGE – SDS.(ارقام به ترتیب عبارتند از :۱=۱۰ ،۲=۱۱ ،۳=۱٤ ،٤=۱۹ ،٥=۲۰ ،٦=۲٤ ،۷=۲۸ ،۸=۳۱ ،کاون ۱۰۰=۹ ،رقم DN=۱۰ ،رقم 62.5=۱۱ ورقم B275=۱۲)

کلاستربندی ارقام چای برحسب ٤۷ مارکر (۱۹ باند پروتئینی بذر + ۱۲ باند پروتیئنی برگ + ۱٦ باند ایزوزیمی) با استفاده از ضریب جفت و جور شدن ساده و به روش UPGMA نشان داد که برش دندروگرام به دست آمده از نقطه ای نزدیک به میانگین، ارقام را به سه کلاس گروه‌بندی می کند: کلاس ۱: ارقام DN، ٦۲/٥، B۲۷٥، ۱۱ و ۲٤، کلاس ۲ : ارقام ۱۰، ۱٤، ۱۹، ۲۰ و ۳۱ و کلاس ۳ : رقم ۲۸ و کلون ۱۰۰ (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲ـ درخت‌واره (دندروگرام) ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر مبنای مطالعه کل نشانگر (بذر، برگ و ایزوزایم) با روش UPGMA

توضیح ارقام: سه ژنوتیپ اول مربوط به ارقام کلونی (اصلاح شده) وارداتی از کشور سریلانکا، هشت کلون بعدی مربوط به ژنوتیپ‌های انتخابی از مناطق چایکاری ایران (مربوط به طرح گزینش کلونی) و کلون ۱۰۰ از کلون‌های امیدبخش می‌باشند.

با توجه به منشأ جغرافیایی و خصوصیات مورفولوژیک و زراعی متفاوت ارقام سریلانکایی (DN، ٦٢/٥، B٢٧٥)، قرار گرفتن آنها در یک کلاس قابل انتظار است. در خصوص ارقام انتخابی نیز، قرار گرفتن ارقام در یک کلاس، حاکی از تشابه آنها و کم بودن فاصله ژنتیکی آنهاست (همگی از هیبریدهای تیپ چینی هستند). البته در درون این کلاس هم تنوع ژنتیکی واضحی وجود دارد بطوریکه بعضی ارقام با فواصل ژنتیکی کمتربه هم ملحق شده‌اند و بعضی ارقام با فاصله بالاتر به سایرین پیوسته‌اند، یعنی اگر محل برش درخت‌واره (دندروگرام) کمی تغییرکند، جدا شدن بعضی از این ارقام از سایرین به راحتی قابل مشاهده است. این تفکیک نشان دهندهٔ قدرت تجزیه خوشه‌ای و نتایج الکتروفورزی در بررسی خویشاوندی و تکامل بین ارقام است.

در مجموع سه ژل بیشترین تعداد باند در رقم‌های DN، ٦٢/٥، B٢٧٥ و کمترین تعداد باند در رقم‌های ١٤ و ١٩ مشاهده می‌شود. بیشترین درصد تشابه یا کمترین فاصله ژنتیکی با ٨٩/٤ درصد بین رقم های ٦٢/٥ و B٢٧٥، ٢٠ و ٣١ و کمترین درصد تشابه یا بیشترین فاصله ژنتیکی با ٥١/١ درصد بین رقم‌های ٦٢/٥ و ١٩ مشاهده می‌شود. الکتروفورز پروتئین‌ها و پلی‌مورفیسم ایزوزیم استراز به همراه تجزیه خوشه‌ای براساس درصد تشابه به خوبی قادر به گروه‌بندی و تفکیک ارقام مختلف از یکدیگر می‌باشند و از آنها می‌توان جهت بررسی رابطه خویشاوندی، تکاملی و تنوع ژنتیکی و جغرافیایی استفاده نمود. به عنوان مثال در کلاس اول ارقام DN، ٦٢/٥ و B٢٧٥ که ژنوم‌هایی با منشأ یکسان دارند در یک کلاستر قرار گرفته‌اند. از آنجایی که ژنوتیپ‌های موجود در هر یک از کلاسترها دارای قرابت ژنتیکی بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های موجود در کلاسترهای متفاوت می‌باشند، بنابراین در صورت نیاز به دورگ‌گیری استفاده از ارقام موجود در کلاسترهای مختلف برای بهره‌وری بیشتراز پدیده‌هایی نظیر قدرت دورگ و تفکیک متجاوز قابل توصیه خواهد بود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱.جمال امیدی، م. ۱۳۸۰. تعیین قرابت و بررسی شیمیوتاکسونومی چند رقم چای (*Camellia sinensis* L.) در ایـران. پایـان نامه کارشناسی ارشدگروه زیست شناسی دانشکده علوم ارومیه. ۱۳۰ صفحه.

2.Hairong, X.U., T. Qiqing, and Z.H.Wanfang. 1987. Studies on the genetic tendency of *tea plant* hybrid generation using isozymic technique. Proceeding of International Tea – Qality – Human Health symposium. China. 21-25.

3.Hames, B.D., and D.Richwood. 1990. Gel electrophoresis of proteins, a Practical approach (2ed.). Oxford University presses. U.S.A. Pp:383.

4.Harborne, J. B. 1984. Phytochemical method, aguide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall. London. Pp:288.

5.Ikeda, N., M.Kawada, and Y.Takeda. 1987. Isozyme analysis of *Camellia sinensis* and its interspecific hybrids. National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea. Japan. 451 – 455.

6.Jain, S.K. ,and R.S. Sing. 1979. Population biology of *Avena.* VIII Colonization experiment as a test of the role of natural selection in population divergence. Amer. J. Bot. 67: 1342 – 1346.

7.Jaradat, A.A. 1992. Genetic diversity of four esterase loci in natural population of *Hordeum spontanum* C.Koch. from Jordan. Theor. Appl. Genet. 72: 15 – 26.

8.Kaunduns, S., A.Zhyvoloup, and Y.G.Park. 2000. Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis var. sinensis)* accessions using RAPD markers. Euphytica. 115 : 7–16.

9.Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Stractural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680 – 684.

10.Lu, Cy. , L.Wh, and L.Mj. 1992. Relationship between the evolutionary relatives and variation of esterase isozymes in *Tea plant.* Journal of tea Science. 12 (1): 15 – 20.

11.Nagata, T., and S. Sakaei. 1984. Differences in caffeine, flavanols and amino acids contents in leaves of cultivated species of *Camellia.* Japan. J. Breed. 34: 459 – 467.

12.Nagata, T. 1986. Differences in caffeine, flavanols and amino acids contents in leaves of cultivated species and bybrids in the genus *Camellia.* Jarq. 19 (4): 276 – 280.

13.Nagato, K., and K.Osone. 1982. Variation of esterase isozymes in *Tea plant.* Japan.J.Breed. 32(2): 155 – 161.

14.Nagaato, K.1982.Origin and taxonomic position of wabisuke group in the genus *Camellia* based on the isozyme variation. Japan. J. Breed. 32(1): 79 – 85.

15.Paul, S., F.N.Wachira, W.Powell, and R.Waugh. 1997.Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntz) revealed by AFLP markers. Theor. Appl Genet. 94:255 – 263.

16.Romesburg, H.C. 1990. Cluster analysis for researchers. Robert E. Kriger publisging Co. Florida, U.S.A. Pp: 334.

17.Tanksely, S.D., and T.J. Orton. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier science publisher B.V., Amsterdom.Pp: 516.

18.Wachira, F.N., W.Powell, and R.Waugh. 1996. An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* L. (Cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified poly morphic DNA and organelle specific STS. Heredity. 78:603-611.

19.Willson, K.C., and M.N. Clifford. 1992. *Tea*: Cultivation to consumption. Champman and Hall. London. Pp: 769.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vo2. 10(2), Summer 2003
www.magiran.com/jasnr

Estimation of genetic distance among *Tea* varieties using protein electrophoresis and polymorphism for esterase

A. Mahmoudzadeh, R. Haidari, M. Jamalomidi
Department of biology, University of Urmia, Iran.

Abstract

Seed storage proteins, leaf soluble proteins and an activity of esterase were studied in 12 *tea* varieties. Protein bands and enzyme bands were investigated by SDS – PAGE and PAGE systems, respectively. A total of 47 bands were used to estimate the genetic distance among the varieties. These varieties were clustered together between around 0.1 to 0.5 level of distance and their mean genetical distance were estimated to be 0.316. Clustering of varieties were carried out based on 47 markers by simple matching and UPGMA method. Cluster analysis differentiated the 12 varieties in to 3 classes: 1) DN, 62.5, B275, 11, 24, 2) 10, 14, 19, 20, 31 and 3) 28, 100. The presence of Srilanka cultivars in one class and selected cultivars in a different class is a reflection of their dissimilarity and the existence of genetic distance between them. Of course, in each class a considerable amount of genetic variation can be observed.

Keywords: Electrophoresis, SDS- page, Esterase, Genetic distance, Tea varieties

سال دهم - شماره ۲ - تابستان ۱۳۸۲

www.SID.ir