مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۹۷-۸۷)

Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 87-97

مطالعه کاریولوژیکی ژنوتیپ‌های چای (*Camellia sinensis* L.) موجود در ایران

مهران غلامی[1]*، معصومه جمال امیدی[2] و کوروش فلک‌رو[3]

۱، مربی پژوهشی (دانشجوی دکتری تخصصی اصلاح نباتات)، مرکز تحقیقات چای کشور، لاهیجان ۲، استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ، ۳، محقق، مرکز تحقیقات چای کشور، لاهیجان.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۵ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۳/۴)

Karyological Study of Tea (*Camellia sinensis* L.) Genotypes in Iran

M. GHOLAMI[1]*, M. JAMALOMODI[2] AND K. FALAKRO[3]

1, Ph. D. Student of Plant Breeding, Tea Research Institute of Iran, Lahijan, Iran; 2, Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran; 3, Researcher, Tea Research Institute of Iran, Lahijan, Iran.

(Received: October 28, 2012 - Accepted: May 25, 2013)

چکیده

چای (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) یکی از گیاهان نوشابه‌ای کافئین‌دار است که معرفی ارقام آن، نیازمند شناخت ژنتیک گیاه است. برای مطالعه کاریوتیپی چای، مریستم نوک ریشه ۹ ژنوتیپ انتخاب شدند. نتایج نشان داد که استفاده از آلفابرمونفتالین (۸ ساعت) برای پیش‌تیمار، محلول فارمر (۲۴ ساعت) برای تثبیت و رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها با هماتاکسیلین، نمونه‌های میکروسکوپی مناسبی برای مطالعه خصوصیات مورفولوژیک کروموزوم‌های میتوزی چای ارایه می‌نماید. شمارش تعداد کروموزوم‌ها نشان داد که همه چای‌ها، دیپلویید و دارای ۲n=۳۰ کروموزوم از انواع متاسنتریک و ساب‌متاسنتریک با فراوانی‌های متفاوت بودند و کروموزوم ماهواره‌دار مشاهده نشد. دامنه تغییرات طول کل کروموزوم‌ها از ۱/۱۰ میکرون تا ۴/۴۲ میکرون متغیر بود. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ۸ ویژگی مورفولوژیک کروموزوم‌ها مشخص نمود که بین ژنوتیپ‌ها، کروموزوم‌ها و اثرات متقابل ژنوتیپ×کروموزوم اختلاف معنی‌داری (۱٪) وجود داشت. از نظر آماره‌های DRL و L/S نیز، کلون شوروی برگ‌ریز (۱۰۱) و کلون ۳۵ دارجلینگ به‌ترتیب بیشترین و کمترین تقارن کاریوتیپی را داشتند. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، نقش شاخص سانترومری، طول بازوی کوتاه و نسبت بازوی کوتاه به بازوی بلند و طول کل کروموزوم در تشکیل مؤلفه اول بیش از سایر خصوصیات بود و این مؤلفه به‌تنهایی بیش از ۷۸٪ تغییرات و به‌همراه مؤلفه دوم، بیش از ۹۷٪ تغییرات را توجیه نمودند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به‌روش UPGMA، مشابه با نتیجه بای پلات مؤلفه‌های اصلی، توانست چای‌های مورد بررسی را در چهار گروه قرار دهد، به‌نحوی که کلون امیدبخش ۱۰۰ به‌تنهایی در یک گروه قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: چای، کروموزوم، کاریوتیپ، تجزیه چندمتغیره

Abstract

Tea (*Camellia sinensis* L.) is an important beverage crops containing caffeine worldwide. Releasing cultivars with high yield and quality demands knowledge about tea genetics and cytogenetics. Karyotypical study of nine tea genotypes was carried out using squash method on root tips. The best microscopic slides was first obtained using root tip of tea cuttings pretreated by α-bromo Naphthaline for 8 h, fixed by farmer solution and then stained with hematoxilin. Eight morphological traits were taken into consideration, each within three meiotic chromosomes using Micromeasure software. Analysis of variance showed significant differences (1%) among genotypes, chromosomes and the interactions, for all of the measured parameters. All studied teas were diploid and had 2n=2X=30 metacenteric and submetacenteric chromosomes. Total length of chromosomes ranged from 1.10 to 4.42 µm. Also, in terms of total length of chromosomes, genotypes 4 and 8 had the highest correlation and genotypes 2 and 9 had the lowest. Moreover some cytogenetic statistics was used in order estimate the karyotypic symmetry of genotypes. The results obtained showed that the genotypes 1 and 2 had the most asymmetric and genotypes 3 and 8 had the most symmetric, based on the TF%. Ordination based on principal components analysis (PCA) revealed presented that more than 97% of total diversity with two components was described. Centromeric index and long arm length had the most roles in the components, respectively. Cluster analysis using UPGMA method, also grouped the genotypes in four clusters and 100 promising clones were separated from the others, similar to result of PCA Bi-plot, relatively.

Keywords: *Camellia sinensis*, Chromosome, Karyotype, Multivariate Analysis

نویسنده مسئول: مهران غلامی

E-mail: mehrangholami@yahoo.com

مقدمه

چای (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze.) یکی از مهمترین گیاهان نوشابه‌ای در سراسر دنیا است که بیشترین مصرف پس از آب را به خود اختصاص داده و مصرف جهانی آن رو به افزایش است (Owuor, 2010).

گونه‌های اصلی چای زراعی شامل *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze با برگ‌های کوچک، *Camellia assamica* (Masters) با برگ‌های بزرگ و *Camellia assamica* (Planchon ex Watt) ssp.*lasiocalyx* با اندازه برگ‌های متوسط که به‌ترتیب به‌نام تیپ‌های زراعی چینی، آسامی و کامبوجی مشهورند. اگرچه همه تیپ‌های زراعی چای به مقدار زیادی از نظر ژنتیکی ناهمگن هستند و به‌طور آزادانه درون زادآوری دارند، اما تیپ زراعی چینی طیف وسیع‌تری نسبت به چای آسامی دارد. دورگ‌گیری‌های طبیعی وسیع سبب بروز اشکال در شناخت واریته‌های خالص چینی، آسامی و کامبوجی می‌شود. چای زراعی به‌طور عمده براساس عملکرد، کیفیت و مقاومت در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده، از درون موادگیاهی موجود در هر منطقه انتخاب می‌شود. به‌همین دلیل اگر در استفاده از ارقام کلونی پراکنده‌شده از منشاء اصلی‌شان دقت نشود، گسترش وسیع سطح زیرکشت ارقام کلونی چای می‌تواند سبب کاهش تنوع ژنتیکی شود (Mondal. 2002). استفاده از مطالعات سیتوژنتیکی می‌تواند به‌عنوان یکی از ابزارهای شناخت تنوع ژنتیکی با هدف اصلاح ارقام جدید و نیز حفاظت از منابع ژنی باشد.

بر اساس تجزیه فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی کروموزوم‌های *C. japonica* با یدید پروپیدیوم، تعداد کروموزوم‌های این گونه ۲n=۳۰ گزارش شده است. اما به‌طور کلی به‌دلیل اندازه کوچک کروموزوم‌های چای و چسبندگی آن‌ها، تمایل به توده‌شدن در کروموزوم‌های این گیاه زیاد است و همین موضوع می‌تواند همولوگ‌یابی کروموزوم‌ها و گروه‌بندی کاریوتیپی را سخت نماید. گونه‌های مطالعه‌شده این جنس با ترکیب کاریوتیپی ۸ کروموزوم متاسنتریک، ۴ کروموزوم ساب‌متاسنتریک و ۳ کروموزوم ساب‌تلوسنتریک مشاهده شدند. با این وجود، کلاس‌بندی هفت نمونه ژرم‌پلاسمی از *C. japonica* براساس داده‌های کاریوتیپی، حاکی از تنوع و تغییرپذیری کاریوتیپی در بین آن‌ها بود (Mondal. 2011). Rahman *et al.*, (2010)، ویژگی‌های سیتومورفولوژیکی واریته‌های دو گونه چای *Camellia assamica* و *Camellia sinensis* را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که واریته‌های هر دو گونه، دیپلوئید و ۲n=۳۰ کروموزوم و تیپ کروموزومی متاسنتریک (m) تا ساب‌متاسنتریک (sm) داشتند. براساس مورفولوژی کروموزوم، *C. assamica* کروموزوم‌های بلندتر و ویژگی‌های کروموزومی برتری را نسبت به *C. sinensis* نشان داد. اگرچه هر دو گونه دارای کرموزوم‌های متاسنتریک و ساب‌متاسنتریک و فاقد فشردگی ثانویه (ماهواره) بودند، ولی احتمالاً وجود تغییرات تکاملی کم در *C.sinensis* نسبت به *C.assamica*، نشانه‌ای از قرارگرفتن این گونه در مراحل ابتدایی‌تر تکامل است. تجزیه کاریوتیپ در سه رقم کلونی TV_{23}، TV_{25} و TV_{26} توسط Roy (2006) در هند نشان داد که هر سه ژنوتیپ دارای تعداد کروموزوم پایه برابر با ۱۵ و دیپلوییید و ۲n=۳۰ کروموزوم داشتند. Matharoo *et al.*, (1996) در مطالعه کاریوتیپی دیگری در هند نتیجه گرفتند که نوعی هم‌شکلی در بین کروموزوم‌های چای در ارقام آسامی، کامبوجی و چینی وجود دارد. البته تفاوت کاملاً مشخصی بین بلندترین و کوتاه‌ترین کروموزوم‌ها مشاهده شد، به‌طوری‌که چای‌های تیپ آسامی دارای کروموزوم‌های بلندتری نسبت به تیپ‌های چینی و کامبوجی بودند. عمده چای‌های گروه کامبوجی دارای کروموزوم‌هایی با طول متوسط نسبت به دو گروه دیگر بودند. هر سه گروه چای مورد اشاره، فقط کروموزوم‌های متاسنتریک و ساب‌متاسنتریک داشتند. چون در این تحقیق هیچ فشردگی ثانویه‌ای مشاهده نگردید، مشخص شد که کاریوتیپ چای یا دچار تغییرات تکاملی نشده است و یا این تغییرات بسیار کم بوده است و نتیجه‌گیری شد که کاریوتیپ گیاه چای در مرحله اولیه تکاملی است. تجزیه کاریوتیپی شش واریته کلونی چای در منطقه آسام هند نیز نشان داد که کروموزوم‌ها براساس موقعیت سانترومر و تعداد و ترکیب گروه‌های کروموزومی متفاوت در بین واریته‌ها، در شش گروه مجزا قرار می‌گیرند (Datta *et al.*, 1992). بررسی‌ها نشان می‌دهد که از روش‌های آماری چندمتغیره از جمله تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در تشخیص تنوع‌ژنتیکی بین و درون‌گونه‌ای در مطالعات سیتوژنتیکی جنس‌های *Bunium*، *Carum*، *Cuminum*، *Gossypium*، *Brassica* و *Carthamus* استفاده شده است (Mirzaie Nodoushan *et al.*, 1999). در این تحقیق با استفاده از شمارش تعداد کروموزوم‌ها و اندازه‌گیری خصوصیات مورفولوژیکی کروموزوم‌های متافازی تعدادی از کلون‌های اصلاح‌شده چای، فرمول کاریوتیپی ژنوتیپ‌ها تعیین شد و سپس با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره، میزان فاصله ژنتیکی آن‌ها برای بهره‌برداری در برنامه‌های دورگ‌گیری مصنوعی تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق بر روی دو نوع نمونه شامل نمونه‌های نوک ریشه قلمه‌ها و نیز نوک جوانه‌های نورسته چای، در ۹ ژنوتیپ (به‌شرح جدول ۱) و به‌کمک روش اسکواش (Agayev. 1996) انجام شد. غیر از کلون امیدبخش ۱۰۰ که مراحل پایانی آزمایشات مقایسه عملکرد و کیفیت را برای ثبت و معرفی در استان‌های گیلان و مازندران سپری می‌کند، بقیه ژنوتیپ‌ها در مرحله آزمایشات تحقیقاتی در ایستگاه‌های مرکز تحقیقات چای کشور می‌باشند. برای دستیابی به بهترین روش و نیز مقایسه نمونه‌های مورد استفاده، ابتدا قلمه‌های حاصل از کلون ۱۰۰ در بسترهای ماسه‌ای کشت‌شده و ریشه‌های تازه روییده آن‌ها به‌همراه جوانه‌های نو رسته همین ژنوتیپ با طی کردن مراحل زیر، نتایج قابل مشاهده‌ای ارایه نمودند. از نتایج این مرحله، برای انتخاب بهترین روش و توسعه آن به سایر ژنوتیپ‌ها استفاده گردید. برای پیش تیمارکردن نمونه‌ها، پس از قطع ریشه‌ها به طول ۲ سانتی‌متر و نیز جداسازی نو رسته‌ترین جوانه موجود در غنچه انتهایی (Terminal bud)، نمونه‌ها به‌طور جداگانه در دو محلول آلفابرومونفتالین و ۸- هیدروکسی کینولئین ۰/۰۰۲ مولار و با تیمارهای زمانی ۴، ۶ و ۸ ساعت قرار گرفتند.

جدول ۱- نام ژنوتیپ‌های انتخاب‌شده برای مطالعه سیتوژنتیکی و وضعیت اصلاحی آن‌ها

نام و شماره ژنوتیپ	مبداء	وضعیت اصلاحی
کلون امیدبخش 100 (G1)	ایران	تحت آزمایش در کلیه ایستگاه‌های تحقیقاتی
رقم کلونی DN (G2)	سریلانکا	تحت آزمایش در سه ایستگاه تحقیقاتی
رقم کلونی B-275 (G3)	سریلانکا	نمونه ژرم پلاسمی ایستگاه تحقیقات چای کاشف سیاهکل
کلون 101 برگ‌ریز (G4)	شوروی سابق	تحت آزمایش در سه ایستگاه تحقیقاتی
کلون دارجلینگ 13 (G5)	هند	نمونه ژرم پلاسمی ایستگاه تحقیقات چای فجر لاهیجان
کلون دارجلینگ 21 (G6)	هند	نمونه ژرم پلاسمی ایستگاه تحقیقات چای فجر لاهیجان
کلون دارجلینگ 27 (G7)	هند	نمونه ژرم پلاسمی ایستگاه تحقیقات چای فجر لاهیجان
کلون دارجلینگ 35 (G8)	هند	نمونه ژرم پلاسمی ایستگاه تحقیقات چای فجر لاهیجان
کلون آسامی (G9)	هند	نمونه ژرم پلاسمی ایستگاه تحقیقات چای شهید اسلامی لاهیجان

برای تثبیت تقسیم‌سلولی نیز پس از خارج‌کردن نمونه‌ها از محلول‌های پیش‌تیمار، نمونه‌ها کمی خشک‌شده و سپس به منظور حفظ ساختمان‌سلولی و نیز تثبیت مراحل تقسیم‌سلولی به‌طور هم‌زمان و با شرایط یکنواخت محیطی در دو محلول جداگانه فارمر (اسیداستیک خالص+ اتانول، با نسبت ۱:۳) و لویتسکی (اسید کرومیک ۱٪ + فرمالدئید۱۰٪ با نسبت برابر) به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. در ادامه و پس از خروج نمونه‌ها از محلول تثبیت، ابتدا آن‌ها را در آب جاری شستشو داده (۳ ساعت) و سپس در الکل اتانول ۷۰ درجه نگهداری شدند تا به‌تدریج مورد مطالعه قرار گیرند. در هنگام مطالعه، نمونه‌ها از الکل خارج شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر شستشو داده شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها و به‌منظور نرم کردن بافت نمونه‌ها برای سهولت له‌شدن آن‌ها در زیر لامل، از اسیدکلریدریک یک نرمال در دمای ۶۰°C و به‌مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. برای رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها در این مطالعه، از روش‌های رنگ‌آمیزی با استوکارمن و استوآیرون هماتاکسیلین استفاده شد. پس از تعیین بهترین ترکیب از نوع نمونه، پیش‌تیمار، محلول تثبیت و رنگ مورداستفاده، برای اندازه‌گیری خصوصیات مورفولوژیک کروموزوم‌ها در سه سلول متافازی (سه تکرار) از نرم‌افزار Micromeasure 3.3 استفاده گردید. خصوصیات مورفولوژیک اندازه‌گیری‌شده بر روی کروموزوم‌ها عبارت بودند از، طول کل کرموزوم (L)، طول بازوی بلند (P)، طول بازوی کوتاه (Q)، نسبت طول بازوی بلند به کوتاه (P/Q) و کوتاه به بلند (Q/P)، نسبت طول بازوی بلند به طول کل کروموزوم (P/L)، نسبت طول بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم (Q/L) و شاخص سانترومری (CI) که در سه سلول متافازی مورد بررسی قرار گرفت. پس از اندازه‌گیری خصوصیات مختلف کروموزومی در سه سلول، نسبت به همولوگ‌یابی کروموزوم‌ها اقدام و داده‌های حاصل بر حسب ژنوتیپ و عدد پایه کروموزومی (X=۱۵) مرتب گردیدند. سپس داده‌ها در قالب آزمایش آماری فاکتوریل با دو فاکتور (ژنوتیپ و کروموزوم) در پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس گردیدند (Mehrpur *et al.*, 2002; Mirjani *et al.*, 2005; Mirzaie Nodoushan *et al.*, 2006; Nazari *et al.*, 2012). مقایسه میانگین‌ها نیز به روش چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. سپس تعدادی از آماره‌های لازم برای سنجش تقارن کاریوتیپی نظیر، درصد شکل کلی

(TF%)، اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL%)، طول یک سری کروموزومی بر حسب میکرون (TL) و نسبت طول بلندترین کروموزوم به کوتاه‌ترین کروموزوم (L/S) نیز محاسبه شد. برای تعیین نوع کروموزوم در ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده چای از روش Levan (1964) استفاده گردید. همچنین به‌کمک روش کارل پیرسون، همبستگی بین ژنوتیپ‌ها براساس ویژگی طول کل کروموزوم محاسبه گردید. در ادامه، با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره شامل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه کلاستر، داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند تا میزان تنوع‌ژنتیکی موجود در بین ژنوتیپ‌های تحت مطالعه را منعکس نمایند. تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزارهای MSTAT-C و $SPSS_{ver.9}$ انجام گردید.

نتایج و بحث

بررسی‌های میکروسکوپی و مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از اعمال ۲۴ ترکیب مورد آزمایش (دو نوع محلول پیش تیمار با سه تیمار زمانی، دو نوع محلول فیکساتیو و دو نوع محلول رنگی) بر روی نوک ریشه‌های ژنوتیپ G1 (کلون امیدبخش ۱۰۰)، مشخص نمود که استفاده از پیش‌تیمار آلفابرومونفتالین (۸ ساعت)، تثبیت نمونه‌ها با محلول فارمر (۲۴ ساعت) و نیز رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها با محلول رنگی آستوآیرون هماتاکسیلین، بهترین نتیجه را از نظر مقایسه مشاهده‌ای در وضوح کروموزوم‌ها و قابلیت اندازه‌گیری ویژگی‌هایشان نسبت به سایر ترکیب‌های به‌کار گرفته شده، ارایه نمود. کاربرد محلول آلفابرومونفتالین برای پیش تیمارکردن و محلول فارمر برای تثبیت نمونه‌ها در مرحله متافاز که در برخی تحقیقات قبلی مورد استفاده قرار گرفته بود (Magambo and Marangu. 1984; Wachira and Muoki. 1997; Caiqiong and Guolu. 1998)، در این مطالعه نیز نتایج قابل قبولی ارایه کرد. مقایسه نتایج استفاده از محلول‌های رنگی استوآیرون هماتاکسیلین و استوکارمن نیز حاکی از رنگ‌پذیری بیشترکروموزوم‌های چای با محلول اول بود. با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز استفاده از آن در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی دیگر (Agayev. 1996)، قابل توصیه خواهد بود. نتایج نشان داد که همه ژنوتیپ‌های تحت آزمایش دیپلوییدبوده و۲n=۳۰ کروموزوم داشتند (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (همه توزیع نرمال داشتند) نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها، بین کروموزوم‌ها و نیز بین اثرات متقابل ژنوتیپ×کروموزوم از نظر همه خصوصیات کروموزومی بررسی شده، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۲). آماره‌های حداقل، حداکثر، واریانس، انحراف‌معیار و اشتباه استاندارد نیز برای هر یک از خصوصیات مذکور محاسبه شد (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های نرمال برای صفات مورفولوژیک کروموزوم‌های ژنوتیپ‌های چای

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)							
		طول کل کروموزوم	طول بازوی بلند	طول بازوی کوتاه	نسبت بازوی بلند به کوتاه	نسبت بازوی کوتاه به بلند	نسبت بازوی بلند به کل	نسبت بازوی کوتاه به کل	شاخص سانترومری
ژنوتیپ	8	1.390**	0.379**	0.576**	1.067**	0.104**	0.014**	0.017**	0.016**
کروموزوم	14	20.238**	7.564**	2.671**	0.537**	0.049**	0.007**	0.009**	0.008**
ژنوتیپ×کروموزوم	112	0.094**	0.103**	0.078**	0.349**	0.040**	0.006**	0.005**	0.006**
خطا	270	0.005	0.007	0.006	0.032	0.003	0.001	0.001	0.00046
ضریب تغییرات (٪)		2.09	4.36	6.39	10.52	8.85	3.98	6.38	5.67
میانگین کل		3.305	1.920	1.172	1.696	0.619	0.580	0.353	0.378

** به مفهوم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳- آماره‌های برآورد شده برای صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها در همه ژنوتیپ‌ها (بر حسب میکرون)

آماره	حداقل	حداکثر	واریانس	انحراف معیار	اشتباه استاندارد
طول کل کروموزوم (L)	1.150	4.425	0.758	0.871	0.043
طول بازوی بلند (P)	0.575	2.640	0.303	0.550	0.027
طول بازوی کوتاه (Q)	0.230	1.735	0.129	0.360	0.018
طول بازوی بلند به کوتاه (P/Q)	1.028	3.164	0.158	0.397	0.020
طول بازوی کوتاه به بلند (Q/P)	0.316	0.973	0.017	0.129	0.006
طول بازوی بلند به طول کل (P/L)	0.424	0.701	0.002	0.050	0.002
طول بازوی کوتاه به طول کل (Q/L)	0.207	0.463	0.002	0.050	0.002
شاخص سانترومری (CI)	0.240	0.493	0.003	0.051	0.003

وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها، بین کروموزوم‌ها و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و وابسته‌بودن کروموزوم‌ها به ژنوتیپ‌ها است. مطالعه Sheidai *et al.*, (2004) بر روی خصوصیات کروموزوم‌های میوزی ۶ رقم چای در ایران نشان داد که همگی دیپلوییید و تعداد کروموزوم پایه در آن‌ها x=۱۵ بود. تجزیه واریانس خصوصیات کروموزوم‌های میوزی ارقام مورد بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌ها از نظر چهار صفت کیاسمای انتهایی، کیاسمای اضافی، کیاسمای کل و بی‌والنت میله‌ای دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بودند. نتایج یک مطالعه سیتوژنتیکی روی ۸ رقم چای در کنیا نیز نشان داد که بین کروموزوم‌ها (x=۱۵) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد از نظر طول کل کروموزوم وجود دارد (Wachira *et al.*, 1999). از آنجا که تنوع ژنتیکی به‌عنوان اصلی‌ترین ابزار کار به نژادگران گیاهی محسوب می‌شود و نیز مطالعه کاریوتیپ و خصوصیات مورفولوژیک کروموزوم‌ها راهی برای مطالعه تنوع ژنتیکی است، تنوع موجود بین ارقام و ژنوتیپ‌های چای براساس این خصوصیات مورد ارزیابی و دسته‌بندی قرار گرفت.

دامنه تغییرات طول کل کروموزوم‌ها در این تحقیق از حداقل ۱/۱۵ میکرون برای کوتاه‌ترین کروموزوم تا حداکثر ۴/۴۲ میکرون برای بلندترین کروموزوم به‌دست آمد (جدول۳). Roy (2006) دامنه تغییرات طول کل کروموزوم در ۳ رقم چای معرفی‌شده در هند را از ۲/۱ میکرون تا ۴/۲ میکرون گزارش نمود. مطالعه سیتوژنتیکی ۸ رقم چای در کنیا نیز نشان داد که این دامنه از حداقل۲/۸۰ میکرون تا حداکثر ۳/۵۶ میکرون متفاوت است (Wachira *et al.*, 1999)، درحالی‌که این تغییرات در چین از ۲ تا ۵ میکرون (Guo-Lu *et al.*, 1992) و در هند ۱/۲۸ تا ۳/۴۴ میکرون (Bezbaruah. 1971) گزارش شده است.

برای مقایسه میانگین ویژگی‌های کروموزومی ژنوتیپ‌ها از روش چنددامنه‌ای دانکن (۵ درصد) استفاده شد (جدول ۴). نتایج نشان داد که ژنوتیپ G7 از نظر طول کل کروموزوم، طول بازوهای بلند و کوتاه در بالاترین کلاس قرار گرفت. درحالی‌که ژنوتیپ G1 از نظر دوصفت دیگر (نسبت طول بازوی بلند به طول بازوی کوتاه و نسبت طول بازوی بلند به طول کل کروموزوم) حائز رتبه اول گردید. ژنوتیپ G8 نیز از نظر سه خصوصیت باقی‌مانده (نسبت طول بازوی کوتاه به بازوی بلند، نسبت طول بازوی کوتاه به‌طول کل کروموزوم و شاخص سانترومری) در بالاترین گروه قرار داشت. ژنوتیپ G1 از نظر شش خصوصیت اندازه‌گیری‌شده حائز پایین‌ترین رتبه گردید و در دو صفت باقی‌مانده یعنی نسبت طول بازوی بلند به طول بازوی کوتاه و نیز نسبت طول بازوی بلند به طول کل کروموزوم ژنوتیپ‌های G8 و G5 به‌ترتیب در پایین‌ترین کلاس گروه خود قرار گرفتند. دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها به‌کمک مقایسه میانگین خصوصیات کروموزومی آن‌ها مشخص کرد که ژنوتیپ‌ها از نظر طول کل کروموزوم به ۵ دسته مجزا و از نظر طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه به ترتیب به ۷ و ۶ گروه تفکیک می‌شوند. وجود این اختلاف در بین ویژگی‌های کروموزومی، بر لزوم تجزیه‌های آماری چندمتغیره تاکید می‌کند.

با توجه به اهمیت ویژگی طول کل کروموزوم و نقش آن در برآورد میزان همبستگی کاریوتیپی ژنوتیپ‌ها، از ضریب همبستگی کارل پیرسون برای محاسبه مقدار همبستگی ژنوتیپ‌ها استفاده شد (جدول ۵). نتایج به‌دست‌آمده حاکی از معنی‌داربودن همبستگی مثبت کلیه ژنوتیپ‌ها با یکدیگر در سطح احتمال ۱ درصد بود. اما بیشترین و کمترین همبستگی کاریوتیپی براساس طول کل کروموزوم به‌ترتیب به همبستگی ژنوتیپ‌های G4 و G8 (r = ۰/۹۹۸**) و همبستگی بین ژنوتیپ‌های G2 و G9 (r = ۰/۹۶۴**) تعلق گرفت.

جدول ۴- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از نظر ویژگی‌های مختلف کروموزومی (به‌روش دانکن)

ژنوتیپ ها	CI	Q/L	P/L	Q/P	P/Q	Q	P	L
G1	0.339^{d}	0.308^{c}	0.602^{a}	0.522^{e}	2.031^{a}	0.925^{g}	1.811^{f}	3.001^{e}
G2	0.367^{c}	0.346^{b}	0.595^{ab}	0.589^{d}	1.769^{b}	1.177^{de}	2.032^{b}	3.391^{b}
G3	0.392^{ab}	0.366^{a}	0.569^{d}	0.650^{bc}	1.574^{ef}	1.200^{cd}	1.851^{e}	3.269^{c}
G4	0.366^{c}	0.345^{b}	0.597^{ab}	0.586^{d}	1.777^{b}	1.082^{f}	1.866^{e}	3.102^{d}
G5	0.396^{a}	0.362^{a}	0.552^{e}	0.665^{ab}	1.567^{ef}	1.228^{bc}	1.879^{de}	3.386^{b}
G6	0.374^{c}	0.350^{b}	0.587^{bc}	0.606^{d}	1.725^{bc}	1.147^{e}	1.907^{d}	3.245^{c}
G7	0.385^{b}	0.363^{a}	0.581^{c}	0.636^{c}	1.640^{de}	1.313^{a}	2.091^{a}	3.594^{a}
G8	0.400^{a}	0.372^{a}	0.557^{e}	0.676^{a}	1.527^{f}	1.247^{b}	1.875^{de}	3.364^{b}
G9	0.385^{b}	0.362^{a}	0.577^{cd}	0.639^{c}	1.654^{cd}	1.231^{bc}	1.966^{c}	3.391^{b}

حروف مشابه به مفهوم عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

جدول ۵- همبستگی بین ژنوتیپ‌ها بر حسب طول کل کروموزوم

G1								
0.980**	G2							
0.993**	0.974**	G3						
0.991**	0.992**	0.987**	G4					
0.995**	0.993**	0.989**	0.996**	G5				
0.995**	0.990**	0.994**	0.996**	0.997**	G6			
0.989**	0.995**	0.982**	0.995**	0.997**	0.993**	G7		
0.988**	0.991**	0.984**	0.998**	0.996**	0.995**	0.996**	G8	
0.993**	0.964**	0.994**	0.985**	0.985**	0.991**	0.976**	0.983**	G9

** به مفهوم معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

همچنین به‌منظور سنجش میزان تقارن کاریوتیپی ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده، از محاسبه چهارآماره متعارف (TF% ,DRL,TL و L/S) استفاده شد (جدول ۶). نتایج نشان داد که از نظر درصد TF، ژنوتیپ‌های G1 و G8 به‌ترتیب نامتقارن‌ترین و متقارن‌ترین کاریوتیپ را داشتند. همچنین از نظر آماره‌های DRL و L/S، ژنوتیپ‌های G4 نامتقارن‌ترین و ژنوتیپ G8 متقارن‌ترین کاریوتیپ را داشتند. مقایسه تقارن کاریوتیپی ژنوتیپ‌ها براساس آماره TL نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های G7 و G1 به‌ترتیب دارای حداکثر و حداقل تقارن در بین ارقام مورد مطالعه بودند.

جدول ۶- آماره‌های محاسبه‌شده از خصوصیات کروموزومی برای سنجش تقارن کاریوتیپی ژنوتیپ‌های چای

ژنوتیپ	TF%	DRL%	TL	L/S	فرمول کاریوتیپی
G1	30.84	5.36	45.007	2.308	3m+12sm
G2	34.72	7.16	50.867	3.962	8m+7sm
G3	36.71	5.72	49.033	2.409	12m+3sm
G4	34.88	8.40	46.530	4.833	8m+7sm
G5	36.26	6.78	50.788	3.218	12m+3sm
G6	35.36	6.09	48.681	2.696	9m+6sm
G7	36.53	5.79	53.909	2.722	8m+7sm
G8	37.07	5.03	50.466	2.784	12m+3sm
G9	36.29	6.82	50.863	2.806	9m+6sm

برای تعیین فرمول کاریوتیپی ژنوتیپ‌های چای از روش Levan (1964) استفاده شد (جدول۶). بررسی فرمول‌های مذکور نشان داد که ژنوتیپ‌های G2، G4 و G7 دارای فرمول کاریوتیپی مشابهی (۸m+۷sm) هستند. از سوی دیگر، ژنوتیپ‌های G3، G5 و G8 هم فرمول کاریوتیپی مشابهی (۱۲m+۳sm) داشتند. همچنین با توجه به وجود تشابه فرمول کاریوتیپی بین ژنوتیپ‌های G6 و G9 (۹m+۶sm)، G1 کلون امیدبخش ۱۰۰ تنها ژنوتیپ دارای فرمول کاریوتیپی منحصر به فرد (۳m+۱۲sm) در این آزمایش بود. در مجموع، کلیه ژنوتیپ‌های تحت مطالعه در این تحقیق دارای دو دسته کروموزوم متاسنتریک و ساب‌متاسنتریک با فراوانی‌های متنوع بودند. یک گزارش از مطالعه کاریوتیپی ۹ گونه و ۲ واریته از جنس *Camellia* در چین نشان داد که ترکیب کروموزوم‌های ژنوتیپ‌های مورد بررسی فرمول کاریوتیپی متنوعی از ۹m+۱۰sm+۲st برای گونه *yunnanensis* تا ۱۲m+۲sm+۲st برای گونه *leptophylla* داشتند، و البته سایر گونه‌ها و واریته‌ها فاقد ماهواره بودند (Zhang and Min. 1999).

نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی که در جداول ۷ و ۸ خلاصه شده است، نشان داد که برای ایجاد مؤلفه اول، شاخص سانترومری دارای بیشترین نقش (۰/۳۹۰) بوده و پس از آن سه خصوصیت طول بازوی کوتاه، نسبت طول بازوی کوتاه به بازوی بلند و به طول کل کروموزوم از اهمیت برجسته‌ای برخوردارند. مؤلفه اول به‌تنهایی قادر به بیان بیش از ۷۸ درصد واریانس موجود در داده‌ها بود. در خصوص مؤلفه دوم نیز بیشترین نقش به طول بازوی بلند (۰/۷۳۹) و طول کل کروموزوم (۰/۴۲۲) تعلق گرفت و این مؤلفه توانست بیش از ۱۹ درصد از واریانس بین داده را منعکس نماید. بررسی

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که این دو مؤلفه به‌طور تجمعی بیش از ۹۷ درصد از تغییرات موجود را بیان می‌کنند. البته با اضافه‌شدن مؤلفه سوم به دو مؤلفه قبلی، واریانس تجمعی فقط به میزان ۲ درصد افزایش یافت. با وجود کوچک‌بودن مقدار ویژه مؤلفه اخیر، نتایج نشان داد که دو خصوصیت نسبت طول بازوی کوتاه به بلند و نیز نسبت طول بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم در تشکیل مؤلفه سوم هم دارای سهم بیشتری بوده‌اند.

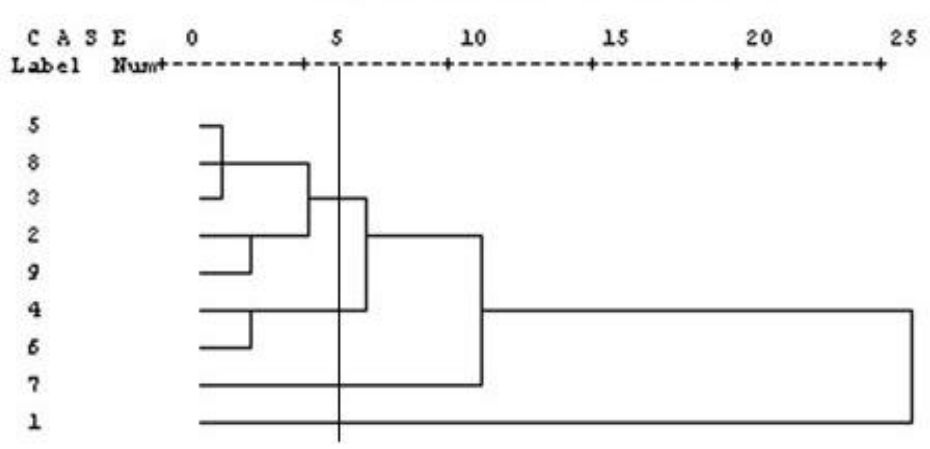
جدول ۷- آماره‌های تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌ترتیب اهمیت خصوصیات کروموزومی برای سه مؤلفه اول

مؤلفه	مقدار ویژه	واریانس (٪)	واریانس تجمعی	بردار ویژه، ضرایب							
				CI	Q/L	Q/P	Q	L	P	P/L	P/Q
اول	6.270	78.37	78.37	0.390	0.389	0.389	0.384	0.332	0.157	-0.334	-0.389
دوم	1.546	19.33	97.70	-0.173	-0.043	-0.181	0.217	0.422	0.739	0.375	0.154
سوم	0.177	2.21	99.91	0.094	0.519	0.017	0.074	-0.426	-0.017	0.685	-0.255

جدول ۸- شاخص‌های محاسبه‌شده تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای خصوصیات کروموزومی ژنوتیپ‌های چای

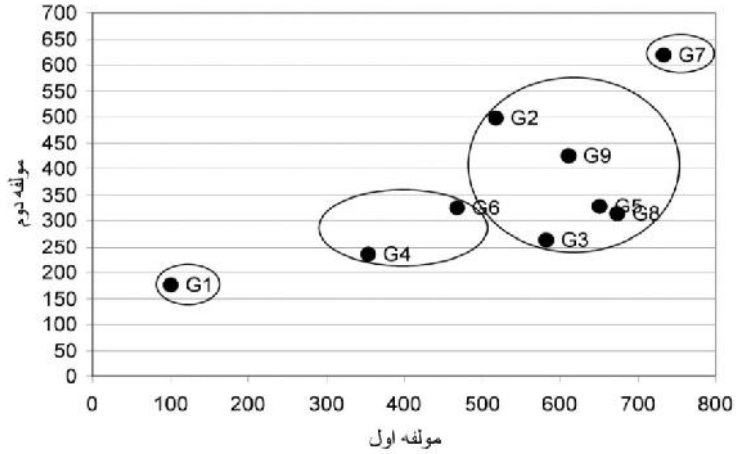
ژنوتیپ	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم
G1	1.101	3.176	-1.144
G2	1.518	3.498	-1.210
G3	1.583	3.262	-1.107
G4	1.354	3.235	-1.093
G5	1.652	3.327	-1.167
G6	1.469	3.323	-1.139
G7	1.733	3.619	-1.253
G8	1.675	3.312	-1.137
G9	1.611	3.424	-1.176

با استفاده از تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از اندازه‌گیری هشت خصوصیت کروموزومی مورد مطالعه که به‌روش UPGMA انجام گرفت، و برش درخت‌واره (Dendrogram) حاصل از ناحیه ۶ واحد، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد (شکل ۱). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های G5، G8، G3، G2 و G9 گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های G4 و G6، گروه سوم که فقط یک ژنوتیپ G7 در آن قرار دارد و گروه چهارم هم که تنها ژنوتیپ G1 را شامل گردید. در مطالعه Sheidai *et al.*, (2004) بر روی ژنوتیپ‌های چای ایران، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با کمک ۱۰ خصوصیت از کروموزوم‌های میوزی مشخص نمود که ۹۸ درصد از کل تغییرات با سه مؤلفه اول توجیه پذیرند. همچنین گروه‌بندی ژنوتیپ‌های موصوف با استفاده از ترسیم پلات دو عاملی و نیز تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA نشان داد که ارقام در سه کلاس جدا گروه‌بندی می شوند.

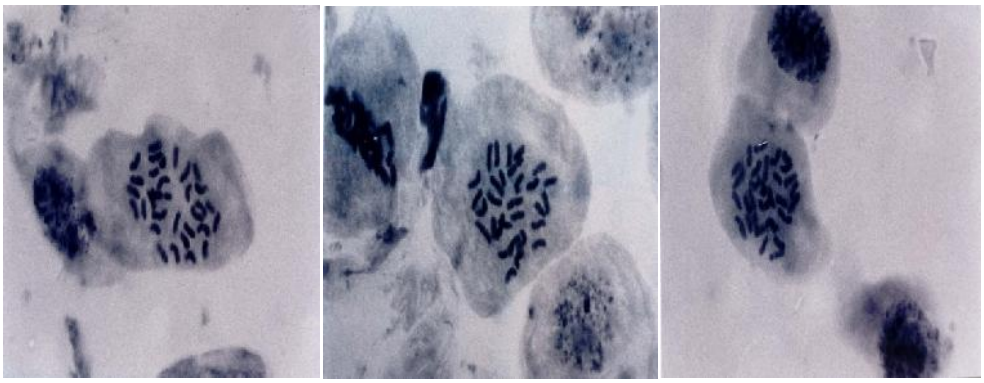


شکل ۱- درخت‌واره حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹ ژنوتیپ چای به‌روش UPGMA

سپس با محاسبه مختصات ژنوتیپ‌های تحت آزمایش براساس شاخص‌های تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (جدول۸)، پلات دو عاملی چای‌های مورد بررسی برای دسته‌بندی آن‌ها ترسیم گردید (شکل۲). البته این گروه‌بندی تا حدودی با دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای تطابق داشت.



شکل ۲- پلات دو عامل اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌منظور دسته‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌های چای بر مبنای داده‌های کاریوتیپی



(C) (B) (A)

شکل۳- کروموزوم‌های متافازی. A) کلون امیدبخش ۱۰۰، B) رقم کلونی DN، C) کلون دارجلینگ شماره ۳۵

در این مطالعه کروموزوم‌های ماهواره‌دار مشاهده نشد. چنین نتیجه‌ای در مطالعه Rahman *et al.*, (2010) در پاکستان نیز گزارش شده است. علاوه بر آن، در مطالعه سیتوژنتیکی روی ارقام کنیایی نیز عدم‌وجود ماهواره گزارش شده است و علت آن را با وراثت‌پذیری فعالیت کم نواحی سازمان‌دهنده هستک (NORs) که سبب ناتوانی گیاه چای در تولید فشردگی ثانویه می‌شود و یا ناتوانی روش‌های به‌کار رفته، مرتبط دانسته‌اند. البته، برای مشاهده کروموزوم‌های دارای فشردگی ثانویه، استفاده از سلول‌هایی که در پایان مرحله پروفاز از تقسیم میتوز یا میوز هستند و نیز رنگ‌آمیزی نقره توصیه شده است (Wachira *et al.*, 1999). یک مطالعه سیتوژنتیکی روی ۹ نمونه چای در چین نیز نشان داد که شناسایی کروموزوم‌های ماهواره‌دار در گیاه چای به آسانی امکان‌پذیر نیست (Guo-Lu *et al.*, 1992).

همبستگی دوگانه بسیار بالایی که در بین ژنوتیپ‌های چای از نظر طول کل کروموزوم به‌دست آمد، نشانه‌ای از عدم تغییرات ناهمگون بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر این خصوصیت است. لازم به ذکر است که جابه‌جایی قطعات کروموزومی از یک کروموزوم به کروموزوم دیگر منجر به ناهمگنی بین ژنوتیپ‌ها از نظر طول کل کروموزوم می‌گردد (Sheidaii. 2001). بررسی نتایج یک تحقیق در چین که به‌منظور ارزیابی تنوع کاریوتیپی و تکامل گونه‌های چای انجام شده است، علت بروز تنوع کاریوتیپی در بین گونه‌های چای را با جابجایی متقابل قطعات کروموزومی یا وارونگی پری‌سنتریک مرتبط می‌داند (Guo-Lu *et al.*, 1994). بنابراین برطبق مقایسه نتایج این تحقیق با یافته‌های دیگر محققان، می‌توان اذعان نمود که چنین تغییراتی یا بین کروموزوم‌های این چای‌ها اتفاق نیفتاده است و یا اگر هم اتفاق افتاده باشد، آن چنان ضعیف بوده که سطح آماری قابل قبول را ایجاد نکرده است.

با توجه به آن که اندازه طول کل کروموزوم می‌تواند بیانگر مقدار DNA موجود در هسته باشد (Sheidaii.

(2001، بررسی مقایسه‌ای کاریوتیپ ژنوتیپ‌های چای و برآورد همبستگی بالا بین آن‌ها براساس طول کل کروموزوم می‌تواند نشانگر هم‌راستابودن همبستگی تغییرات کمی ماده ژنتیکی در آن‌ها باشد. به‌نظر می‌رسد همه ژنوتیپ‌های این مطالعه که از لحاظ طول کل کروموزوم دارای همبستگی بیش از ۰/۹۶۴ بودند، از نظر مقدار DNA نیز باید همبسته باشند. هر چند که این همبستگی در بین برخی ژنوتیپ‌ها (G4 و G8) به‌مقدار ۰/۹۹۸ به‌دست آمد، ولی نتیجه‌گیری‌های فوق نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری دارد.

ارزیابی تقارن کاریوتیپی ژنوتیپ‌های چای در این بررسی نیز با هدف تشخیص موقعیت تکاملی آن‌ها انجام شد. چنین به‌نظر می‌رسد که کاریوتیپ متقارن در مقایسه با کاریوتیپ نامتقارن، موقعیت تکاملی ابتدایی‌تری دارد. این نتیجه با مطالعه گونه‌های ابتدایی و پیشرفته در یک جنس به‌دست آمده است (Sheidaii. 2001). بررسی خصوصیات کاریولوژیکی چای در کنیا نشان داد که کاریوتیپ این گیاه به مقدار زیادی از تغییر محفوظ مانده است. به‌طوری‌که پایداری مورفولوژی کروموزوم‌های چای درکنیا و نواحی دیگر مشخص‌کننده اوج تکامل در آن‌ها است و می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که فرم‌های موجود، بازماندگان یک انتخاب طبیعی طولانی هستند (Wachira *et al.*, 1999).

مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از آماره‌های سنجش تقارن کاریوتیپی در این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ G1 (کلون امیدبخش ۱۰۰) از نظر دو آماره، نامتقارن‌ترین و ژنوتیپ G8 (کلون دارجلینگ شماره ۳۵) از نظر سه آماره سنجش تقارن کاریوتیپی، متقارن‌ترین ژنوتیپ است. لازم به ذکر است با توجه به این که برای محاسبه هر یک از آماره‌های سنجش تقارن کاریوتیپی از یک ویژگی خاص کروموزوم‌ها استفاده می‌شود، لزوماً نباید نتایج حاصل از آن‌ها کاملاً مشابه یکدیگر باشد (Mirzaie Nodoushan *et al.*, 1999). با توجه به این که ژنوتیپ G1 یک کلون انتخابی و در جریان برنامه اصلاحی است، نتیجه به‌دست‌آمده برای آن دور از انتظار نبود. مطالعات انجام‌یافته در چین نیز نشان داده است که چای‌های زراعی، عموماً از کاریوتیپ‌های متقارن‌تری نسبت به چای‌های وحشی برخوردارند (Tong *et al.*, 1999). مطالعات نشان داد که استفاده از روش اِستبینز هم در گیاه چای می‌تواند کاریوتیپ‌های متقارن و نامتقارن را از یکدیگر تفکیک نماید (Guo-Lu *et al.*, 1992).

با استفاده از نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، از دو مؤلفه اول که بیش از ۹۷ درصد واریانس موجود در داده‌های کاریوتیپی را توجیه نموده‌اند، برای رسم نمودار پراکنش ارقام در یک محور مختصات استفاده شد (شکل ۲). با دقت به این نکته که شاخص سانترومری، طول بازوی کوتاه و نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزم و طول بازوی بلند در ایجاد مؤلفه اول نقش اساسی را ایفا نموده‌اند و نیز طول بازوی بلند و طول کل کروموزوم در ایجاد مؤلفه دوم سهم بیشتری داشتند، به‌نظر می‌رسد که استفاده از این دو مؤلفه می‌تواند در تفکیک ژنوتیپ‌ها و دسته‌بندی آن‌ها موفق عمل نماید. در این مطالعه ژنوتیپ‌های G1 و G7 با بیشترین فاصله نسبت به سایرین در دو گروه مجزا قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های G3، G5، G8، G9 و G2 را که کمترین فاصله را نسبت به هم دارند، با کمی اغماض برای ژنوتیپ G2، می‌توان در یک گروه قرار داد و ژنوتیپ‌های G4 و G6 را در گروه مجزا دیگری گروه‌بندی نمود.

شناسایی تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مجزا، دو زمینه مطالعاتی وابسته به یکدیگرند که نتایج آن‌ها می‌تواند در اجرای صحیح برنامه‌های اصلاحی کارگشا باشد. در دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس ویژگی‌های کاریوتیپی، دورترین دسته‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای، دارای بیشترین ناهماهنگی از نظر ساختار کروموزومی هستند (Mirzaie Nodoushan *et al.*, 1999). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای چای‌های مطالعه‌شده از نظر کلیه ویژگی‌های کروموزومی جداشدن ژنوتیپ G1 (کلون امیدبخش ۱۰۰) دور از انتظار نبود؛ چرا که این ژنوتیپ هم از لحاظ محل جغرافیایی و هم از نظر بسیاری از خصوصیات کاریوتیپی مطالعه‌شده، دارای تفاوت‌های مشخص با سایر ژنوتیپ‌ها بود. اما قرارگرفتن ژنوتیپ های G2 (رقم کلونی DN) **و**G3 (رقم کلونی B-275) که هر دو از ارقام معرفی‌شده در سری‌لانکا هستند و ژنوتیپ‌های G5 و G8 که هر دو از کلون‌های دارجلینگ (هند) هستند، در کنار تنها کلون آسامی موردمطالعه در این تحقیق می‌تواند نشانه‌ای از قرابت ژنتیکی این کلون‌ها به منشاء آسامی و احتمال درون‌آمدگی بخشی از ژنوم گونه زراعی آسامی به ژنوم این کلون‌ها باشد. اما هم‌گروه‌شدن ژنوتیپ‌های G4 (کلون ۱۰۱ برگ‌ریز) و G6 (کلون دارجلینگ ۲۱) که از دو منشاء نسبتاً دور (به‌ترتیب از شوروی سابق و هند) هستند را می‌توان با تشابه مورفولوژیکی این کلون‌ها مرتبط دانست. کلون دارجلینگ ۲۱ دارای برگ‌های کوچک‌تری نسبت به سایر کلون‌های این خانواده است و تشابه بیشتری به گونه زراعی *sinensis* دارد.

اگرچه اثرپذیری خصوصیات مورفولوژیک از محیط و بروز اشتباهات آزمایشی به‌عنوان عواملی برای ایجاد تفاوت بین نتایج مطالعات مورفولوژیکی در مزرعه و مطالعات سیتوژنتیکی در آزمایشگاه شناخته می‌شوند، ولی به‌نظر می‌رسد که نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های چای به‌کمک خصوصیات کاریوتیپی با شناخت مورفولوژیکی که از آن‌ها وجود دارد و نیز منشاء جغرافیایی شناخته‌شده آن‌ها، تطابق نسبی دارد. بدیهی است وقتی که از داده‌های حاصل از صفات مورفولوژیک برای تجزیه کلاستر استفاده می‌شود، تلاقی افراد دورترین دسته‌ها می‌تواند منجر به خلق بیشترین تنوع‌ژنتیکی شود. حال آن که تلاقی افراد دورترین دسته‌های حاصل از تجزیه کلاستر خصوصیات کروموزومی، به‌دلیل ناهماهنگی ساختار کروموزومی، ممکن است به ایجاد ناسازگاری‌های ژنتیکی از جمله ضعف باروری و تولیدمثل منجر گردد (Mirzaie Nodoushan *et al.*, 1999). البته در خصوص گیاه چای که هدف از تولید ارقام اصلاح‌شده آن دست‌یابی به رشد رویشی (محصول برگ) بیشتر است این نکته صادق نیست. بنابراین، برای دست‌یابی به پدیده‌هایی نظیر هتروزیس (قدرت دورگ) و ترانسگرسیون (تفکیک متجاوز) در چای، تلاقی ژنوتیپ‌های موجود در دسته‌های دور از هم قابل توصیه خواهد بود.

REFERENCES

Agayev YM (1996) Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. In: Proceeding of the 4th Iranian Congress on Crop Production and Breeding Science. Esfahan. Iran. pp. 1-20.

Bezbaruah HP (1975) Cytological investigations of the family Theaceae-II. Cytology of a triploid tea. Experimental Agriculture. 2: 17-22.

Caiqiong Z, Guolu L (1998) Studies on chromosome technique in Tea plants. Journal of Tea Science. 18(1): 34-43.

Datta M, Agrawal B, Datta M, Agrawal B (1992) Intervarietal differences in karyotype of Tea. Cytologia. 57(4): 437-441.

Dutta RM, Choudhuri S (1975) Karyomorphology of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, the tea plant. Current Research Bangalore India. 4(12): 212-213.

Guo-Lu L, Meng-Jia L, Jia-Yu C, Jun-Su L (1992) Cytotaxonomical Studies of Tea Plants. Acta Phytotaxonomical Sinica. 30(6): 498-507.

Guo-Lu L, Cai-Qiong Z, Meng-Jia L, Jia-Yu C, Jun-Su L (1994) Karyotype variation and evolution of Sect. Thea in Guizhou. Acta Phytotaxonomical Sinica. 32(4): 308-315.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52(2): 201-220.

Li SF (1992) Observations on the chromosome behavior of Tea. China-Tea. 14(2): 16-17.

Magambo MJS, Marangu JP (1984) Preliminary observations on chromosome number of some Kenya tea clones. Tea. 5(1): 23-27.

Matharoo AK, Konwar BK, Thakur AC (1996) Karyotype study and polyploidy inducibility in Tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze). Proceeding of the seminar on problems and prospects of Agricultural Research and Development in North-East India. pp., 64-68.

Mehrpur S, Mirzaie Nodoushan H, Majd A, Sefidkon F (2002) Karyotypic Studies of Two Thymus Species. Cytologia. 67(4): 343-346.

Mirjani L, Mirzaie Nodoushan H, Ghamarizare A, Bakhshi-khaniki Gh, (2005) Karyotypic investigations in several populations of *Festuca arundinacea*. Paj. Saz. 65: 84-90.

Mirzaie Nodoushan H, Hajmoniri M, Sheidaii M, Najahi R, Ahmadi M (1999) Cytogenetical investigation of rape (*Brassica napus*) cultivars and karyotypes correlations. Paj. Saz. 46: 32-37.

Mirzaie Nodoushan H, Hooshmand M, Sheidaii M, Najahi R, Ahmadi M (1999) Cytogenetical study of florid (*Carthamus tinctorius*) cultivars. Paj. Saz. 46: 32-37.

Mirzaie Nodoushan H, Dehghanshoar M, Maddah-arefi H, Asadi-corom F (2006) Karyotypic characteristics of several *Bromus* species. International Journal of Agriculture & Biology. 8(6): 717-720.

Mondal TK (2002) Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* L.) O.Kuntze) by inter-simple sequence

repeat polymerase chain reaction. Euphytica. 128: 307-315.

Mondal TK (2011) *Camellia*. In: Kole C (ed) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, 1st Edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 15-39.

Nazari Z, Mirzaie Nodoushan H, Bakhshi-khaniki Gh, and Asadi-corom F (2012) Karyotypic characteristics of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori in Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 27(4): 635-646.

Owour PO, Wachira FN, Ng'etich WK (2010) Influence of region of production on relative clonal plain tea quality parameters in Kenya. Food Chemistry. 119: 1168-1174.

Rahman H, Khalil IH, Abbasi FM, Khanzada ZT, Shah SMA, Shah Z, Ahmad H (2010) Cytomorphological characterization of tea cultivars. Pak. J. Bot. 42(1):485-495.

Roy SC (2006) Karyotype analysis in three cultivated varieties of tea for their characterization. Journal of Phytological Research 19(2): 203-207.

Sheidaii M (2001) Cytogenetic. First publishing, Adena Press, Tehran, 406 p.

Sheidaii M, Jahanbakht H, Sofi-Siyavash P (2004) Cytogenetic study of various types of tea (*Camellia sinensis* L.) cultivars in Iran. Iranian Journal of Science and Technology. 28: 33-42.

Tong G, Xiangpin W, Zijin Z (1999) Study on the cytology of wild tea plant in Fujian. Journal of Tea Science. 19(1): 17-23.

Wachira FN, Muoki RC (1997) Nucleolar and nucleolus organizer regions activity in tea as visualized by silver staining. African Crop Science Journal 5(3): 253-258.

Wachira FN, Germano DEN, Magambo MJS (1999) A comparative Inter-specific karyotype analysis in some Kenya tea cultivars, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Discovery and Innovation 11(3): 199-206.