بررسی تنوع کلون‌های انتخابی چای به کمک نشانگرهای شیمیایی برگ سبز و چای خشک

مهران غلامی[*1]، کوروش فلکرو[2]، سیداحمد تقی شکرگزار[2]، شیوا روفی‌گری حقیقت[2]، معصومه جمال‌امیدی[3]

[*1] بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت

[2] پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان

[3] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران

[*] نویسنده مسئول: mehrangholami@yahoo.com

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های انتخابی چای و تحلیل رگرسیون بین خصوصیات شیمیایی برگ سبز و چای خشک با رتبه آزمون حسی نو شابه؛ به کمک نمونه‌برداری از برگ سبز کلون‌های انتخابی چای در ایستگاه‌های فومن و لاهیجان، انجام شد. مقادیر کل پلی‌فنل‌ها و عصاره آبی برگ سبز به روش‌های اسپکتروفتومتری و وزنی تعیین شد و چایسازی مینیاتوری به روش Orthodox در آزمایشگاه انجام گردید. تئافلاوین، تئاروبیجین، رنگ کل نوشابه، شفافیت نوشابه، تانن و عصاره آبی نیز در آزمایشگاه شیمی اندازه‌گیری شدند. کمیّت کافئیک اسید، کاتچین، اپی‌گالوکاتچین، کوئرستین و کلروژنیک اسید نیز در چای سیاه به کمک HPLC بر روی ۲۴ ژنوتیپ انتخابی (۱۲ ژنوتیپ از هر ایستگاه) در بهار، تابستان و پاییز اندازه‌گیری شدند. آزمون‌های حسی (Organoleptic Tests) رنگ، طعم، عطر و وضعیت تفاله چای دم شده نیز توسط چشنده‌های ماهر انجام شد و نتیجه به صورت رتبه‌بندی، ارایه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های چای نیز اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از آزمون آماره **t** استفاده شد. تحلیل روابط رگرسیونی نشان داد که در ایستگاه فومن، اسید کافئیک چای خشک با ضریب منفی و معنی‌دار و کافیین برگ سبز با ضریب مثبت و معنی‌دار و در ایستگاه لاهیجان، تئافلاوین با ضریب مثبت و معنی‌دار در معادله رتبه ارزیابی حسی (Y) باقی ماندند. تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که چهار مولفه اول، ۷۰ در صد تغییرات در ایستگاه‌ها را توجیه می‌کنند. نتایج تجزیه خوشه‌ای چهار مولفه به روش ward در ایستگاه فومن، کلون‌ها را در ۵ گروه و در ایستگاه لاهیجان، کلون‌ها را به ۳ گروه تقسیم نمود.

کلمات کلیدی: چای، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای شیمیایی، برگ سبز، چای خشک، ارزیابی حسی

مقدمه

تنوع ژنتیکی به عنوان مهمترین ابزار در دست به نژادگران گیاهی است. چای یک گیاه دگرگشن غیر بومی است که دارای تنوع ژنتیکی در جوامع بذری است. بوته‌های چای یک باغ قدیمی؛ از نظر خصوصیات مختلف مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده، اختلاف‌های زیادی را نشان می‌دهند. انتخاب تک بوته‌های برتر چای بر اساس بررسی خصوصیات مرفو-فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مقاومت به تنش‌ها، و سپس تکثیر غیر جنسی بهترین‌ها به منظور انجام آزمایشات ریشه‌زایی قلمه‌ها و آزمایشات مقایسه عملکرد و کیفیت، یکی از روش‌های متداول برای اصلاح چای است که منتهی به معرفی رقم کلونی می‌گردد (غلامی، ۱۳۸۳). کیفیت نوشابه چای از نظر عطر، طعم، رنگ و مایه‌داری به مقادیر برخی از خصوصیات بیوشیمیایی از جمله درصد کاتچین‌ها (اپی‌کاتچین، گالوکاتچین، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین‌گالات، اپی‌گالوکاتچین‌گالات) و برخی از ترکیبات فرّار عطر وابسته است. با

IrHC2019

تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلون‌های چای ایران می‌توان بهترین ژنوتیپ از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی که نقش مهمی در سلامتی انسان دارد را شناسایی و معرفی نمود.

Magoma و همکاران (۲۰۰۰) از غلظت کاتچین‌ها برای مطالعه تنوع ژنتیکی در ۱۰۲ نمونه جمع‌آوری شده در کلکسیون ژرم‌پلاسم چای کنیا استفاده کردند. مواد گیاهی تازه در سه زمان از یک دوره هشت ماهه به طور تصادفی و از ۱۰۲ نمونه ژرم‌پلاسمی تهیه شدند تا چهار جزء کاتچین (EC, ECG, EGC, EGCG) توسط HPLC اندازه‌گیری شوند. با استفاده از تجزیه مولفه‌های اصلی، ۳ گروه و ۵ زیرگروه شناسایی و معرفی شدند. در این مطالعه، دامنه تغییرات کل کاتچین‌ها از ۳/۲۳ تا ۹/۳۸ میکرومول بر میلی‌گرم ماده خشک، دامنه تغییرات EGC+EGCG از ۲/۱۱ تا ۷/۶۷ میکرومول بر میلی‌گرم ماده خشک، دامنه تغییرات EC+ECG از ۰/۸۳ تا ۳/۵۰ میکرومول بر میلی‌گرم ماده خشک و نهایتاً دامنه تغییرات نسبت کاتچین‌ها از حداقل ۰/۲ تا ۱/۲۵ میکرومول بر میلی‌گرم ماده خشک گزارش شد. Liang و همکاران (۲۰۰۳) برای تخمین کیفیت چای از روابط رگر سیونی ترکیبات شیمیایی و رنگ چای دم کشیده ۱۷ نمونه چای سیاه مناطق مختلف چایکاری چین استفاده کردند. آنها ۸ ترکیب از کاتچین‌های چای را به کمک HPLC و به روش دکتر Takeda اندازه‌گیری کردند. در این تحقیق، مقدار کاتچین از ۰/۹ تا ۸/۵۴ میلی‌گرم بر گرم و اپی‌کاتچین از ۰/۳۶ تا ۸/۱۸ میلی‌گرم در نمونه های مختلف متفاوت بود. همچنین مقادیر کافئین و تئافلاوین نیز به ترتیب در دامنه‌هایی بین ۵۸/۷-۳۵/۳ میلی‌گرم بر گرم و ۰/۱۶-۵/۸۵ میلی‌گرم بر گرم قرار گرفت. محاسبه ضرایب همبستگی بین خصوصیات بیوشیمیایی و نتایج گزارش چشنده‌های چای (آزمون‌های حسی) با کیفیت کلی نوشابه چای، نشان داد که مقدار کاتچین با هر دو خصوصیت ذکر شده دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار است. اپی‌کاتچین نیز اگرچه با آنها رابطه مثبتی را نشان داد ولی فقط با گزارش چشش-ارزیابی حسی- رابطه معنی‌داری (در سطح احتمال ۵٪) نشان داد.

در این مطالعه، همبستگی مقدار تئافلاوین نیز رفتاری مشابه با اپی‌کاتچین داشت. از سوی دیگر، همبستگی کل پلی‌فنل‌ها با عطر، طعم و مزه با کیفیت کلی نوشابه چای مثبت و معنی‌دار (در سطح احتمال ۱٪) به دست آمد. Karori و همکاران (۲۰۰۷) از روش تغییر یافته Zuo و همکاران (۲۰۰۲) برای تجزیه کاتچین‌های ۱۲ نمونه چای ساخته شده توسط HPLC استفاده کردند. هم‌چنین آنها از روش Pourmorad و همکاران (۲۰۰۶) برای تعیین کل پلی‌فنل‌ها، از روش Hilton (۱۹۷۳) برای تعیین کل تئافلاوین و از روش Roberts , Smith (۱۹۶۱) برای تعیین کل تئاروبیجین استفاده کردند. بین نمونه‌های چای سیاه از نظر انواع کاتچین‌های اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود داشت. ضریب همبستگی بین کل پلی فنل‌ها و همه انواع کاتچین‌ها مثبت و در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. این در حالیست که مقادیر تئافلاوین و تئاروبیجین فقط با چهار جزء از انواع کاتچین‌ها (از جمله کاتچین و اپی‌کاتچین) رابطه مثبت و قویاً معنی‌داری نشان داد. در این مطالعه، رابطه کاتچین کل و اپی‌کاتچین نیز مثبت و در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار به دست آمد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از برگ سبز ۲۴ کلون انتخابی (۱۲ کلون از لاهیجان و ۱۲ کلون از فشالم-فومن) در ایستگاه‌های تحقیقات چای شهید افتخاری فشالم (فومن) و فجر (لاهیجان)، برای تعیین مقادیر کل پلی‌فنل‌ها و در صد عصاره آبی به روش‌های اسپکتروفتومتری و وزنی و در صد کافیین، کاتچین کل، اپی‌گالو کاتچین، کوئرستین و کلروژنیک اسید به کمک HPLC در سه فصل بهار، تابستان و پاییز انجام شد. هم چنین، مقداری از برگ سبز استاندارد (دو برگ و یک غنچه) برداشت شده از هر کرت آزمایشی؛ برای انجام چایسازی به روش Orthodox به آزمایشگاه چایسازی تحویل گردید تا چایسازی به روش مینیاتوری انجام شود. پس از چایسازی مینیاتوری، بخشی از نمونه چای‌های ساخته شده برای تعیین تئافلاوین، تئاروبیجین، رنگ کل نو شابه، شفافیت نو شابه، در صد تانن و در صد عصاره آبی به آزمایشگاه شیمی چای ارسال و اندازه‌گیری تئافلاوین به روش Hilton (۱۹۷۴)، تئاروبیجین به روش Smith-Roberts (۱۹۶۳) و کافئین به کمک HPLC انجام شد (Owuor, 1987). بخش دوم از نمونه‌های چای ساخته شده برای انجام ارزیابی‌های

IrHC2019

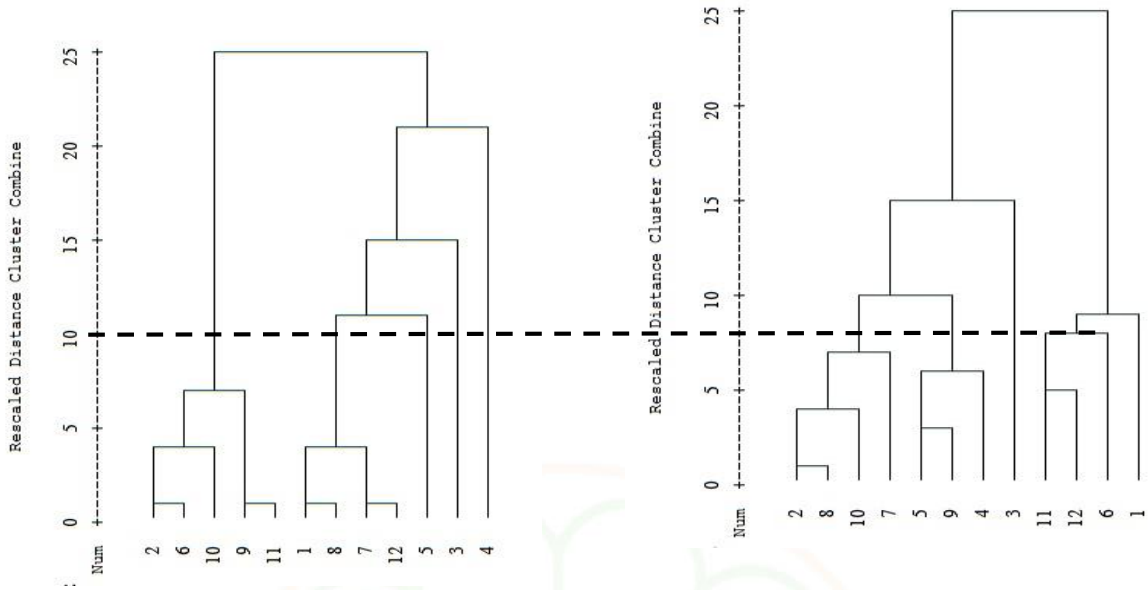
حسی (Organoleptic Test) به چشندههای چای تحویل گردید تا رنگ، طعم، عطر و نیز وضعیت تفاله در چای دم آورده شده از نمونههای مورد نظر مورد ارزیابی و رتبهبندی قرار گیرد. برای تعیین مقدار ترکیبات بیو شیمیایی (شامل کاتچین کل، اپیگالوکاتچین، کوئرستین، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید) توسط دستگاه HPLC انجام شد. برای انجام آزمایشات از روشهای معرفی شده توسط محققان پیشین استفاده شد که عبارتند از: کاتچین کل و اپیکاتچین به روش Owuor و Obanda (۱۹۹۷)، و کافئیک اسید، به روش Owuor (۱۹۸۷). اندازهگیری فعالیت آنتیاکسیدانتی در نمونههای چای به روش جذب رادیکالی DPPH انجام شد. دادههای حاصل از هریک از آزمایشات (ایستگاهها) به طور مجزا مورد مقایسه آماری (آزمون t) قرار گرفتند و اختلافات بین فصول مشابه سالهای متوالی و نیز بین فصول درون هر یک از سالها مورد سنجش آماری قرار گرفت. همچنین مقایسه بین کلونها از نظر خصوصیات برگ سبز / چای خشک انجام شد و میزان ضریب تغییرات هر خصوصیت در هر فصل و هر سال انجام شد. از محاسبه ضریب همبستگی دو به دوی صفات اندازهگیری شده نیز برای تحلیل روابط هم راستا / غیر هم راستای صفات موثر در تعیین کیفیت استفاده شد. با برازش معادلات رگرسیون خطی و چند متغیره نیز رابطه بین خصوصیات بیوشیمیایی برگ سبز و چای خشک با نمرات آزمونهای حسی نوشابه چای و کیفیت کلی نوشابه؛ نسبت به استنتاج نتایج برای بهره برداری در اصلاح کیفیت چای اقدام شد. همچنین به کمک تجزیه علّیت برای کشف سهم اثرات مستقیم / غیر مستقیم خصوصیات برگ سبز یا چای خشک بر کیفیت کلی نوشابه (رتبه ارزیابی حسی) استفاده شد. در پایان به کمک تجزیه به مولفههای اصلی و تجزیه خوشهای؛ کلونهای مورد آزمایش هر ایستگاه از نظر کلیه خصوصیات برگ سبز و چای خشک گروهبندی شدند. برای تجزیههای آماری از نرمافزارهای آماری Excel؛ Mstatc؛ Spss؛ و ... استفاده شد.

نتایج و بحث

بیشترین تعداد اختلاف معنیدار بین کلونهای آزمایشی چای در هر دو ایستگاه از نظر میانگین کافئین، تانن و عصاره آبی برگ سبز و نیز تئافلاوین، تئاروبیجین، رنگ کل، شفافیت نوشابه و نسبت TF/TR چای خشک در مقایسات فصول تابستان-پاییز و کمترین تعداد در مقایسات فصول بهار-تابستان بدست آمد. آماره t برای مقایسه رتبه کل ارزیابی حسی نمونه چای کلونهای انتخابی در ایستگاه فومن، اختلاف معنیداری بین چای بهار، تابستان و پاییز نشان نداد. اما در ایستگاه لاهیجان، مقایسه آماری میانگینها رتبه کل ارزیابی حسی برای چای فصول بهار-تابستان و بهار-پاییز، معنیدار و برای مقایسه فصول تابستان-پاییز؛ غیرمعنیدار به دست آمد (جدول زیر؛ بخشی از نتایج):

ایستگاه	خصوصیات کیفی چای خشک	آماره t (آزمون میانگینها)			میانگین کل		
		بهار و تابستان	بهار و پاییز	تابستان و پاییز	بهار	تابستان	پاییز
فومن	تئافلاوین	۲/۹۰**	۰/۶۹Ns	۲/۰۶*	۰/۲۹	۰/۴۲	۰/۳۲
	تئاروبیجین	۳/۴۳**	۰/۲۱Ns	۳/۱۶**	۸/۰۳	۱۰/۳۳	۸/۱۶
	رنگ کل	۱/۹۹Ns	۱/۳۱Ns	۰/۶۵Ns	۱/۶۴	۱/۸۹	۱/۸۱
	شفافیت	۰/۷۷Ns	۱/۰۲Ns	۰/۳۲Ns	۱۶/۵۷	۱۵/۳۱	۱۴/۹۳
	TF/TR	۱/۵۶Ns	۱/۰۲Ns	۰/۶۲Ns	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۳
	رتبه آزمون حسی	۰/۹۳Ns	۰/۵۱Ns	۱/۴۷Ns	۱۳	۱۳/۵	۱۲/۷۵
لاهیجان	تئافلاوین	۱/۱۰Ns	۲/۲۷*	۳/۳۶**	۰/۲۹	۰/۳۴	۰/۲۳
	تئاروبیجین	۲/۷۶*	۰/۵۵Ns	۳/۰۵**	۷/۶۱	۸/۹۷	۷/۳۹
	رنگ کل	۰/۸۴Ns	۰/۱۷Ns	۰/۵۵Ns	۱/۵۷	۱/۶۷	۱/۶۰
	شفافیت	۱/۱۰Ns	۰/۶۴Ns	۰/۱۱ Ns	۱۵/۳۲	۱۴/۰۵	۱۴/۲۳
	TF/TR	۰/۲۷Ns	۲/۲۹*	۲/۱۹*	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۳
	رتبه آزمون حسی	۱/۶۰Ns	۲/۰۳*	۳/۰۹**	۱۳/۷۵	۱۴/۲۵	۱۲/۷۵

IrHC2019



نتایج نشان داد که در ایستگاه فومن، اسید کافئیک با ضریب منفی و معنی‌دار و کافیین برگ سبز با ضریب مثبت و معنی‌دار در معادله باقی ماندند و در ایستگاه لاهیجان نیز تئافلاوین با ضریب مثبت و معنی‌دار در معادله رتبه ارزیابی حسی باقی مانده است. نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) در هر دو ایستگاه، نشان داد که چهار مولفه اول حدود ۷۰ درصد از تغییرات توجیه می‌نمایند. با توجه به نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی؛ از تجزیه خوشه‌ای برای تعیین میزان قرابت کلون‌های انتخابی چای در هر ایستگاه استفاده شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش ward و برش دندروگرام از ناحیه ۱۰ واحد؛ در ایستگاه فومن، کلون‌ها را در ۵ گروه (سه کلون منفرد در سه گروه مجزا و دو گروه دیگر مرکب از چند کلون در هر گروه) و در ایستگاه لاهیجان، کلون‌ها را به ۳ گروه (یک کلون منفرد در یک گروه و دو گروه دیگر مرکب از چند کلون در هر گروه) تقسیم نمود.

به طور کلی قابض بودن و رنگ داشتن دو پارامتر معمول برای ارزیابی چای هستند که عمدتاً توسط تئافلاوین و تئاروبیجین کنترل می‌شوند. نسبت تئافلاوین به تئاروبیجین، یک شاخص مهم در تعیین کیفیت چای است، لذا استفاده از این شاخص می‌تواند مبنایی برای سنجش کیفیت انواع چای‌های موجود در بازار باشد. در این مطالعه نسبت TF/TR در ایستگاه فومن در دامنه ۰/۰۵۸-۰/۰۱۹و در ایستگاه لاهیجان در دامنه ۰/۰۵۵-۰/۰۱۳ قرار داشت. مقایسه بین چای شمال و جنوب هند نشان می دهد که چای در شمال هند، از برگ گونه آسامی تولید می‌شود که این گونه دارای محتوای پلی‌فنول بالاتری است و مسلماً هر چه محتوای پلی‌فنولی بالاتر باشد، کیفیت چای مطلوب‌تر خواهد بود. از پارامترهای مهم کیفیت شیمیایی چای، محتوای تئافلاوین بالاتر است که برای ارزیابی کیفیت چای سیاه استفاده می‌شود. صرف‌نظر از محدوده جغرافیایی، نتایج نشان داده است که محیط رشد چای به طور عمده بر توزیع ترکیب فنل در چای سیاه اثر می‌گذارد. مطالعات نشان داده است که سطح کاتچین در چای وابسته به گونه است. تنش‌های محیطی بر سنتز فلاوانوییدها و همچنین سطوح کافئین در گیاه اثر می‌گذارد. نتایج ارائه شده نشان داده است که تفاوت انباشت کاتچین در میان کلون چای بسته به تنوع آنها متفاوت است. مقدار کاتچین کل در ایستگاه فومن از حداقل ۱۰/۴۹۷ تا حداکثر ۳۴/۴۱۸ به دست آمد و مقادیر همین عامل کیفی در نمونه‌های ایستگاه لاهیجان از حداقل ۷/۴۲۰ تا حداکثر ۳۶/۷۰۶ در نوسان بود. تأثیر شرایط آب و هوایی بر محتوای فلاوانویدها می‌تواند به عنوان موضوعی برای تحقیقات بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. نتایج ارائه شده نشان می‌دهد که تغییرات در کیفیت برگ چای فرآوری نشده ممکن است مربوط به تفاوت در ارقام رویشی (کلون) و یا فصل برداشت است. مطالعه حاضر نشان داد که سرعت اکسیداسیون، می‌تواند به

IrHC2019

عنوان یک معیار انتخاب برای شناسایی ژنوتیپ‌های با کیفیت بالقوه، در مراحل اولیه برنامه‌های اصلاح ژنتیکی چای استفاده شود. محتوای پلی‌فنول در چای سیاه، رنگ نوشابه و شفافیت آن نیز می‌توانند به عنوان پارامترهای کیفیت مطلوب در نظر گرفته شوند. در حالی که کاتچین کل یا اپی‌گالوکاتچین به عنوان معیارهای چندان مناسبی برای تعیین کیفیت چای ساخته شده در جریان برنامه‌های اصلاح ژنتیکی چای نیستند.

منابع

غلامی، مهران. ۱۳۸۳. اصلاح چای به روش گزینش کلونی. ماهنامه تخصصی کشاورزی شمال کشور (تُرار). شماره ۷ : ۲۶-۲۲.

Karori, S. M., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K. And Ngur, R. M. 2007. Antioxidant capacity of different types of tea products. African Journal of Biotechnology. 6(19): 2287-2.

Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S., and Wu, y. 2003. Estimation of black tea quality by analysis of chemical comparison and color difference of tea infusions. Food Chemistry. 80: 283-290.

Magoma, G. N., Wachira, F., Obanda, M., Imbuga, M., and Agong, S. G. 2000. The use of catechins as biochemical markers in diversity studies of tea. Genetic Resources and Crop Evolution. 47: 107-114.

Owuor, P. O., Obanda, M., Tsushida, T., Horita, H., and Murai, T. 1987. Geographical variation of theaflavins, thearubigin and caffeine in Kenyan clonal black teas. Food chemistry. 26: 223-230.

Genetic variation in selected tea clones using green leaf and made tea chemical markers

Mehran Gholami[1]*, Kourosh Falakro[2], Seyed Ahmad Taghi Shokrgozar[2], Shiva Roofigari Haghighat[2], Masoomeh Jamalomidi[3]

[1*] Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht

[2] Tea Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), lahijan

[3] Biology Department, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran

Corresponding Author: mehrangholami@yahoo.com

Abstract

Genetic variation among selected genotypes of tea and regression analysis between the chemical characteristics of green leaves and made tea with the sensory evaluation rank of beverage was carried out by sampling the green leaf of tea clones at Fouman and Lahijan stations. The total amount of polyphenols and green leaf extracts were determined by spectrophotometric and weighing methods, and the miniature tea was done by the Orthodox method in the laboratory. Theaflavin, thearubigin, total color of the beverage, beverage brightness, tannin and water extract were also measured in the chemistry laboratory. caffeic acid, catechin, epigallocatechin, quercetin and chlorogenic acid were also measured in black tea using HPLC apparatus on 24 selected genotypes (12 clones from each station) in spring, summer and autumn. Sensory tests (Organoleptic Tests) including color, taste, flavor, aroma and condition of the tea waste were also performed by skilled tea Tasters and the result was presented as a ranking. Antioxidant activity of tea genotypes was also measured. For statistical analysis of the data, t-test was used. Statistical comparisons between the seasons were significant for the majority of quality factors. The analysis of regression relations showed that caffeic acid, dry tea with a negative and significant and negative coefficients and green leaf Caffeine with a positive and significant factor at Fouman station, and at the Lahijan station, theaflavin with a positive and significant coefficient in the sensory rating assessment equation (Y) remained. The analysis of the main components showed that the first four components justify 70% of the changes in the stations. The results of cluster analysis of four components by ward method at Fouman station divided the clones into 5 groups at Lahijan station and divided into 3 clusters.

***Keywords*:** Tea, Genetic diversity, Chemical markers, Green leaf, Made tea, Organoleptic test.

IrHC2019