

KERAGAMAN GENETIK BEBERAPA GENOTIPE TEH BERDASARKAN PENANDA RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

GENETIC VARIABILITY OF NINE TEA GENOTYPES BASED ON *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) MARKERS*

* Budi Martono dan Laba Udarno

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia
* budimartono@hotmail.com

(Tanggal diterima: 11 Desember 2013, direvisi: 30 Desember 2013, disetujui terbit: 4 Maret 2014)

ABSTRAK

Informasi keragaman genetik dan ketersediaan plasma nutfah teh (*Camellia sinensis*) diperlukan dalam perakitan varietas unggul. Keragaman genetik berdasarkan penanda DNA dapat memberikan hasil yang lebih konsisten karena tidak dipengaruhi lingkungan. Dalam penelitian ini sebanyak 9 genotipe teh dianalisis keragamannya menggunakan enam penanda RAPD (OPA 03, OPA 05, OPB 04, OPB 06, OPC 06, dan OPD 08). Penelitian dilakukan mulai bulan Maret sampai Mei 2013 di Laboratorium Terpadu Biotrop Bogor. Perhitungan koefisien kesamaan genetik dan analisis gerombol dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak NTSYSpc versi 2.02. Sebanyak 54 lokus penanda RAPD berhasil diamplifikasi menggunakan enam primer dan 47 lokus di antaranya memiliki alel yang polimorfik (87,04%). Hasil analisis gerombol berdasarkan kesamaan genetiknya mengelompokkan 9 genotipe ke dalam enam kelompok. Empat kelompok (I, II, IV, V) masing-masing terdiri atas satu genotipe, sementara dua kelompok yang lain yaitu kelompok III dan VI masing-masing beranggotakan tiga dan dua genotipe.

Kata Kunci: *Camellia sinensis*, diversitas genetik, penanda RAPD

ABSTRACT

The availability of diverse tea (*Camellia sinensis*) germplasms as well as the information about their genetic diversity is required for plant breeding program. Genetic diversity analysis based on DNA marker is known to be more effective since the markers provide more consistent results. In this study, nine tea genotypes were evaluated for their genetic diversity using six Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers (OPA 03, OPA 05, OPB 04, OPB 06, OPC 06, and OPD 08). The study was conducted from March to May 2013 in the Integrated Laboratory of Biotrop Bogor. The estimation of genetic similarity and the cluster analysis were done using NTSYSpc version 2.02. Of the six RAPD markers used in this study, a total of 54 RAPD marker loci have been successfully amplified. In which, 47 loci (87.04%) were polymorphic and subsequently used for the evaluation of tea genotypes. The results of cluster analysis showed that those tea genotypes were clustered into six groups. Each of four groups (I, II, IV, V) consisted of only one genotype. Meanwhile, the other two groups (III and VI) had three and two genotypes, respectively.

Keywords: *Camellia sinensis*, genetic diversity, RAPD markers

PENDAHULUAN

Tanaman teh termasuk famili *Theaceae* genus *Camellia* dan dapat dikelompokkan menjadi tiga tipe, yaitu tipe China (*Camellia sinensis*), tipe Assam (*C. assamica*, Master), dan tipe Cambod (*C. assamica* sub sp. *lasiocalyx* (Planch. Ex Watt.)) (Singh & Ahuja, 2006). Pusat asal tanaman teh diperkirakan dari daerah di sekitar wilayah Burma kemudian menyebar ke Cina, Indonesia, dan India (Sealy, 1958). Tanaman teh pertama kali masuk ke Indonesia dari Jepang tahun 1684 dibawa oleh Andreas Cleyer seorang berkebangsaan

Jerman. Tahun 1826 teh ditanam di Indonesia untuk melengkapi koleksi tanaman di Kebun Raya Bogor dan pada tahun 1927 ditanam di Kebun Cisarupan, Garut Jawa Barat. Teh tipe Assam yang saat ini dibudidayakan dibawa oleh R.E. Kerkhoven dari Sri Lanka pada tahun 1878 dan ditanam di Kebun Gambung, Jawa Barat (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2011).

Teh termasuk tanaman yang menyerbuk silang sehingga persilangan alami pada teh dapat meningkatkan keragaman genetik. Teh memiliki keragaman genetik yang luas (Chen, Gao, Chen, & Xu, 2005; Thomas, Kumar, & Mandal, 2006; Jain & Priyadarshan, 2009),

dan hal ini dapat dilihat dari habitus, morfologi, dan kandungan kimianya. Hasil evaluasi beberapa genotipe teh menunjukkan perbedaan daya hasil, kandungan kimia, dan ketahanan terhadap hama penyakit (Martono, Rubiyo, Setiyono, & Udarno, 2013).

Pada proses pemuliaan maupun studi genetik tanaman, teknik identifikasi molekuler tidak dipengaruhi lingkungan sehingga dapat lebih efisien. Penanda molekuler dapat dilakukan dengan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), dan SSR (*Single Sequence Repeat*) (Karp, Seberg, & Buiatti, 1996; Kaundun, Zhyvoloup, & Young-Goo, 2000; Chen, Qi, Li, Zou, & Shan, 2012). Penanda RAPD memiliki kelebihan, yaitu lebih sederhana, DNA yang dibutuhkan sedikit, mampu menghasilkan polimorfisme lebih cepat. Kekurangan RAPD adalah tingkat pengulangan yang rendah, tetapi dapat dijaga dengan konsistensi kondisi PCR (Prana & Hartati, 2003). Penanda RAPD tidak dapat membedakan individu homozigot dan heterozigot karena bersifat sebagai penanda dominan (William Kubelik, Livak, Rafalski, & Tingey, 1990).

Penanda RAPD telah digunakan secara luas untuk mengkarakterisasi koleksi plasma nutfah teh (Balasaravanan, Pius, Rajkumar, Muraleedharan, & Shasany, 2003; Mondal *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Chen & Yamaguchi, 2005; Goonetilleke *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2009; Roy & Chakraborty, 2009; Wang *et al.*, 2011), mengevaluasi hubungan genetik antara individu di dalam dan antar spesies teh (Lai *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004), dan mengidentifikasi penanda cekaman kekeringan (Mishra & Sen-Mandi, 2004).

Informasi tentang keragaman genetik teh tersebut dapat dijadikan sebagai dasar pertimbangan dalam menentukan materi untuk kegiatan pemuliaan. Tujuan penelitian adalah mendapatkan informasi keragaman genetik tanaman teh menggunakan penanda RAPD.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Seameo Biotrop pada bulan Maret sampai Mei 2013. Materi genetik penelitian terdiri dari 4 genotipe teh Sinensis yang sudah dilepas (GMBS 1, GMBS 3, GMBS 4, dan GMBS 5), 3 genotipe teh Sinensis hasil persilangan alami (Tbs 1, Tbs 2, dan Hibrid), dan 2 genotipe teh hibrida/berdaun sedang (Cin 143 dan Kiara 8). Di samping itu, digunakan bahan kimia untuk isolasi DNA, reaksi amplifikasi PCR, elektroforesis gel agarose, dan dokumentasi. Primer oligonukleotida untuk amplifikasi dipilih sebanyak 6 jenis, yaitu OPA 03, OPA 05, OPB 04, OPB 06, OPC 06, dan OPD 08.

Isolasi sampel DNA dilakukan menggunakan metode *DNeasy plant mini kit* (Qiagen). Sebanyak 100 mg sampel daun teh yang telah digerus dengan nitrogen cair dimasukkan ke dalam *microtube* 2 mL yang berisi 400 μ L buffer AP1 dan 4 μ L Rnase A (100 mg/mL). Campuran divortex dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit. Polisakarida dan protein diendapkan dengan penambahan 130 μ L buffer AP2, kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dengan proses sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit. Bagian supernatan ditransfer ke dalam *QIAshredder mini spin column* yang ditempatkan pada *microtube* 2 mL, dan diresentrifugasi. Supernatan ditambah dengan 1,5 volume buffer AP3 kemudian dihomogenkan. Sebanyak 650 μ L campuran dipindah ke dalam *DNeasy mini spin column* yang diletakkan pada *microtube* 2 mL dan disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 1 menit. Sisa campuran kembali dimasukkan ke dalam *DNeasy mini spin column* dan diresentrifugasi. Setelah proses tersebut selesai, kolom dicuci dengan penambahan 500 μ L buffer AW kemudian disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 1 menit. DNA dielusi dengan penambahan 2 x 100 μ L buffer AE dan diinkubasi 5 menit pada suhu ruang, selanjutnya disentrifugasi pada 8.000 rpm selama 1 menit.

DNA hasil isolasi diuji kualitasnya dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% yang telah mengandung *Gelred*. Sebanyak 5 μ L stok DNA dielektroforesis menggunakan agarosa 1% pada tegangan 5 volt/cm selama 30 menit, disertakan λ DNA sebagai standar. Gel divisualisasi dengan menggunakan *KODAK Gel Logic 200* kemudian DNA dikuantifikasi dengan membandingkan terhadap λ DNA. Stok DNA selanjutnya diencerkan menjadi konsentrasi 25 ng/ μ L.

Protokol reaksi amplifikasi PCR menurut William *et al.* (1990). Tahapan PCR yang digunakan adalah (1) *pre*-PCR (denaturasi awal) pada suhu 94 °C 5 menit sebanyak satu siklus; (2) denaturasi 94 °C 1 menit, penempelan primer pada suhu 36 °C 1 menit dan perpanjangan 72 °C 2 menit sebanyak 45 siklus; dan (3) perpanjangan akhir pada suhu 72 °C 4 menit sebanyak satu siklus. DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarose 1% yang telah mengandung *gel red* (biorad) dengan tegangan 5 volt/cm selama 60 menit. Pita DNA hasil amplifikasi selanjutnya diamati pada UV transluminator dan dipotret menggunakan kamera digital.

Hasil amplifikasi PCR diinterpretasi berdasarkan ada tidaknya pita yang dihasilkan. Jika terdapat pita diberi nilai '1' dan jika tidak ada pita diberi nilai '0'. Berdasarkan ada tidaknya pita yang dihasilkan tersebut disusun matrik data biner kemudian dihitung jarak genetik antar genotipe. Model pengelompokan

genotipe menggunakan program NTSYSpc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versi 2.02 dengan metode UPGMA fungsi SIMQUAL (Rohlf, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Pita RAPD

Penggunaan primer OPA 03, OPA 05, OPB 04, OPB 06, OPC 06, dan OPD 08 mampu menunjukkan variasi antar genotipe teh yang ditunjukkan dengan pola pita DNA yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enam primer DNA menghasilkan jumlah pita 6 sampai 12. Pemakaian primer OPC 06 memberikan jumlah pita DNA lebih banyak daripada OPA 03, OPA 05, OPB 04, OPB 06, dan OPD 08.

Berdasarkan elektroforegram DNA hasil analisis RAPD diketahui bahwa DNA yang teramplifikasi terdiri atas 54 lokus. Dari jumlah tersebut, 47 lokus DNA (87,04%) menunjukkan polimorfisme dan sisanya sebanyak 7 lokus (12,96%) bersifat monomorfis (Tabel 1). Hal ini menunjukkan penanda RAPD yang digunakan memiliki tingkat polimorfisme tinggi. Polimorfisme merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang diobservasi (McGregor *et al.*, 2000). Penelitian Roy & Chakraborty (2009) pada tanaman teh menggunakan 12 primer acak menunjukkan polimorfisme sebesar 77,77%. Cheng-

Wen *et al.* (2008) melaporkan dengan 21 primer, 88,90% dari 226 lokus DNA adalah polimorfisme.

Analisis Gerombol antar Genotipe

Elektroforegram DNA menggunakan metode analisis gerombol hirarki ditransformasi menjadi data kuantitatif sehingga dapat dikonstruksi menjadi dendrogram yang menggambarkan jarak perbedaan dan kesamaan genetik antar genotipe (Gambar 1). Berdasarkan dendrogram yang dihasilkan pada tingkat kesamaan genetik 0,55, genotipe teh terbagi dalam dua kelompok besar. Kelompok pertama terdiri dari satu genotipe, yaitu Hibrid. Kelompok kedua terdiri dari delapan genotipe, yaitu GMBS 3, GMBS 4, GMBS 5, GMBS 1, Tbs 1, Tbs 2, Cin 143, dan Kiara 8. Kelompok kedua terbagi lagi menjadi dua sub kelompok. Sub kelompok pertama beranggotakan genotipe GMBS 3, sedangkan sub kelompok kedua terdiri dari tujuh genotipe, yaitu GMBS 4, GMBS 5, GMBS 1, Tbs 1, Tbs 2, Cin 143, dan Kiara 8.

Pada koefisien kesamaan genetik 0,80 membagi 9 genotipe teh menjadi 6 kelompok. Kelompok I, II, IV, dan V masing-masing terdiri dari satu genotipe. Kelompok III terdiri dari tiga genotipe yang terbagi menjadi dua sub kelompok. Sub kelompok pertama merupakan genotipe GMBS 4 dan GMBS 5 dan sub kelompok kedua terdiri dari satu genotipe (GMBS 1). Kelompok VI terdiri dari dua genotipe (Cin 143 dan Kiara 8) (Gambar 1 dan Tabel 2).

Tabel 1. Primer DNA, susunan basa, dan jumlah lokus teramplifikasi

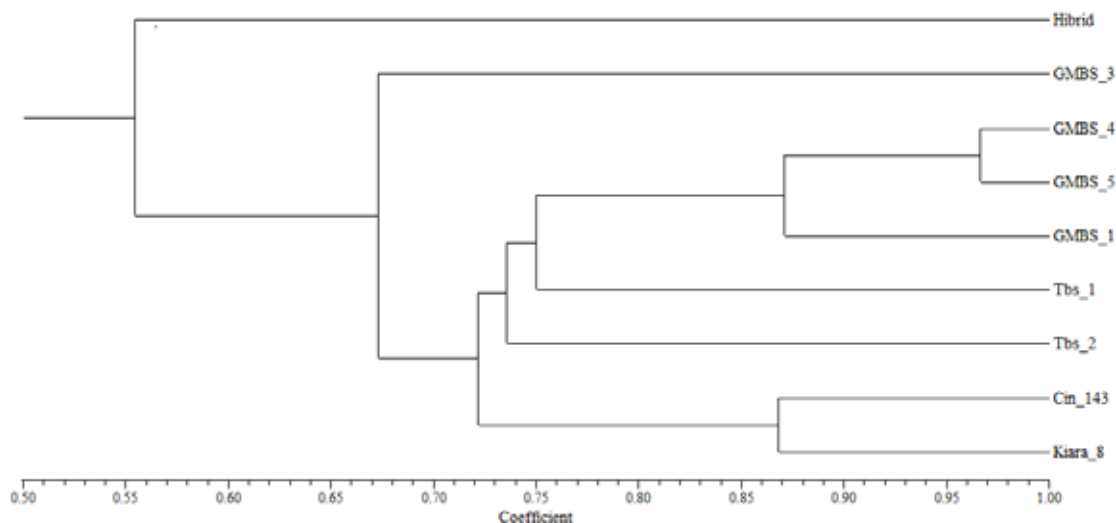
Table 1. DNA primer, nucleotide sequences, and number of amplified loci

No.	Jenis primer	Susunan basa	Jumlah pita		Total	Polimorfik (%)
			Polimorfik	Monomorfik		
1.	OPA 03	AGTCAGCCAC	5	3	8	62,50
2.	OPA 05	AGGGGTCTTG	11	0	11	100,00
3.	OPB 04	GGA CTGGAGT	6	0	6	100,00
4.	OPB 06	TGCTCTGCCC	8	1	9	88,89
5.	OPC 06	GAACGGACTC	11	1	12	91,67
6.	OPD 08	GTGTGCCCCA	6	2	8	75,00
Jumlah			47	7	54	87,04

Tabel 2. Pengelompokan 9 genotipe teh pada koefisien kesamaan genetik 80%

Table 2. Grouping of 9 tea genotypes at the genetic similarity coefficient of 80%

Kelompok	Jumlah genotipe	Genotipe
I	1	Hibrid
II	1	GMBS 3
III	3	GMBS 4, GMBS 5, dan GMBS 1
IV	1	Tbs 1
V	1	Tbs 2
VI	2	Cin 143 dan Kiara 8



Gambar 1. Hasil analisis gerombol berdasarkan kesamaan genetik dari sembilan genotipe teh
Figure 1. Cluster dendrogram based on the genetic similarity value of nine tea genotypes

Koefisien kesamaan genetik pada penelitian ini berkisar 0,5106-0,9667. Nilai kesamaan genetik terendah terdapat antara GMBS 1 dan Hibrid sedangkan tertinggi GMBS 4 dan GMBS 5 (Tabel 3). Bila dibandingkan dengan beberapa penelitian serupa terdapat perbedaan nilai koefisien kesamaan genetik antar genotipe teh. Gul, Ahmed, Khan, & Alam (2007) melaporkan koefisien kesamaan genetik yang rendah antar 24 genotipe teh yang diuji dengan metode UPGMA. Penelitian Wang *et al.* (2011) menunjukkan nilai koefisien kesamaan genetik antar genotipe teh sebesar 0,5419-0,7933. Di lain pihak, Boonerjee, Nurul Islam, Hoque, & Sarker (2013) melaporkan koefisien

kesamaan genetik sebesar 0,41-0,76. Jika nilai koefisien kesamaan genetik makin kecil maka semakin jauh kekerabatan genetiknya sehingga akan meningkatkan peluang untuk mendapatkan keragaman genetik yang tinggi.

Keragaman plasma nutfah dapat dimanfaatkan untuk perbaikan genotipe teh, jika tersedia informasi tentang keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antar genotipe secara fenotipik dan molekuler. Terdapat beberapa tetua persilangan yang memiliki nilai kesamaan genetik rendah sehingga berpeluang untuk mendapatkan heterosis tinggi (Tabel 3).

Tabel 3. Matriks kesamaan genetik dari sembilan genotipe teh berdasarkan penanda RAPD
Table 3. Genetic similarity matrix of nine tea genotypes based on RAPD markers

Klon	Hibrid	GMBS 3	GMBS 4	GMBS 5	GMBS 1	Tbs 1	Tbs 2	Cin 143	Kiara 8
Hibrid	1,0000								
GMBS 3	0,5238	1,0000							
GMBS 4	0,5909	0,7500	1,0000						
GMBS 5	0,5652	0,7241	0,9667	1,0000					
GMBS 1	0,5106	0,7458	0,8525	0,8889	1,0000				
Tbs 1	0,6047	0,6182	0,7368	0,7797	0,7333	1,0000			
Tbs 2	0,5789	0,6000	0,7308	0,7407	0,7636	0,7059	1,0000		
Cin 143	0,5366	0,6415	0,7636	0,7719	0,6897	0,7037	0,6939	1,0000	
Kiara 8	0,5238	0,6296	0,7500	0,7586	0,7119	0,6909	0,6800	0,8679	1,000

KESIMPULAN

Sembilan genotipe teh yang dianalisis menggunakan 6 primer acak menghasilkan 54 fragmen DNA, 47 fragmen (87,04%) di antaranya polimorfik dengan jumlah pita DNA paling banyak terdapat pada primer OPC 06. Pada kesamaan genetik 0,80 terbagi menjadi enam kelompok, yaitu kelompok I (Hibrid), kelompok II (GMBS 3), kelompok 3 (GMBS 4, GMBS 5, dan GMBS 1), kelompok 4 (Tbs 1), kelompok 5 (Tbs 2), dan kelompok VI (Cin 143 dan Kiara 8).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Anidah, SSi., yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Balasaravanan, T., Pius, P.K., Rajkumar, R., Muraleedharan, N., & Shasany, A.K. (2003). Genetic diversity among South Indian tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. Assamica*, and *C. assamica* spp. *lasicalyx*) using ALFP markers. *Plant Science*, 165, 365-375.
- Boonerjee, M.S., Nurul Islam, M., Hoque, & Sarker, R.H. (2013). Genetic diversity analysis of eighteen tea (*Camellia sinensis* L.) clones of Bangladesh through RAPD. *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 23(2), 189-199.
- Chen, L., Gao, Q.K., Chen, D.M., & Xu, C.J. (2005). The use of RAPD markers for detecting genetic diversity, relationship and molecular identification of Chinese elite tea genetic resources (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) preserved in tea germplasm repository. *Biodivers. Conserv.*, 14, 1433-1444.
- Chen, L., & Yamaguchi. (2005). RAPD markers for discriminating tea germplasms at the inter-specific level in China. *Plant Breeding*, 124, 404-409.
- Chen, S., Qi, G., Li, H., Zou, Y., & Shan, H. (2012). PCR-RFLP Analysis of cpDNA in Tea Cultivars (*Camellia sinensis* L.) in Sichuan of China. *Journal of Agricultural Science*, 4(5), 25-30.
- Cheng-Wen S., Yi-Huan, H., Jian-An, H., Jun-Wu, L., Chun-Lin, L., & De-Hua, L. (2008). RAPD analysis on genetic diversity of typical tea populations in Hunan Province. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 5(01), 67-72.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2011). *Profile komoditi teh* (p. 57). Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan Kementerian Pertanian.
- Goonetilleke, W.A.S.N.S.T., Priyantha, P.g.C., Mewan, K.M., & Gunasekare, M.T.K. (2009). Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) as revealed by RAPD-PCR markers. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka*, 37(2), 147-150.
- Gul, S., Ahmed, H., Khan, I.A., & Alam, M. (2007). Assessment of genetic diversity in tea genotypes through RAPD primers. *Pakistan J. Biol. Science*, 10(15), 2609-2611.
- Jain, S.M., & Priyadarshan, P.M. (2009). *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species* (p. 653). Springer.
- Karp A., Seberg, O., & Buiatti, M. (1996). Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot. (London)*, 78, 143-149.
- Kaundun, S.S., Zhyvoloup, A., & Young-Goo, P. (2000). Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica*, 115, 7-16.
- Lai, J.A., Yang, W.C., & Hsian, J.Y. (2001). An assessment of genetic relationship in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 93-100.
- Martono, B., Rubiyo, Setiyono, R., & Udarno, L. (2013). *Usulan pelepasan klon Tbs 1 dan Tbs 2* (p. 48). Sukabumi: Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar.
- Mc Gregor, C.E., Lambert, C.A., Gryling, M.M., Louw, J.H., & Warnich, L. (2000). A comparison assesment of DNA finger printing technique (RAPD), ISSR, AFLP, and SSR in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113, 135-144.
- Mishra, R.K., & Sen-Mandi, S. (2004). Molecular profiling and development of DNA marker associated with drought tolerance in tea clones growing in Darjeeling. *Curr. Sci*, 87(1), 60-66.
- Mishra, R.K., Chaudhury, S., Ahmad, A., Pradhan, M., & Siddiqi, T.O. (2009). Molecular analysis of tea clones (*Camellia sinensis*) using AFLP markers. *International Journal of Integrative Biology*, 5(2), 130-136.
- Mondal T.K., A. Bhattacharya, M. Laxmikumar, & P.S. Ahuja. (2004). Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell Tiss. Org.* 76, 195-254.
- Prana, K.D., & Hartati, N.S. (2003). Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Skrining primer dan optimasi kondisi PCR. *J. Natur Indonesia*, 5(2), 107-112.
- Rohlf, J.F. (2000). *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. User Guide*. New York: Departement of Ecology and Evolution State University of New York.
- Roy, S.C., & Chakraborty, B.N. (2009). Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis*) cultivars as revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 370-376.
- Sealy, J. (1958). *A revision of genus Camellia*. London: Royal Horticultural Society.
- Sing, M., Saroop, J., & Dhinman, B. (2004). Detection on intracolon genetic variability in vegetatively propagated tea using RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 48(1), 113-115.

Sing, D., & Ahuja, P.S. (2006). 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome*, 49, 91-96.

Thomas, J., Kumar, R.R., & Mandal, A.K.A. (2006). Metabolite profiling and characterization of somaclonal variants in tea (*Camellia* spp.) for identifying productive and quality accession. *Phytochemistry*, 67, 1136-1142.

Wang, X.F., Zheng, H.Y., Zheng, W.H., Ao, C.Q., Jin, Y.H., Zhao, L.H., ...Jia, L.R. (2011). RAPD-based genetic diversities and correlation with morphological traits in *Camellia* (Theaceae) cultivars in China. *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 849-859

William, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.