DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

نشانگرهای RAPD وسیله‌ای برای مشخص کردن روابط ژنتیکی گیاه چای در ایران

کوروش فلک‌رو[۱]، شاهین جهانگیرزاده خیاوی[۱*]، مهران غلامی[۲] و سیاوش پورعزیزیان[۱]

[۱] ایران، لاهیجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده چای

[۲] ایران، رشت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، بخش تحقیقات علوم زراعی-باغی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

یکی از مهمترین محصولات منطقه شمال ایران که امروزه بسیاری از آنها در معرض از بین رفتن قرار دارند گیاه چای (*Camellia sinensis*) می‌باشد. در این بررسی تعداد ۶۰ اکسشن با استفاده از ۲۴ نشانگر RAPD مورد بررسی قرارگرفت. نشانگرهای RAPD مورد استفاده ۲۱۹ نوار تکثیر نمود که ۸۱/۲۸ درصد آنها حالت چندشکلی نشان دادند. میزان محتوای اطلاعات چند شکلی برای تمام نشانگرها از ۰/۲۹ الی ۰/۵۰ محاسبه شد. میزان محتوای اطلاعات چند شکلی کل نشانگرها نیز ۰/۴۹ محاسبه شد که نشان از کارایی بالای نشانگرهای بکار رفته جهت بررسی تنوع اکسشن‌های موجود دارد. ماتریس تشابه تشکیل شده براساس ضریب جاکارد مابین اکسشن‌های مورد مطالعه از ۰/۴۳ تا ۰/۹۴ با میزان متوسط ۰/۶۵ متغیر بود. براساس تجزیه کلاستر نمونه‌ها در میزان تشابه ۰/۶۱ به سه گروه تقسیم شدند که گروه دوم خود قابل تفکیک به سه زیر گروه (در تشابه ۰/۶۵) بود. نکته قابل اهمیت در این تجزیه کلاستر عدم پیروی نمونه‌ها از الگوی جغرافیایی است. در تجزیه بای‌پلات نیز نتایج مشابهی مشاهد شد. در بررسی میزان تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی مشخص گردید که دامنه تشابه ژنتیکی مابین جمعیت‌های چای موجود در ایران از ۰/۹۱۹ الی ۰/۹۵۰ می‌باشد که نتیجه این اعداد بیان می‌دارد تشابه ژنتیکی بالایی مابین جمعیت‌ها وجود دارد. بطور کلی نتایج بدست آمده از این بررسی بیان نمودند که زمانی که نمونه‌ها بصورت مستقیم با یکدیگر مقایسه می‌گردند تنوع بالایی را نشان می‌دهند اما زمانی که بصورت جمعیتی آنها را بررسی نماییم، مشخص می‌گردد که تنوع مابین جمعیت‌ها کم است که دلیل آن به نحوه تکثیر و گرده افشانی آزاد بوته‌های چای و تعداد بوته‌های اولیه وارد شده باز می‌گردد.

واژه های کلیدی: گیاه چای، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD، میزان محتوای اطلاعات چندشکلی، بای-پلات

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۴۲۴۲۴۰۰۱ ، پست الکترونیکی: shjahangirzadeh@gmail.com

مقدمه

گیاه چای با نام علمی *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntze از مهمترین محصولات نوشابه‌ای در کشور ایران می‌باشد. کشت این گیاه محدود به شمال کشور ایران و دو استان گیلان و غرب مازندران است. اساس ژنتیکی این گیاه محدود به سه واریته بذری عمومی (Jat) به نام‌های Betjan، Dhonjan و Rajghur می‌باشد که به علت خودناسازگاری و دگرگرده افشانی این گیاه، باغات چای از طریق تکثیر جنسی احداث شده‌اند (۱).

اولین قدم برای شروع هر برنامه به نژادی، آگاهی از میزان و وضعیت تنوع ژنتیکی گیاه موردنظر است. این تنوع ممکن است از پیش وجود داشته، یا اینکه درنتیجه جهش‌های خودبه‌خودی، القائی یا تأثیر جهش‌زاها در شرایط آزمایشگاهی به وجود آمده باشند. در صورت عدم

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

وجود تنوع ژنتیکی جدید، اختلاف ژنتیکی بین واریته‌های اصلاح‌شده جدید، کاهش یافته و شناسایی افراد با استفاده از تکنیک‌های موجود مشکل می‌شود. بنابراین حفظ ذخایر ژنتیکی و امکان انتخاب مواد گیاهی متنوع، موفقیت به‌نژادگران گیاهی را تضمین می‌کند (۴). روش‌های استفاده از نشانگرهای مولکولی امکان ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین وجود یا عدم وجود ژن‌های مورد نظر را در سطح ژنوتیپی فراهم می‌کنند. روش‌های جدید مولکولی به دلیل کاهش تدریجی در هزینه‌ها و سهولت در استفاده، جاذبه این فن‌آوری را در بین اصلاح‌کنندگان گیاهی افزایش می‌دهد بنا به اهمیت تنوع ژنتیکی روش‌های متعددی جهت برآورد آن ابداع شده است که نشانگرهای مولکولی از مهم‌ترین ابزارهای بررسی تنوع می‌باشند (۱۲).

در سال‌های اخیر از نشانگرهای مختلف مولکولی مانند RFLP (۱۰و ۲۰)، RAPD (۱، ۹، ۱۱، ۲۵و ۲۸) AFLP (۵، ۱۴و ۲۴)، SSR (۶، ۱۹)، SRAP (۱۶)، SCoT (۸) و ISSR (۲، ۷، ۱۱، ۱۸، ۲۸و ۳۲) برای بررسی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی گیاه چای جهت اهداف متنوعی استفاده شده است. فلک‌رو و همکاران (۳) در انگشت نگاری برخی ارقام چای تحت کشت با نشانگر RAPD براساس تجزیه کلاستر نمونه‌ها را در تشابه ۵۵ درصد به چهار گروه تقسیم نمودند. نکته مهم در این گروه بندی‌ها اختلاط بالای ارقام معروف به دارجلینگ و سریلانکایی بیان گردید که این اختلاط به دلیل گرده افشانی آزاد و استفاده از بذر برای تکثیر این گیاهان در گذشته می‌باشد، آنها براساس داده‌های حاصل بیان نمودند که تنوع بالایی مابین ژنوتیپ‌های چای تحت کشت در ایران وجود دارد. تانیگوچی و همکاران (۲۹) در مطالعه‌ای اکسشن‌های ژرم‌پلاسم چای را با استفاده از نشانگر SSR توانستند نمونه‌ها را به دو گروه، ژاپنی و غیرژاپنی تقسیم نمایند این دو گروه سپس به واریته‌های *sinensis* و *assamica* تقسیم شدند. جی و همکاران (۱۳) در بررسی تنوع ژنتیک جمعیت‌های چای قدیمی کشت شده در چین توسط نشانگر ISSR میزان تنوع ژنتیکی نی درون جمعیت‌ها را ۰/۲۸ و ضریب شانون را ۰/۴۱ محاسبه کردند و سطح تنوع ژنتیکی متعادل در بین جمعیت‌ها بدست آوردند (Gst=۰/۳۹). این میزان تنوع که در بررسی بدست آمده است توسط ماهیت دگر گرده افشانی در گیاه چای قابل توضیح بود و در نهایت آنها اعلام کردند که استراتژی حفاظت ژرم‌پلاسم برای نگهداری این جمعیت‌های چای باستانی ضروری است. در مطالعه دیگری، در انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌های چای توسط نشانگرهای ISSR و RAPD میزان پلی‌مورفیسم به ترتیب ۸۸/۵۴ و ۷۷/۷۷ درصد بود. براساس نمودار حاصل از داده‌ها براساس ضریب ژنتیکی Nei و الگوریتم UPGMA نمونه‌های مورد بررسی در سه خوشه (فرم چینی، فرم آسامی و فرم مخلوط) گروه‌بندی شدند. میزان تنوع ژنتیکی (HT)، تنوع درون جمعیت (HS) و تنوع بین جمعیت (Gst) به‌ترتیب ۰/۳۸، ۰/۲۷ و ۰/۲۵ گزارش گردید. جریان ژنی (Nm) بدست آمده نیز بیان می‌نمود که تغییرات ژنتیکی کمی مابین جمعیت‌ها رخ داده است (۲۸). بن یینگ و همکاران (۷) جهت طراحی برنامه‌های اصلاحی اقدام به بررسی تنوع ژرم‌پلاسم چای منطقه یوننان چین با استفاده از نشاگر ISSR نمودند و گزارش آنها بیان داشت که دامنه تشابه در بین نمونه های این منطقه در محدوده ۴۵ تا ۸۲ درصد با متوسط ۵۱ درصد متغیر می‌باشد که این نتایج بیان از تنوع ژنتیکی بالا در این ژرم‌پلاسم است. براساس تجزیه کلاستر براساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس نیز نمونه‌های مورد بررسی در سه گروه قرارگرفتند که این گروه بندی با الگوی جغرافیایی نمونه برداری همخوانی نداشت. نتایج تجزیه کلاستر آنها توسط آزمون PCA تایید گردید. کاف‌کاس و همکاران (۱۴) در بررسی چندشکل و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چای در کشور ترکیه با استفاده از نشانگر AFLP ۶۹/۸ درصد پلی مورفیسم در بین باندها بدست آوردند. میانگین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (Polymorphic Information Content =PIC)

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

نشانگرهای بکاربرده توسط آنها بطور ۰/۷۹ بود و میزان تشابه بدست آمده توسط این نشانگرها بین ۰/۶۸ تا ۰/۹۲ متغیر بود و میانگین این تشابه ۰/۷۶ گزارش گردید.

اهدف اصلی این تحقیق شناسایی و ارزیابی وضعیت تنوع ژنتیکی موجود در بین ارقام وارداتی و ژنوتیپ‌های انتخابی چای در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD و تایید امکان کاربرد این نشانگرها در این موارد کاری است تا از این طریق به دانش موجود در این رابطه افزوده و کمکی برای حفظ و نگهداری از ژرم‌پلاسم موجود باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: دراین تحقیق تعداد ۶۰ نمونه گیاه چای جمع آوری شده در ژرم‌پلاسم پژوهشکده چای شامل ۳۵ ژنوتیپ بومی ایران (۱۶ نمونه از منطقه غربی چایکاری ایران، ۱۰ نمونه از منطقه مرکزی چایکاری ایران و ۹ نمونه از منطقه شرقی چایکاری ایران)، ۱۵ ژنوتیپ تحت نام دارجلینگ و ۱۰ کلون وارداتی از سریلانکا مورد آزمایش قرارگرفتند. جدول ۱ نمونه‌های بکار رفته، محل نمونه‌گیری و کد بندی آنها را نشان می‌دهد.

آنالیز مولکولی (RAPD): جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت ترمو (کد K0791 یا K0792) (GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific)) استفاده شد.

جدول۱- اسامی نمونه‌های چای بکار رفته در بررسی، گروه ژنوتیپ‌ها، محل نمونه‌گیری و نام علمی آنها

نام علمی Scientific name	محل جمع آوری Location	گروه ژنوتیپ‌ها Genotypes Group	کد نمونه Plant code
Camellia sp.	فشالم Fashalam	ژنوتیپ‌های انتخابی غرب چایکاری Selected genotypes from West tea cultivated area	G1-G16
Camellia sp.	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	ژنوتیپ‌های انتخابی مرکز چایکاری Selected genotypes from Central tea cultivated area	G17-G26
Camellia sp.	نشتارود Nashtarood	ژنوتیپ‌های انتخابی شرق چایکاری Selected genotypes from East tea cultivated area	G27-G35
Camellia sp.	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	ژنوتیپ‌های دارجلینگ Dargeling Genotypes	G36-G50
Camellia sp.	ازبرم Ezbaram	کلون‌های سریلانکا Sri Lanka Clone	G51-G60

جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش اسپکتوفتومتر و دستگاه نانودراپ استفاده گردید و جهت حصول اطمینان از کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. تعداد ۴۰ عدد آغازگر RAPD جهت بهینه سازی و انتخاب بهترین آغازگرها بر روی چهار نمونه DNA گیاه چای که در این بررسی حضور نداشتند مورد بررسی قرارگرفت که در نهایت ۲۴ عدد از آنها که بهترین، قوی‌ترین و تکرار پذیرترین تکثیر را داشتند، جهت ادامه بررسی برگزیده شدند. توالی آغازگرهای RAPD بکار رفته در جدول ۲ آورده شده است. جهت اجرای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ترکیب مواد در داخل هر واکنش شامل DNA الگو ۵۰ng، بافر PCR (۱۰X) به میزان ۱/۲۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار، از هر dNTP به میزان ۰/۲ میلی مولار، آنزیم Taq پلی‌مراز به میزان ۱ واحد و ۰/۷۵ میکرومولار از آغازگر بود که در نهایت توسط آب

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

مقطر به حجم ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرها نیز به صورت زیر تنظیم شد: ابتدا محلول واکنش به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس این محلول وارد مرحله دوم گردید که این مرحله به صورت ۳۵ چرخه و شرایط به این صورت تنظیم گردید: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سی ثانیه بود و در نهایت برای تکثیر و گسترش نهایی محلول واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler استفاده گردید.

محصولات تکثیر شده به نسبت ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۲ میکرولیتر ژل رد در ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه تفکیک گردیدند و زیر نور UV توسط دستگاه ژل داک بیومترا (Biometra) از ژل حاصل عکس برداری شد. جهت آنالیز باندهای تشکیل شده توسط نشانگرهای RAPD حضور باند با عدد (۱) و عدم حضور آن با عدد صفر (۰) در نظر گرفته شد و فقط نوارهای تشکیل شده کاملاً مشخص و مطمئن امتیازدهی شدند و باندهای تار و نامشخص و ضعیف از نظر تکثیر در بررسی حذف شدند. در واقع آغازگرهای بسیار قوی و تکرارپذیر در بررسی تنوع بکار برده شدند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) براساس رابطه $PIC_i=2f_i(1-f_i)$ که برای نشانگرهای غالب توصیه شده است، محاسبه شد (۲۷).

جدول۲- توالی پرایمرهای بکار رفته در بررسی و اطلاعات آماری آنها

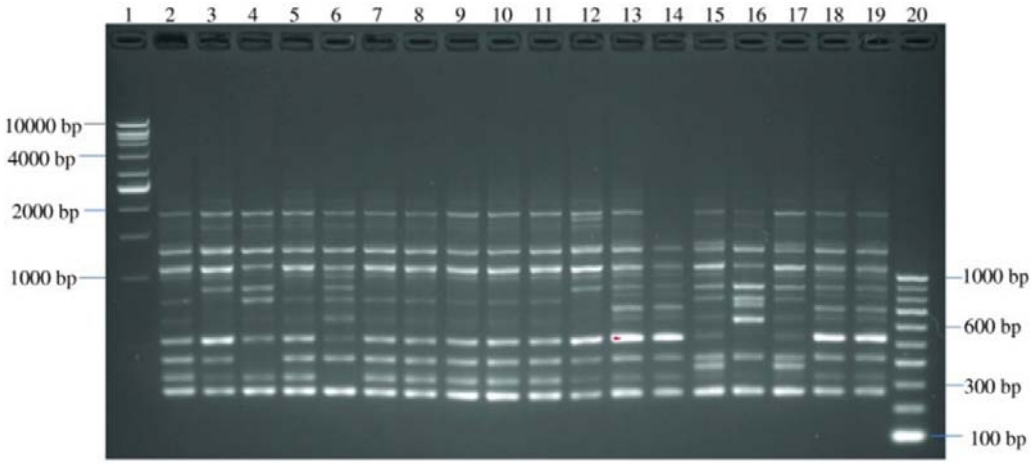
شمار آغازگر Primer No.	توالی پرایمر Primer sequence	تعداد کل قطعات Total No. of fragments	تعداد قطعات چندشکلی No. of polymorphic fragment	درصد چندشکلی Polymorphic percent	محتوای اطلاعات چند شکلی Polymorphic Information Content (PIC)
P2	CCTTGACGCA	11	10	90.91	0.48
P3	CTTCACCCGA	10	8	80.00	0.43
P4	AATCGGGCTG	9	7	77.78	0.47
P6	GAAACGGGTG	6	6	100.00	0.49
P7	GTGACGTAGG	12	8	66.67	0.45
P8	CTGAGACGGA	11	9	81.82	0.42
P10	GTGCCTAACC	8	6	75.00	0.48
P11	GTCCACACGG	8	6	75.00	0.33
P13	TCGGCGATAG	9	6	66.67	0.49
P14	AGGGGTCTTG	8	8	100.00	0.29
P17	AGGTGACCGT	9	7	77.78	0.50
P18	GTCCACTGTG	7	4	57.14	0.45
P19	GTTACCGCGA	7	6	85.71	0.49
P21	CACCATCCGT	11	8	72.73	0.48
P22	CCCGTTGGGA	12	11	91.67	0.48
P23	CTCCATGGGG	7	7	100.00	0.48
P24	TGAGCCTCAC	5	5	100.00	0.41
P26	AAGCCCGAGG	11	8	72.73	0.38
P27	GACCGACCCA	8	8	100.00	0.47
P28	ACCTCAGCTC	8	6	75.00	0.46
P29	CAGCCCAGAG	10	9	90.00	0.42
P32	ACGCCAGTTC	11	10	90.91	0.49
P34	GGTACTCCCC	11	6	54.55	0.50
P35	TGCCGGCTTG	10	9	90.00	0.50
جمع	-	219	178	81.28	0.49
میانگین	-	9.13	7.42	-	-

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آنها به نرم افزار NTSYS-pc, v. 2.02 ماتریس ضریب تشابه SM تشکیل گردید و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها با الگوریتم UPGMA صورت گرفت. تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز توسط برنامه PAST انجام گرفت. از همین داده‌ها برای محاسبه فراوانی‌های آللی (na)، تعداد آلل موثر (ne)، شاخص شانون (I)، تنوع درون جمعیتی (Hs) تنوع کل (Ht) و نسبت تنوع بین جمعیتی به تنوع کل (Gst) به وسیله نرم افزار PopGene v. 1.32 استفاده شد.

نتایج

سودمندی آغازگرهای RAPD بکار رفته: تعداد کل نوارهای تکثیر شده توسط ۲۴ نشانگر RAPD بکار برده (جدول ۳) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۶۰ نمونه مورد بررسی ۲۱۹ نوار بود که ۱۷۸ نوار حالت چندشکلی و ۴۱ نوار حالت یک‌شکلی را نشان دادند. دامنه اندازه قطعات تکثیری در محدوده ۳۰۰ جفت باز الی ۳ کیلوباز بود. دامنه تغییر تعداد نوارها برای هر آغازگر از ۵ نوار در آغازگر P24 تا ۱۲ نوار در آغازگرهای P7 و P22 با متوسط تعداد نوار برای هر آغازگر ۹/۱۳ بود. دامنه نوارهای چند شکل نیز از ۴ نوار در آغازگر P18 الی ۱۱ نوار در پرایمر P22 با متوسط تعداد نوار چندشکل برای هر آغازگر ۷/۴۲ بود. باتوجه به تعداد نوارهای کل و نوارهای چند شکل، درصد چند شکلی نیز محاسبه گردید که این میزان ۸۱/۲۸ درصد بدست آمد. برای بررسی میزان قدرت آغازگرها در شناسایی تنوع و چند شکلی، محتوای اطلاعات چند شکلی آنها براساس فرمول معرفی شده توسط رولدین-روز و همکاران (۲۷) برای آغازگرها بدست آمد و دامنه تغییرات آن از ۰/۲۹ الی ۰/۵۰ بود. حداقل میزان محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگر P14 به میزان ۰/۲۹ و حداکثر آن در آغازگرهای P17، P34 و P35 به میزان ۰/۵۰ مشاهده گردید. میزان محتوای اطلاعات چند شکلی برای تمام نوارهای تکثیری توسط تمام آغازگرها محاسبه شد که میزان PIC کل برابر ۰/۴۹ بدست آمد. جدول ۲ اطلاعات آغازگرهای بکار رفته از جمله توالی، تعداد نوار تکثیری، تعداد نوار چندشکل، در صد چند شکلی و میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) را بیان می¬دارد. شکل ۱ تعدادی از نمونه‌های تکثیر شده توسط آغازگر P27 را نشان می‌دهد.



شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده در ۱۸ نمونه مورد بررسی با استفاده از آغازگر P27، چاهک‌های یک و بیست به ترتیب سایزمارکر ۱kb و ۱۰۰bp

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

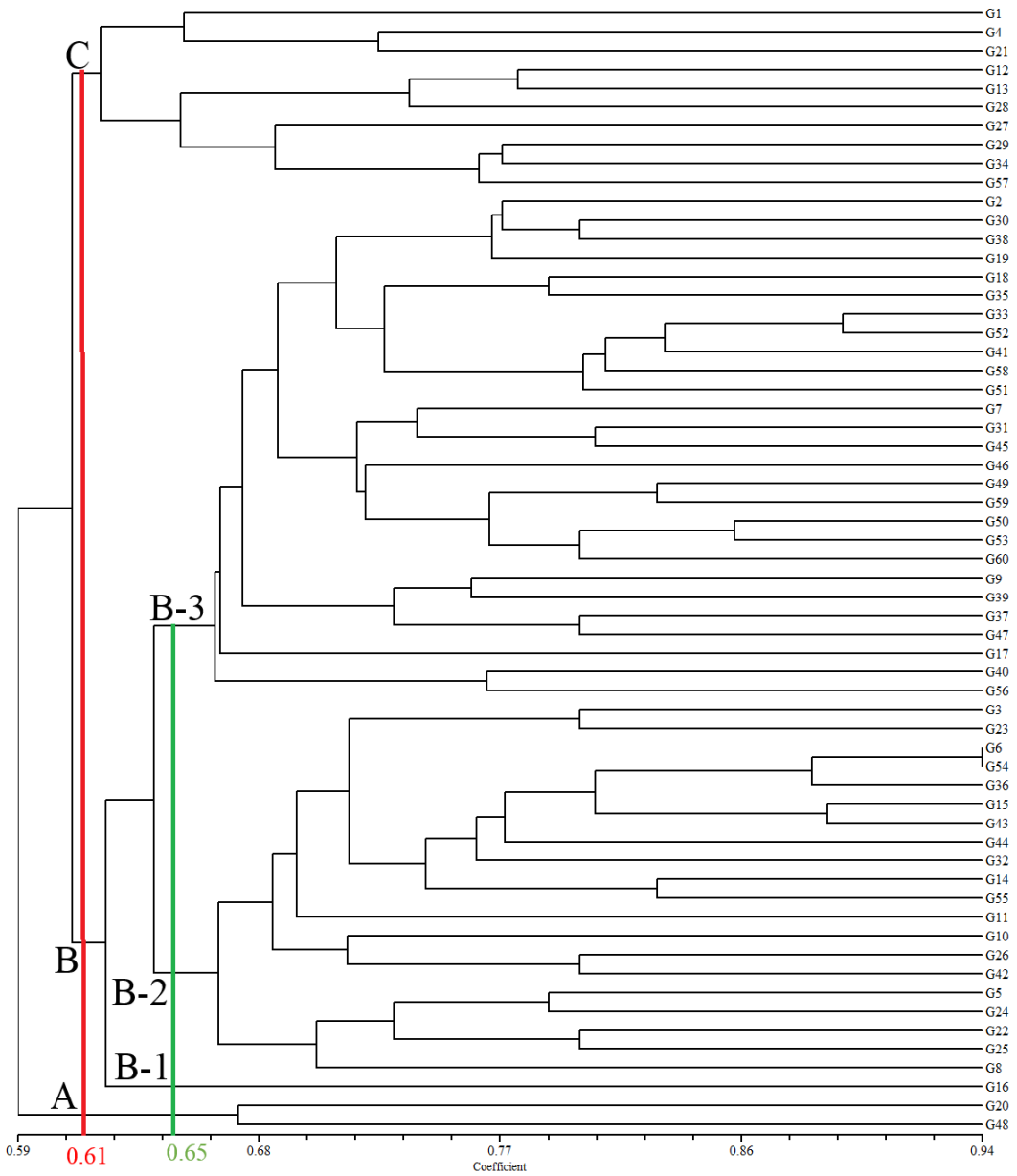
تحلیل ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها براساس داده¬های نشانگرهای RAPD : برای مشخص نمودن بهترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه بندی جهت بررسی میزان تشابه نمونه ها و طراحی کلاستر ضریب کوفنتیک محاسبه شد. در این مطالعه به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های مولکولی، برای مشخص نمودن شباهت‌های مابین نمونه‌ها ضریب‌های تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس مورد استفاده قرارگرفتند و همچنین برای رسم دندروگرام از الگوریتم‌هایUPGMA، اتصال ساده، اتصال کامل استفاده شد. برای تک تک دندروگرام‌های حاصل ضریب کوفنتیک محاسبه گردید، که براساس این محاسبات مشخص گردید ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA بهترین الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب تشابه می‌باشند (جدول ۳). همانطور که از جدول ۳ مشخص است ۷۶ درصد از اطلاعات ماتریس تشابه محاسبه شده در کلاستر طراحی شده نمایش داده می‌شود.

جدول ۳- ضرایب کوفنتیک حاصل از الگوریتم‌ها با ضرایب تشابه براساس داده‌های RAPD

	UPGMA algorithm[a]	Simple Linkage algorithm	Complete Linkage algorithm
DICE similarity coefficient	0.74	0.66	0.60
Jaccard similarity coefficient	0.76	0.68	0.62
SM similarity coefficient	0.71	0.62	0.56

براساس ضریب تشابه جاکارد، ضرایب تشابه در محدوده بین ۰/۴۳ تا ۰/۹۴ با میانگین ۰/۶۵متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۹۴۷) بین نمونه G54 از نمونه‌های سریلانکایی و G6 از نمونه‌های منطقه غرب چایکاری و حداقل میزان تشابه بین دو نمونه G15 از نمونه‌های منطقه غرب چایکاری و نمونه G20 از نمونه‌های منطقه مرکز چایکاری مشاهده شد. براساس خوشه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی توسط داده‌های RAPD (شکل ۲) نمونه‌ها در سطح تشابه ۶۱ درصد در سه خوشه اصلی قرارگرفته‌اند. شکل ۲ نمودار بدست آمده از کاربرد ۲۴ نشانگر RAPD در بررسی تنوع ۶۰ نمونه گیاه چای را نشان می‌دهد. خوشه تشکیل شده اول (A) تنها دارای دو عضو بود (G20 و G48) که یکی متعلق به نمونه‌های منطقه مرکز چایکاری ایران و دیگری متعلق به نمونه‌های منسوب به دارجلینگ می‌باشد. گروه دوم اصلی (B) بزرگترین گروه بود و ۸۰ درصد کل نمونه‌های مورد بررسی (۴۸ نمونه) را در بر می‌گرفت. این گروه در سطح تشابه ۰/۶۵ به سه زیر گروه قابل تفکیک بود. زیر گروه اول (B1) تنها یک عضو (G16) از نمونه های منطقه غرب چایکاری ایران را داشت. زیر گروه دوم (B2) تشکیل شده نیز شامل ۲۰ نمونه مورد بررسی بود. در این زیر گروه از منطقه غربی چایکاری ایران هشت نمونه، منطقه مرکزی چایکاری ایران پنج نمونه، از منطقه شرقی چایکاری ایران یک نمونه، از ژنوتیپ‌های تحت نام دارجلینگ چهار نمونه و از کلون‌های وارداتی سریلانکایی دو نمونه وجود داشتند. زیر گروه سوم تشکیل شده (B3) دارای ۲۷ نمونه مورد بررسی (۵۶/۲۵ درصد نمونه‌های گروه B) بود. دراین زیر گروه نیز توزیع نمونه‌ها به این صورت بود که از منطقه غربی چایکاری ایران سه نمونه، منطقه مرکزی چایکاری ایران سه نمونه، از منطقه شرقی چایکاری ایران چهار نمونه، از ژنوتیپ‌های تحت نام دارجلینگ ده نمونه و از کلون‌های وارداتی سریلانکایی هفت نمونه وجود داشتند. گروه سوم تشکیل شده در سطح تشابه ۶۱/ (C) نیز ده نمونه مورد بررسی را در بر داشت. در این گروه غالبیت نمونه‌های مورد بررسی متعلق به نمونه‌های مناطق چایکاری ایران می‌باشد.

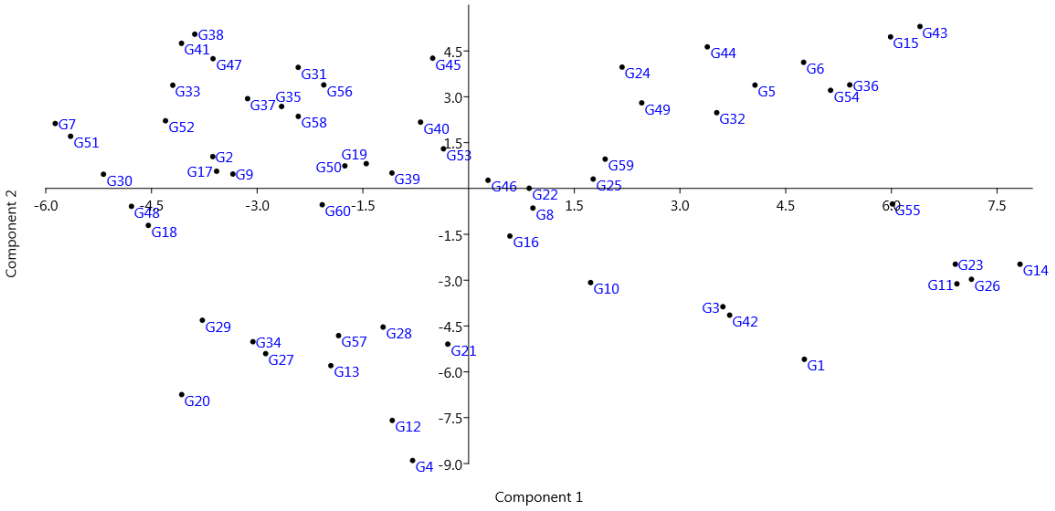
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6



شکل ۲- نمودار ۶۰ نمونه چای با استفاده از نشانگرهای RAPD به روش UPGMA.

در تجزیه بای‌پلات (شکل ۳) مشخص گردید که نمونه‌های مورد بررسی از الگوی خاص جغرافیایی پیروی نمی‌کنند و توزیع آنها بصورت یکسانی در محدوده دو عامل اول صورت گرفته است. در تجزیه به مولفه‌های اصلی مشخص گردید که ده شاخصه اول ۵۰/۲۸ درصد تفاوت‌ها را ایجاد می‌نمودند. شکل ۳ نمودار بای‌پلات بدست آمده براساس داده‌های مولکولی RAPD را نشان می‌دهد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6



شکل ۳- نمودار بای‌پلات حاصل براساس نشانگرهای RAPD از ۶۰ نمونه چای.

تجزیه جمعیتی نمونه‌های مورد بررسی: باتوجه به مناطق نمونه‌گیری می‌توان نمونه‌ها را در پنج زیرجمعیت متفاوت، قرار داد. جهت بررسی و تجزیه جمعیتی نمونه ها شاخص‌های مختلف ژنتیکی شامل تعداد نوار مشاهده شده (na)، تعداد نوار موثر (ne)، میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) و میزان شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) درون هر زیرجمعیت محاسبه شد (جدول ۴).

بیشترین میانگین تعداد نوار مشاهده شده (na) در جمعیت غرب (۱/۹۴) و کمترین آن در زیر جمعیت کلون‌های وارداتی از سریلانکای کشت شده در ایستگاه ازبرم (سیاهکل) (۱/۷۹) محاسبه شد. همچنین کمترین میانگین تعداد نوار موثر (ne) مربوط به جمعیت انتخابی شرق چایکاری ایران (۱/۵۶) و بیشترین آن مربوط به جمعیت انتخابی غرب چایکاری ایران (۱/۶۵) بود. کمترین میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) در میان جمعیت انتخابی شرق چایکاری ایران (۰/۳۱۸) و بیشترین در جمعیت انتخابی غرب چایکاری ایران (۰/۳۶۲) بود. بیشترین میزان شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) درون جمعیت انتخابی غرب چایکاری ایران (۰/۵۲۸) و کمترین آن مربوط به جمعیت کلون‌های وارداتی از سریلانکای کشت شده در ایستگاه ازبرم (سیاهکل) (۰/۴۶۳) می‌باشد. میانگین تعداد نوار مشاهده شده (na) کل، میانگین تعداد نوار موثر (ne)، میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) کل و میزان شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) کل به ترتیب ۲/۰۰، ۱/۶۵، ۰/۳۶۷ و ۰/۵۴۰ محاسبه گردید. در ادامه آنالیز جمعتی نمونه‌های مورد بررسی، شاخص‌های تنوع کل جمعیت (Ht)، تنوع درون زیر جمعیت‌ها(Hs)، تنوع بین زیر جمعیت‌ها (Gst) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۵).

از بررسی میزان تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های چای براساس روش RAPD با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۲) (جدول ۶) مشخص گردید که تشابه ژنتیکی بالایی مابین ژنوتیپ‌های چای موجود در ایران وجود دارد بطوری که حداکثر میزان تشابه بین جمعیت‌ها، بین جمعیت کلون‌های وارداتی از سریلانکا و جمعیت منسوب به دارجلینگ (۰/۹۵۰) و حداقل آن نیز بین جمعیت کلون‌های وارداتی از سریلانکا و نمونه‌های انتخابی منطقه مرکزی چایکاری (۰/۹۱۹) محاسبه شد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

جدول ۴- تعداد نمونه، تعداد نوار مشاهده شده، تعداد نوار مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص تنوع ژنتیکی شانون در زیر جمعیت‌ها و کل جمعیت

جمعیت population	اندازه نمونه Sample size	تعداد نوار مشاهده شده Observed number of alleles (na)	تعداد نوار مؤثر Effective number of alleles (ne)	شاخص تنوع ژنتیکی نی Nei's gene diversity (h)	شاخص تنوع ژنتیکی شانون Shannon's Information index (I)
منطقه غرب West area	16	1.94	1.65	0.362	0.528
منطقه مرکز Center area	10	1.89	1.59	0.335	0.494
منطقه شرق East area	9	1.84	1.56	0.318	0.468
منسوب به دارجلینگ Attributed to Darjeeling	15	1.89	1.58	0.327	0.482
کلون‌های سریلانکایی Sri Lankan clones	10	1.79	1.57	0.319	0.463
کل Total	60	2.00	1.65	0.367	0.540

جدول ۵- شاخص‌های تنوع کل جمعیت، تنوع درون زیر جمعیت‌ها، تنوع بین زیر جمعیت‌ها

	اندازه نمونه Sample Size	تنوع کل Total genetic diversity (Ht)	تنوع درون زیر جمعیت‌ها The genetic differentiation within population (Hs)	تنوع بین زیر جمعیت‌ها The genetic differentiation among population (Gst)
میانگین Mean	60	0.366	0.332	0.092
انحراف از معیار St. Dev		0.021	0.018	

جدول ۶- تشابه ژنتیکی نی (۱۹۷۲) (اعداد بالا) و فاصله ژنتیکی (اعداد پایین) در مطالعه نمونه‌های چای

جمعیت population	منطقه غرب West area	منطقه مرکز Center area	منطقه شرق East area	منسوب به دارجلینگ Attributed to Darjeeling	کلون‌های سریلانکایی Sri Lankan clones
منطقه غرب West area	***	0.944	0.938	0.943	0.938
منطقه مرکز Center area	0.057	***	0.931	0.937	0.919
منطقه شرق East area	0.063	0.071	***	0.934	0.932
منسوب به دارجلینگ Attributed to Darjeeling	0.58	0.065	0.067	***	0.950
کلون‌های سریلانکایی Sri Lankan clones	0.063	0.083	0.069	0.0512	***

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

بحث و نتیجه گیری

سودمندی آغازگرهای RAPD بکار رفته: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان چای ایران و مقایسه آنها با برخی از ارقام خارجی موجود به عنوان استاندارد ذکر شده در جدول ۱ از نشانگر مولکولی RAPD استفاده شد. جهت انتخاب مناسب‌ترین نشانگرها از میان ۴۰ نشانگر RAPD موجود در مجموعه پژوهشکده چای تعداد ۲۴ نشانگر که دارای قدرت تکثیر و تکرار پذیری بالاتری نسبت به سایر نشانگرها بودند پس از بررسی کارایی و سودمندی بر روی سه نمونه DNA گیاه چای که در بررسی وارد نشده بودند، گزینش شدند و برای بررسی تنوع نمونه‌های اصلی مورد استفاده رفتند. باتوجه به اعداد بدست آمده از امتیاز دهی باندهای مطلوب مشاهده شده شاخص‌های تعداد قطعات تکثیری کل، تعداد قطعات تکثیری چند شکل، درصد چند شکلی قطعات تکثیری و محتوای چندشکلی محاسبه شد که باتوجه به اعداد بدست آمده مشخص گردید که نشانگرهای گزینش شده برای این گونه بررسی ها مناسب می‌باشند. بر اساس داده‌های موجود درصد چند شکلی قطعات تکثیری توسط نشانگرهای مورد استفاده محاسبه شد (۸۱/۲۸ درصد) و مقایسه آن با مطالعات مشابه گذشته بر روی گیاه چای (۱، ۹، ۱۰و ۲۸) مشخص گردید که این دسته از نشانگرها میزان چندشکلی مطلوبی را نشان می-دهند. در بررسی فلک‌رو و خیاوی (۱۱) توسط نشانگر RAPD نیز دامنه درصد چند شکلی از ۶۶/۷ تا ۱۰۰ درصد با متوسط ۷۸/۶ درصد بود. دامنه تغییرات محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) می‌تواند در محدوده صفر الی ۰/۵ باشد که هرچه میزان محاسبه شده بالاتر باشد، نشانه کاربرد و قدرت تفکیک بهتر آغازگرهاست و همانطور که از جدول ۱ مشخص می باشد از تعداد ۲۴ نشانگر بکار برده تنها سه نشانگر P11، P14 و P26 دارای میزان PIC کمتر از ۰/۴ می باشند که تایید کننده توانایی بالای نشانگرها برای تفکیک نمونه‌ها و شناسایی تنوع بین آنها می‌باشد. در مطالعه فلک‌رو و خیاوی (۱۱) نیز در بررسی توسط نشانگر RAPD میزان PIC در کل نشانگرهای بکار رفته ۰/۴۸ بدست آمده است که نشان از این می‌باشد که نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتکی گیاه چای نشانگر مناسبی است. از روی این میزان محتوای اطلاعات چند شکلی کل محاسبه شده می‌توان بیان داشت که آغازگرهای بکار رفته در این بررسی دارای قدرت بالایی در تشخیص تنوع ژنتیکی نمونه‌های گیاه چای داشتند.

تحلیل ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها بر اساس داده¬های نشانگرهای RAPD: ضریب کوفنتیک نشان می‌دهد که چقدر از اطلاعات اولیه یا ماتریس ورودی توانسته است به دندروگرام منتقل شود. در واقع همبستگی بین ماتریس ورودی و ماتریس خروجی را نشان می‌دهد. به طور کلی در تجزیه خوشه‌ای توسط داده‌های مولکولی، ضریب کوفنتیک بالا دلیل به کارایی نمودار در بیان شباهت‌های محاسبه شده می‌باشد. دامنه تغییرات ضریب کوفنتیک می‌تواند از صفر تا یک باشد. اگر ضریب بالای ۰/۹ (r>۰/۹) باشد، بیان اطلاعات خیلی خوب صورت گرفته است، اگر دامنه ضریب مابین ۰/۹ و ۰/۷ (r<۰/۹>۰/۶) باشد، بیان اطلاعات خوب بوده و اگر ضریب کمتر از ۰/۷ (r<۰/۶) باشد، ویژگی‌های محاسبه شده در ماتریس تشابه به صورت ضعیفی در خوشه‌بندی حاصل، نشان داده شده است. ضریب کوفنتیک پایین در تجزیه خوشه‌ای، همیشه دلیل بر عدم کارایی نمودار بدست آمده نمی‌باشد بلکه دلیل این امر می‌تواند به شرایط غیرعادی در داده‌ها مربوط باشد (۲۶). با توجه به محاسبات انجام شده ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA با داشتن ضریب کوفنتیک ۰/۷۶ مناسبترین ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم برای بررسی میزان تشابه و تجزیه خوشه‌ای بودند.

دامنه تشابه در این پژوهش از۰/۴۳ تا ۰/۹۴ محاسبه شد که بیانگر تنوع قابل توجهی در بین نمونه‌های مورد مطالعه

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

بود. دامنه تشابه حاصل توسط نشانگر RAPD در این مطالعه با میزان گزارش شده توسط محققین دیگر همخوانی داشت (۷، ۱۸و ۲۱) البته دامنه شباهت گزارش شده توسط پژوهش حاضر گسترده‌تر از پژوهش‌های مورد اشاره بود که دلیل آن می‌تواند به تعداد نشانگرهای بیشتر بکار رفته و تعداد نمونه‌های مورد بررسی که در پروژه حاضر مورد استفاده قرارگرفتند باز گردد. در مقایسه بررسی پیش رو با مطالعات گذشته دامنه تشابه ۰/۴۳ الی ۰/۹۴ تنوع بالایی را مشابه مطالعات میشرا و سن-مندی (۲۲)، یانگ و همکاران (۳۱) و یائو و همکاران (۳۲) نشان می‌دهد که دلیل این موضوع می‌تواند به دگرگشن بودن، خودناسازگاری (۶) و تکثیر بذری چای در ایران بازگردد. در تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های مورد بررسی نکات قابل ذکری مشاهده می گردد. خوشه اول تشکیل شده (A) که تنها دو عضو دارد باتوجه به آنکه نمونه‌های منطقه مرکز چایکاری از همین مناطق جمع آوری شداند و نمونه‌های منسوب به دارجلینگ نیز ژنوتیپ‌هایی هستند که براساس داده‌های چاپ نشده منسوب به دارجلینگ خوانده می‌گردند و همچنین تصادفی بودن نشانگر مورد استفاده، جدا شدن این دو نمونه و تشکیل دادن یک گروه قابل توجیه می‌باشد.

در گروه دوم تشکیل شده (B) اختلاط زیادی مابین نمونه-ها مشاهده می‌گردد که این میزان اختلاط با توجه به سوابق مطالعاتی پیشین قابل پذیرش می‌باشد زیرا در مطالعات احمدی شاد (۱۳۸۴) نیز اختلاط کلون‌های سریلانکایی و ژنوتیپ‌هایی ایرانی گزارش شده است. در بررسی خیاوی و همکاران (۲) که نمونه‌هایی از این سه منطقه را به همراه نمونه‌هایی از کشور سریلانکا را مورد بررسی قراردادند نیز مشاهده می‌گردد که اختلاط بالایی مابین نمونه‌های چای ایرانی و کلون‌های وارداتی مشاهده می‌گردد. همچنین در مطالعه دیگری که توسط نشانگر SRAP تنوع کلون‌های چای وارداتی با برخی ژنوتیپ‌های منطقه مرکزی چایکاری در ایران را مورد بررسی قرار داده‌اند نیز اختلاط بالایی مابین نمونه‌ها در گروه‌های شناسایی شده مشاهده شده است (۱۶). باتوجه به آنکه اکثر بوته‌های چای سطح مناطق چایکاری از بوته‌های محدودی تکثیر گردیده‌اند لذا این اختلاط و رابطه را می‌توان قابل قبول دانست بطوری که در بررسی چای‌های وحشی کشور تایوان نیز اختلاط و رابطه نزدیکی بین ژنوتیپ‌های وحشی و ارقام چای گزارش شده است (۱۷). زمانی که کل کلاستر حاصل از نشانگر RAPD و داده‌های حاصل از آن، بطور جامع مدنظر قرار می‌گیرد این نکته خود نمایی می‌کند که مجموعه‌ی داده‌های حاصل از بررسی تنوع با استفاده از نشانگر RAPD نشان از تنوع ژنتیکی مطلوبی در بین ژرم‌پلاسم چای موجود (شامل ارقام و ژنوتیپ‌های موجود) دارد.

با مقایسه نتایج بدست آمده از بررسی مولکولی با نشانگر RAPD با نتایج نشاگرهای مورفولوژی (۲) مشخص می‌گردد که بررسی‌های مولکولی کاملاً با بررسی‌های مورفولوژی در چای همخوانی ندارد که مشابه همین موضوع توسط چن و همکاران (۹) گزارش شده است دلایلی که برای این امر می‌توان ذکر کرد عدم هماهنگی در تعداد نمونه‌های مورد بررسی و دلیل احتمالی دیگر گرده افشانی آزاد (دگر گرده افشانی بالا) (۳۰) در گیاه چای می‌باشد که منجر به هتروزیگوتی بالایی در گیاه چای می‌گردد. علاوه بر این شرایط محیطی نیز می‌تواند بر ویژگی‌های ژنتیکی (فنوتیپ) در طولانی مدت اثر بگذارد. با انجام تجزیه بای‌پلات (شکل ۳) نتیجه‌گیری می شود که توزیع نمونه‌ها مانند تجزیه خوشه‌ای از الگوی جغرافیایی خاصی تبعیت نمی‌کنند. زمانی که نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای را با نمودار بای‌پلات تطبیق می‌دهیم متوجه می‌گردیم که دو نمونه گروه اول (A) که در سطح تشابه ۰/۵۹ از سایر نمونه‌ها جدا شده بودند در محدوده سایر نمونه‌ها قرارگرفته‌اند. این نحوه قرارگیری باتوجه به منشأ اولیه گیاه چای در ایران و همچنین محل نمونه گیری قابل قبول بوده و نمی‌توان بیان نمود این دو نمونه از سایر نمونه‌های چای مجزا می‌باشند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

تجزیه جمعیتی نمونه‌های مورد بررسی: براساس منطقه بندی نمونه گیری و شاخص‌های ژنتیکی محاسبه شده (به جدولهای ۴ و ۵ رجوع گردد) مشاهده شد که میزان شاخص‌های محاسبه شده به یکدیگر بسیار نزدیک می‌باشد که دلیل آن به انشعاب تمام بوته‌های چای از یک منبع و تعداد محدودی گیاه باز می‌گردد زیرا براساس منابع اساس ژنتیکی گیاه چای در ایران از سه واریته بذری عمومی (jat) به نامهای Rajghur، Betjan و Dhonjan می‌باشد (۱). براساس میزان شاخص شانون محاسبه شده (جدول ۴) و از آنجایی که شاخص شانون محاسبه شده در محدوده ۰/۹ الی ۰/۷ (۰/۷<I<۰/۹) نبود، می‌توان بیان کرد که مابین زیرجمعیت‌ها تنوع محدودی وجود دارد؛ همچنین شاخص تنوع ژنتیکی نی محاسبه شده (جدول ۴) که در حالت کلی ۰/۳۶۷ بدست آمده است، بیان می‌دارد که تنوع متوسطی مابین زیر جمعیتها دیده می‌شود. این نتایج توسط اعداد بدست آمده از بررسی شاخصهای جدول ۵ نیز تایید می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گیری کرد که تمام بوته‌های چای موجود در ایران با یکدیگر خویشاوندی جمعیتی بالایی دارند. پائول و همکاران (۲۳) در مقایسه میزان تنوع و روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های گیاهان چای هند و کنیا به‌وسیله نشانگر AFLP، میزان تنوع درون جمعیت‌ها و بین جمعیت‌های چای هند و کنیا را به‌طور متوسط ۰/۷۹ و ۰/۲۱ (به ترتیب) بیان نمودند. کایوندیون و همکاران (۱۵) توسط نشانگر RAPD-PCR اقدام به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۷ اکسیشن برتر چای از کره، ژاپن و تایوان کردند و نتیجه نشان داد که ۷۱ درصد تنوع درون گروه‌ها و ۲۹ درصد آن بین گروه‌ها بود. لای و همکاران (۱۷) به بررسی روابط ژنتیکی سه نوع چای شامل ارقام چای چینی اصلاح‌شده در تایوان، چای آسامی و چای بومی تایوان با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR پرداختند. نتیجه نشان داد که تنوع ژنتیکی جمعیت چای وحشی بومی تایوان، بالاترین مقدار از سه جمعیت مورد مطالعه را دارا بود. بلاساروانان و همکاران (۵) با بررسی تنوع ژنتیکی چای‌های جنوب هند توسط نشانگر AFLP، نمونه‌ها را در سه گروه کاملاً مشخص آسامی، چینی و مخلوط (حد میانه) قرار دادند گروه چینی بالاترین شاخص تنوع (۰/۶۱) و فرم آسام حداقل تنوع (۲۸ درصد) را نشان داد، این موضوع بیان می‌دارد با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان تفاوت بین جمعیت‌های چای را تشخیص داد. در بررسی آن‌ها بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه آسام و گروه حد واسط (۰/۹۶) و حداقل فاصله بین آسام و چینی (۰/۸۵) محاسبه و گزارش‌شده است. روی و چاکرابورتی (۲۸) انگشت‌نگاری ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ چای را توسط ۷ نشانگر ISSR و ۱۲ نشانگر RAPD انجام دادند. میزان تنوع ژنتیکی کل (Ht)، تنوع درون جمعیت (Hs) و تنوع بین جمعیت (Gst)، به ترتیب ۰/۳۸، ۰/۲۷ و ۰/۲۵ بود. تانی‌گوچی و همکاران (۲۹) در مطالعه‌ای ۷۸۸ اکسیشن ژرم‌پلاسم چای را با استفاده از ۲۳ نشانگر SSR آنالیز کردند. این آنالیز ژرم‌پلاسم را به دو گروه، ژاپنی و غیر ژاپنی تقسیم کرد. که بعداً به دو واریته *sinensis* و *assamica* تقسیم شدند. تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم نوع چینی، تایوان، هند و سریلانکا بالاتر از دیگر کشورها و پایین‌تر از ژاپنی بود.

باتوجه به داده های بدست آمده از بررسی میزان تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های چای براساس روش RAPD با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۲) (جدول ۶) مشخص می‌شود که نمونه‌های گیاه چای که در ایران کشت می‌گردند با یکدیگر رابطه ژنتیکی بالایی دارند که با توجه به منشأ اولیه محدود گیاه چای در ایران (۱) این موضوع کاملاً مورد تایید می‌باشد اما همانطور که مشخص است مابین نمونه‌های تحت کشت در ایران و نمونه‌های وارداتی از منطقه سریلانکا بیشترین فاصله دیده می‌گردد که مجدداً براساس منابع (۱) که ذکر کرده‌اند منشأ چای ایرانی از تیپ‌های چینی می‌باشد این موضوع نیز کاملاً پذیرفتنی است. یکی از دلایل اختلاط بالای نمونه‌های در تجزیه

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

کلاستر شکل ۲ نیز می‌تواند به همین موضوع باز گردد که تفاوت منطقه نمونه گیری تأثیر در تفکیک نمونه‌ها ندارد.

همانطور که از داده‌های بدست آمده از بررسی‌های پیشین مشخص است دامنه تفاوت وسیعی مابین جمعیت‌ها نسبت به بررسی پیش رو دیده می‌شود که این موضوع به زادگاه و سابقه کشت گیاه چای در منطقه تحت بررسی باز می‌گردد که این موضوع با میزان تشابه بالای محاسبه شده مابین جمعیت‌های بوته چای تحت کشت در ایران باتوجه به پیشینه محدود کشت چای و همچنین تعداد اجداد محدود وارداتی اولیه بوته چای که تمام بوته‌های موجود، از آن تعداد محدود منشا گرفته‌اند، کاملاً قابل قبول می‌باشد.

سپاسگزاری

نتایج مقاله حاصل مستخرج از پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۸۸۰۰۷-۲۱-۲۱-۲ در پژوهشکده چای انجام پذیرفته است و در همین جا نویسندگان از تمام همکاران و مسئولین پژوهشکده که آنها را در انجام این پروژه یاری نمودند اعلام تشکر و سپاس دارند.

منابع

۱. احمدی‌شاد، م.ع.، کاظمی‌تبار، س.ک، بابائیان جلودار، ن.ع.، غلامی، م.، و کاظمی پشت‌مساری، ح.، ۱۳۸۸. ارزیابی تنوع ژنتیکی کلون‌های زراعی چای در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی راپید، پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، ۱(۴)، صفحات ۶۵-۷۶.

۲. خیاوی، ش.ج.، فلک‌رو، ک.، چائی‌کار، ص.ص.، رمزی، س.، و کهنه، الف.، ۱۳۹۸. کاربرد نشانگرهای مورفولوژی و ISSR جهت شناسایی برخی ژنوتیپ‌های چای، نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۶(۴)، صفحات ۱۳۱-۱۴۷

۳. فلک‌رو، ک.، خیاوی، ش.ج.، غلامی، م.، و پورعزیزیان، س.، ۱۳۹۶. انگشت نگاری برخی ارقام چای تحت کشت با نشانگر RAPD، همایش ملی چای و دمنوش¬های گیاهی، لاهیجان.

۴. قره‌یاضی، ب.، ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات، مجموعه مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحات ۲۰۰-۱۶۲.

5. Balasaravanan, T., Pius, P.K., Kumar, R.R., Muraleedharan, N., and Shasany, A.K., 2003. Genetic diversity among south Indian tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C, assamica* spp. *lasiocalyx*) using AFLP markers, Plant Science, 165 (2), PP: 365-372.

6. Bali, S., Raina, S.N., Bhat, V., Aggarwal, R.K., and Goel, S., 2013. Development of a set of genomic microsatellite markers in tea (*Camellia* L.,)(Camelliaceae), Molecular breeding, 32(3), PP: 735-741.

7. Ben-Ying, L.I.U., You-Yong, L.I., Yi-Chun, T.A.N.G., Li-Yuan, W.A.N.G., Cheng, H., and Ping-Sheng, W.A.N.G., 2010. Assessment of genetic diversity and relationship of tea germplasm in Yunnan as revealed by ISSR markers. Acta Agronomica Sinica, 36(3), PP: 391-400.

8. Chaeikar, S.S., Falakro, K., Rahimi, M., Khiavi, S.J., and Ashourpour, M., The investigation of genetic diversity based on SCoT markers, morphological, and chemical characters in tea (*Camellia sinensis* L.) clones. Journal of Horticulture and Postharvest Research, 3(2), PP: 269-284

9. Chen, L., Gao, Q.K., Chen, D.M., and 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 a tea germplasm repository. Biodiver. Conserv, 14(6), PP: 1433-1444.

10. Devarumath, R., Nandy, S., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N., and Raina, S., 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type), Plant Cell Reports, 21(2), PP: 166-173.

11. Falakro, K., and Khiavi, S.J., 2020. Assessment of genetic diversity and relationships among tea genotypes in Iran based on RAPD and ISSR

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

markers, Journal of Horticulture and Postharvest Research, 3(2), PP: 209-220.

12. Gutman, F., Bar-Zvi, D., Nerd, A., and Mizrahi, Y., 2001. Molecular typing of Cereus peruvianus clones and their genetic relationships with other Cereus species evaluated by RAPD analysis. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 76(6), PP: 709-713.

13. Ji, P.Z., Li, H., Gao, L.Z., Zhang, J., Cheng, Z.Q., and Huang, X.Q., 2011. ISSR diversity and genetic differentiation of ancient tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) plantations from China: implications for precious tea germplasm conservation. Pakistan Journal of Botany, 43(1), PP: 281-291.

14. Kafkas, S., Ercisxli, S., Dogan, Y., Erturk, Y., Haznedar, A., and Sekban, R., 2009. Polymorphism and genetic relationships among tea genotypes from turkey revealed by amplified fragment length polymorphism markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 134, PP: 428–434.

15. Kaundun, S.S., Zhyvoloup, A., and Park, Y.G., 2000. Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. Euphytica, 115(1), PP: 7-16.

16. Khiavi, S.J., Azadi Gonbad, R., and Falakro, K., 2020. Identification of genetic diversity and relationships of some Iranian tea genotypes using SRAP markers. Journal of Horticulture and Postharvest Research, 3(1), PP: 25-34.

17. Lai, J.A., Yang, W.C., and Hsiao, J.Y., 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 42 p.

18. Liu, B.Y., Wang, L.Y., Li, Y.Y., He, W., Zhou, J., Wang, P.S., and Cheng, H., 2009. Genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) germplasms as revealed by ISSR markers. Indian Journal of Agricultural Sciences, 79(9), PP: 715-721.

19. Ma, J.Q., Yao, M.Z., Ma, C.L., Wang, X.C., Jin, J.Q., Wang, X.M. and Chen, L., 2014. Construction of a SSR-based genetic map and identification of QTLs for catechins content in tea plant (*Camellia sinensis*), PloS one,9(3), doi:10.1371/journal.pone,0093131

20. Matsumoto, S., Kiriwa, Y., and Takeda, Y., 2002. Differentiation of Japanese green tea as revealed by RFLP analysis of phenyl-alanine ammonia-lyase DNA, Theoretical and Applied Genetics, 104, PP: 998–1002.

21. Mewan, K.M., Gunasekare, M.T.K., Karunanayake, E.H., Everard, J.M.D.T., and Liyanage, A.C., 2005. Studying genetic relationships among tea (Camellia sinensis L.) cultivars in Sri Lanka using RAPD markers. Sri Lanka Journal of Tea Science, 70(1), PP: 42-53.

22. Mishra, R.K., and Sen-Mandi, S., 2004. Molecular profiling and development of DNA marker associated with drought tolerance in tea clones growing in Darjeeling, Current Science, PP: 60-66.

23. Paul, S., Wachira, F.N., Powell, W., and Waugh, R., 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O., Kuntze) revealed by AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 94(2), PP: 255-263.

24. Raina, S.N., Ahuja, P.S., Sharma, R.K., Das, S.C., Bhardwaj, P., Negi, R., Sharma, V., Singh, S.S., Sud, R.K., Kalia, R.K. and Pandey, V., 2012. Genetic structure and diversity of India hybrid tea, Genetic resources and crop evolution, 59(7), PP: 1527-1541.

25. Ramakrishnan, M., Rajanna, L., Narayanaswamy, P., and Simon, L., 2009. Assessment of genetic relationship and hybrid evaluation studies in tea (*Camellia* sp.) by RAPD, International Journal of Plant Breeding and Genetics, 3, PP: 144-148.

26. Rincón-Sánchez, F., Johnson, B., Crossa, J., and Taba, S., 1996. Cluster analysis, an approach to sampling variability in maize accessions. Maydica, 41(4), PP: 307-316.

27. Roldàn-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J., Coll, R., Van Eijk, M.J.T., and De Loose, M., 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization, Molecular Breeding, 6(6), PP: 593-602.

28. Roy, S.C., and 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(4), PP: 370-376.

29. Taniguchi, F., Kimura, K., Saba, T., Ogino, A., Yamaguchi, S., and Tanaka, J., 2014. Worldwide core collections of tea (*Camellia sinensis*) based on SSR markers, Tree genetics & genomes, 10(6), PP: 1555-1565.

30. Wachira, F.N., Powell, W., and Waugh, R., 1997. An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* L.,(cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.2.6

polymorphic DNA and organelle-specific STS. Heredity, 78(6), PP: 603-611.

31. Yang, Y., Liu, Z., Zhao, Y., Liang, G., and Zhao, X., 2009. Genetic diversity and relationship of Huangjincha cultivar based on EST-SSR markers, Journal of Tea Science, 29(3), PP: 236-242.

32. Yao, M.Z., Chen, L., and Liang, Y.R., 2008. Genetic diversity among tea cultivars from China, Japan and Kenya revealed by ISSR markers and its implication for parental selection in tea breeding programmes, Plant Breeding, 127(2), PP: 166-172.

RAPD markers, instruments for determining the genetic relationships of tea plant in Iran

Falakro K.[1], Jahangirzadeh Khiavi Sh.[1], Gholami M.[2] and Pour Azizan S.[1]

[1] Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, I.R. of Iran

[2] Horticulture-Crops Research Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, I.R. of Iran.

Abstract

One of the important crop in the north of Iran that now many of them are at risk of disappearing, is tea plant (*Camellia sinensis*). In this study 60 accessions using 24 RAPD markers were investigated. Used RAPD markers amplified 219 bands that 81.28% of them showed polymorphic pattern. Polymorphic Information Content (PIC) were calculated for all markers (0.29-0.50). Total calculated PIC for all markers was 0.49 that evidenced the usefulness and high level of efficiency of used markers for investigating the diversity of available accessions. The pairwise similarity coefficient between the accessions varied from 0.43 to 0.94 whit average 0.65 by using Jaccard's coefficient. According to cluster analysis samples were divided into three main groups at 0.61 similarity and second group also created three sub-group (at 0.65 similarity). The notable point in this cluster analysis is that the samples did not follow the geographical pattern. Similar result was observed in bi-plot analysis. In comparing the similarity and genetic distance of the studied populations, it was found that there is a high genetic similarity between the tea populations in Iran (0.919-0.950). In general, the results of this study showed that when the samples are compared individually, they show high diversity, but when we compared them demographically, it is clear that the diversity between the populations are low due to the way propagation, cross-pollination of tea plants and the number of imported primary plants are restored.

Key words: *Camellia sinensis*, Genetic diversity, RAPD Marker, Polymorphic Information Content, Bi-plot