



دانشگاه گوارش و صنایع غذایی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و هفتم، شماره سوم، ۱۳۹۹

۲۶۵-۲۷۸

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2019.16776.2539

مطالعه تنوع DNA کلروپلاستی و روابط ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های چای

*شاهین جهانگیرزاده خیاوی^۱ و کوروش فلکرو^۲

^۱استادیار پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران،

^۲محقق پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: گیاه چای [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze] گیاهی نوشیدنی غیرالکلی با ویژگی‌های دارویی بسیاری است که در قرن گذشته وارد ایران شده و در منطقه شمال کشور کشت شده است. مطالعات زیادی روی ژنوم هسته این گیاه صورت گرفته است اما بررسی روابط ژنوم اندامکی در این گیاه بسیار محدود می‌باشد. در این پژوهش برای اولین بار با استفاده از ژنوم کلروپلاست، تنوع بخشی از ژرم پلاسما چای موجود در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تعداد ۳۵ نمونه گیاه چای از شش جمعیت (منطقه شرق چایکاری (نشتارود)، منطقه مرکز چایکاری (لاهیجان)، منطقه غرب چایکاری (فشالم)، ژنوتیپ‌های وارداتی از گرجستان، کلون‌های وارداتی از ژاپن و کلون‌های وارداتی از سریلانکا) موجود در سه کلکسیون پژوهشکده چای مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و کاملاً توسعه یافته انجام و DNA کل آنها استخراج شد. با استفاده از پنج جفت پرایمر عمومی کلروپلاست معرفی شده (DT, LF, HK, SC, rbcL) و چهار آنزیم برشی (PstI, AluI, HinfI, BglIII) با کار برد روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز-تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) تنوع موجود در ژنوم کلروپلاست این گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند. برنامه‌های NTSYS و POPGENE برای آنالیز خوشه‌ای و جمعیتی داده‌ها، استفاده شدند.

یافته‌ها: در این بررسی حدود ۶۹۸۰bp از ژنوم کلروپلاست گیاه چای در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شده و با استفاده از آنزیم‌های برشی بررسی گشتند. از ۲۰ ترکیب آغازگر/آنزیم ممکن، چهار ترکیب DT/AluI, DT/HinfI, LF/PstI, HK/HinfI حالت چند شکلی نشان داده و این چهار ترکیب نمونه‌ها را در هفت گروه هاپلوتایپی (H1, H2, H3, H4, H5, H6 و H7) قرار دادند. تمام این گروه‌بندی‌ها به دلیل رخ دادن جهش‌های حذف و اضافه در محدوده ۴۰-۱۰۰bp ایجاد شده بود. حداکثر تنوع ژنتیکی (Ht)، میانگین تنوع بین جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) به ترتیب ۰/۴۶، ۰/۲۵ و ۰/۴۵ به دست آمد.

*مسئول مکاتبه: shjahangirzadeh@gmail.com

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی ۳۵ نمونه چای نشان داد که هیچ‌گونه ساختار ژنتیکی مدونی مابین مناطق مختلف جمع‌آوری نمونه‌ها وجود ندارد. هم‌چنین این نتایج تأیید نمودند که امکان کاربرد روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) برای بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ژنوتیپ‌های چای و ارقام آن وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم برشی، پرایمر عمومی کلروپلاست، هاپلوتا‌پ، *Camellia*

مقدمه

گیاه چای (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) متعلق به خانواده Theaceace، جنس *Camellia*، بخش *Thea* است و معمولاً شامل دو یا سه وارته گیاه‌شناسی: *C. sinensis* var. *assamica*، *C. sinensis* var. *pubilimba* (۸) و گاهی *C. sinensis* var. *kucha* می‌باشد (۷). بیش‌تر کلون‌های چای دیپلوئید هستند (۳۱). چای نوشیدنی سالمی است که با ویژگی‌های آرامش‌بخشی، تلخی ملایم و طعم گسی شناخته می‌شود (۴). اگرچه ورود گیاه چای به ایران سابقه طولانی ندارد اما به‌دلیل تکثیر بذری این گیاه در اوایل کشت تجاری آن، ژرم‌پلاسم بسیار غنی از این گیاه در کشور ایران ایجاد شده است که شناخت ژنتیکی عمیقی از این مخزن ژنی وجود ندارد. بررسی‌های شناسایی، مدیریت و حفاظت ژنوتیپ‌های چای موجود در ژرم‌پلاسم‌ها جهت دستیابی به اطمینان برای استفاده مناسب از این گیاهان در برنامه‌های اصلاحی امری حیاتی است.

شناسایی ژرم‌پلاسم‌ها توسط نشانگرها از زمان‌های گذشته آغاز شده و امروزه نیز ادامه دارد. روش سنتی برای شناسایی ارقام یا اندازه‌گیری وابستگی در میان گروه گیاهان، بر اساس ارزیابی ویژگی‌های ریخت‌شناسی بوده است که این روش می‌تواند تحت‌تأثیر عوامل محیطی و باغی قرار گیرد (۳۲). در سال‌های اخیر اجرای برنامه‌های کاربردی به‌علت پیشرفت و معرفی تکنیک‌های جدید مولکولی مورد استقبال پژوهشگران قرار گرفته است. این

نشانگرهای مولکولی توانسته‌اند به پژوهشگران در شرح و توصیف واگرایی جمعیت‌ها (۲) و ساختار جمعیت (۱۵) کمک شایانی کنند، به‌طوری‌که استفاده از آن‌ها به سرعت در حال افزایش است. روش‌های متعددی بر مبنای استفاده از PCR مانند RAPD، SSR، ISSR، SRAP و AFLP تا به امروز برای بررسی و شناسایی ژرم‌پلاسم‌های گیاهان استفاده شده است. در گیاهان برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنیک به‌دلیل روش‌های مختلف وراثت و میزان جهش آن‌ها اغلب از نشانگرهای کلروپلاستی و هسته‌ای استفاده می‌شود (۳۴). ژنوم کلروپلاست در بیش‌تر موارد در گیاهان نهاندانه دارای وراثت مادری است (۶) که این ویژگی و حفاظت‌شدگی بسیار بالای این ژنوم آن را برای بررسی و مطالعات فیلوژنی بسیار مستعد می‌سازد. ژنوم اندامک کلروپلاستی به‌طور عمده از چهار منطقه اصلی شامل منطقه تک کپی بزرگ (Large Single Copy)، منطقه تک کپی کوچک (Small Single Copy) و دو منطقه توالی تکراری معکوس (Invert Repeat Region) است (۱۴). با توجه به این‌که میزان حفاظت‌شدگی منطقه تک کپی بزرگ کم‌تر از نواحی دیگر ژنوم کلروپلاستی است، می‌توان از آن به‌منظور مطالعه سطوح پایین‌تر تاکسونومی در گیاهان استفاده نمود و بیش‌تر تمایل بر این است که از آغازگرهای طراحی شده بر مبنای این نواحی استفاده شود (۱). هم‌چنین در دسترس بودن پرایمرهای عمومی کلروپلاست که قادر به تکثیر مناطق خاصی از ژنوم کلروپلاست با استفاده از واکنش

آنالیز هضم قطعات تکثیر شده در واکنش PCR توسط نشانگرهای عمومی DNA کلروپلاست به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی گونه‌ها (۲۹ و ۳۴)، مطالعه تنوع ژنتیکی و فیلوژنی در بین گیاهان (۱، ۱۸، ۲۰ و ۲۲)، شناسایی دورگ‌های سوماتیکی (۲۵)، مطالعات ساختار جمعیتی (۳۵)، شناسایی زادگاه مادری (۵) و شناسایی اجداد هیبریدهای طبیعی (۱۳) استفاده شده است.

این پژوهش با دو هدف (۱) ارزیابی سودمندی کاربرد روش PCR-RFLP برای محصولات تکثیر شده ژنوم کلروپلاست و (۲) بررسی میزان تنوع این ژنوم در گیاه چای صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به‌منظور انجام این پژوهش، ۳۵ نمونه برگ چای از کلکسیون‌های پژوهشکده چای (واقع در نشتارود، لاهیجان، سیاهکل و فشالم) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل هشت ژنوتیپ از جمعیت منطقه شرق چایکاری (نشتارود)، هشت ژنوتیپ از جمعیت منطقه مرکز چایکاری (لاهیجان)، هشت ژنوتیپ از جمعیت منطقه غرب چایکاری (فشالم)، سه ژنوتیپ وارداتی از گرجستان، سه کلون وارداتی از ژاپن و پنج کلون وارداتی از سریلانکا بود (جدول ۱). برگ‌های جوان کامل شده به‌عنوان نمونه جمع‌آوری شدند و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) هستند (۳، ۱۴، ۱۶ و ۳۳). امکان کشف تنوع DNA اندامکی را برای اهداف تاکسونومی و فیلوژنتیک فراهم نموده است. به‌دلیل وراثت تک‌والدی اندامک کلروپلاست و میزان کم جهش رخ داده در این ژنوم نسبت به ژنوم هسته، این مولکول DNA به‌عنوان یک منبع ایده‌آل اطلاعات ژنتیکی در مطالعات فیلوژنتیک و ژنتیک جمعیت شناخته می‌شود (۹). با توجه به حفاظت‌شدگی بالای ژنوم کلروپلاست امکان استفاده از پرایمرهای عمومی معرفی شده برای تکثیر نواحی این ژنوم در گیاهان متفاوت وجود دارد (۱، ۵، ۹، ۱۳، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۲۹، ۳۴، ۳۵) که برای مشخص شدن تنوع موجود در بین این قطعات تکثیر شده یکی از راه‌های کم هزینه استفاده از آنزیم‌های برشی جهت هضم این قطعات تکثیر شده و مشخص نمودن تفاوت‌های موجود در آن‌ها می‌باشد که از این طریق تنوع نقطه به نقطه این قطعات مشخص می‌گردد. از مزایای این روش نیز می‌توان به صرفه‌جویی در زمان و هزینه، عدم نیاز به اطلاع از توالی خاص برای پرایمرها (امکان استفاده از پرایمرهای عمومی کلروپلاست)، تکرارپذیری بالا اشاره نمود. این روش با شکستن جامعه‌های بزرگ به جمعیت‌های کوچک و مهیا کردن شرایط برای بررسی نمونه‌ها توسط نشانگرهای دقیق‌تر مانند ریزماهواره‌ها در حجم کاری کم‌تر بسیار مناسب می‌باشد، به‌طوری‌که فقط کافی است که نمونه‌های داخل یک گروه با یکدیگر مقایسه و بررسی شوند (۱۹). این روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم^۱ PCR-RFLP، هم‌چنین به‌عنوان تفاوت توالی قطعات تکثیر شده شکسته (CAPS)^۲ شناخته می‌شود (۲۱). از روش مقایسه توالی‌ها یا

1- Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
2- Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS)

جدول ۱- نمونه‌های چای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Tea samples used in study.

نام علمی	زادگاه	کد پژوهشکده چای	کد	نام علمی	زادگاه	کد پژوهشکده چای	کد
Scientific name	Origin	TRC No.	code	Scientific name	Origin	TRC No.	code
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	KEN	G19	<i>C. sinensis</i>	گرجستان Georgia	۱۰۱ برگ درشت 101 larg leaf	G1
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	280	G20	<i>C. sinensis</i>	گرجستان Georgia	۱۰۱ برگ ریز 101 smal leaf	G2
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	269	G21	<i>C. sinensis</i>	گرجستان Georgia	a۱۰۲ 102a	G3
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	276	G22	<i>C. sinensis</i>	ژاپن Japan	اویس OWASE	G4
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	449	G23	<i>C. sinensis</i>	ژاپن Japan	سایاما کائوری SAYAMA KAORI	G5
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	261	G24	<i>C. sinensis</i>	ژاپن Japan	یابوکیتا YABOKITA	G6
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	285	G25	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	468	G7
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	399	G26	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	440	G8
<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	277	G27	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	444	G9
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	121	G28	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	100	G10
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	114	G29	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	455	G11
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	37	G30	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	548	G12
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	183	G31	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	591	G13
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	58	G32	<i>C. sinensis</i>	لاهیجان Lahijan	703	G14
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	34	G33	<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	DN	G15
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	160	G34	<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	3015	G16
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	262	G35	<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	DG39	G17
				<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	3020	G18

از بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۱۰ برابر غلظت) بدون کلرید منیزیم، ۱۰ نانوگرم از هر آغازگر (رفت و برگشت) و ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. پس از تهیه حجم‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نمونه‌ها در شرایط یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای مناسب برای هر آغازگر (جدول ۲) به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت لازم بسته به طول قطعه تکثیری (جدول ۲) قرار گرفت و در نهایت یک چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از روش دلاپورتا و همکاران (۱۰) با اندکی تغییر استفاده گردید. جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش اسپکتوفتومتر و دستگاه نانودراپ استفاده شد و برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد و ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد.

واکنش PCR: دی.ان.ا استخراج شده توسط هفت جفت آغازگر عمومی کلروپلاست (DT, LF, HK, SC, B1B2, rbcL و SfM) (۱۴ و ۲۱) با شرایط زیر تکثیر گردید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای نمونه‌ها در حجم ۳۰ میکرولیتر از ترکیب دو میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار از هر میلی‌مولار تک DNA پلی‌مرز dNTP، یک واحد آنزیم تک (recombinant, Fermentas, Canada)، سه میکرولیتر

جدول ۲- آغازگرهای عمومی کلروپلاست، توالی آنها، شرایط واکنش PCR، اندازه قطعات و کیفیت تکثیر.

Table 2. Chloroplast universal primers, their sequence, PCR conditions, size of amplified fragment and quality of amplification.

قدرت تکثیر Degree of amplification**	اندازه تکثیر شده در تنباکو Amplified fragment size in tobacco (bp)	شرایط PCR PCR conditions		توالی* Sequence*	مخفف پرایمر کلروپلاست Abbrev. of cpDNA primers
		زمان بسط Extension time (min.)	دمای اتصال Annealing temperature (°C)		
+	1213	2	54.5	F: ACCAATTGAACTACAATCCC R: CTACCACTGAGTAAAAGGG	DT
+	1050	2	56	F: CGAAATCGGTAGACGCTACG R: ATTTGAACTGGTGACACGAG	LF
+	1831	3	61	F: ACGGGAATTGAACCCGCGCA R: CCGACTAGTTCGGGTTCTGA	HK
+	1611	2:30	56	F: GGTTCGAATCCCTCTCTCTC R: GGTTCGTGACCAAGAAACCAC	CS
+	1431	2:30	55	F: TGTCACCAAAAACAGAGACT R: TTCCATACTTACAAGCAGC	rbcL
na	1512	2:30	53	F: TGCCTTGGTATCGTGTTCATAC R: CYTGTCTTYTTGTAGTTGGAT	B1B2
na	1254	2	62	F: GAGAGAGAGGGATTCAACC R: CATAACCTTGAGGTCACGGG	SfM

* F: آغازگر رفت و R: آغازگر برگشت

** +: تکثیر مناسب و na: تکثیر نامناسب

به‌کار برده شده توسط خیایوی و همکاران (۲۰) عمل شد.

نتایج و بحث

قدرت تکثیر هفت جفت آغازگر عمومی کلروپلاست (DT, LF, HK, B1B2, SC, rbcL و Sfm) بر روی پنج نمونه گیاه چای که در این مطالعه وجود نداشتند، مورد بررسی قرار گرفت تا بهترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنوم کلروپلاست گیاه چای مورد استفاده قرار گیرند. از این هفت جفت آغازگر آزمون شده پنج جفت آغازگر DT, LF, HK, SC و rbcL برای بررسی دارای تکثیر مطلوب بودند. دو جفت آغازگر دیگر (Sfm و B1B2) به دلیل تولید چند بانندی یا عدم ایجاد باند ویژگی‌های لازم برای انجام این پژوهش را نداشته و حذف شدند. اندازه تخمینی قطعات تکثیرشده با جفت آغازگرهای DT, LF, HK, SC و rbcL به ترتیب ۱۱۶۰، ۱۰۳۰، ۱۸۸۰، ۱۳۴۰، ۱۵۷۰ جفت باز بود که مجموع این قطعات تکثیرشده ۶۹۸۰bp از کل ژنوم کلروپلاست را شامل می‌شدند. اندازه‌های تخمین زده شده با اندازه‌های گزارش شده توسط منابع دیگر در گیاهان متفاوت (۱، ۱۴، ۲۰، ۲۷) تفاوت جزئی نشان می‌دهد که این موضوع حفاظت‌شدگی بالای ژنوم کلروپلاست را تأیید می‌کند. نتایج مشابهی در مورد پرایمرها در بررسی DNA کلروپلاست از نظر اندازه و قدرت تکثیر آغازگرها مشاهده گردیده. به‌عنوان مثال، در گیاه درمنه عدم مفید بودن آغازگر B1B2 را گزارش نمودند (۱)، در حالی‌که در گیاه سیب این آغازگر توانسته است قطعه‌ای با طول ۱۷۴۰bp را تکثیر نماید و در بررسی PCR-RFLP مورد استفاده قرار گیرد (۱۹). دلیل رخ دادن این حالت در گیاهان متفاوت می‌تواند به رخداد جهش‌های محدود حذف/اضافه در محل‌های اتصال آغازگر در گیاهان متفاوت

هضم و برش توسط آنزیم برشی: هضم و برش قطعات تکثیرشده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط چهار آنزیم برشی محدودگر AluI, HinfI, BglIII و PstI بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده (Fermentas, Canada) صورت گرفت. ترکیب مواد در واکنش هضم شامل ۲μl آنزیم برشی، ۲μl بافر هضم (نوع بافر برای هر آنزیم بر اساس دستورالعمل شرکت متفاوت می‌باشد)، محصول PCR ۱۰μl و ۱۸μl آب دیونیزه بود. دمای هر آنزیم برشی بر اساس دستورالعمل شرکت تنظیم شد و به مدت ۸ ساعت محصول PCR تحت این شرایط مورد برش قرار گرفت.

الکتروفورز و تجزیه داده‌ها: محصول PCR هر آغازگر قبل از هضم جهت بررسی تنوع موجود یا یک‌نواختی قطعات به نسبت حجم ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR، سه میکرولیتر بافر بارگذاری و دو میکرولیتر ماده ژل رد (سیناژن، ایران) در ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۲ ساعت و نیم در ۷۰ ولت الکتروفورز شدند و سایز مارکر ۱kb برای تخمین اندازه قطعات استفاده گردید. بعد از پایان مدت زمان برش و هضم، محصول واکنش هضم با ترکیب ۱۰ میکرولیتر از محلول واکنش هضم، سه میکرولیتر بافر بارگذاری و دو میکرولیتر ماده ژل رد برای بررسی قطعات برش خورده روی ژل آگارز ۳ درصد به مدت چهار ساعت در ۷۰ ولت الکتروفورز شدند و عکس برداری زیر نور ماوراءبنفش صورت پذیرفت. از دو سایز مارکر ۱kb و ۵۰bp برای تخمین طول قطعات حاصل از هضم استفاده گردید.

برای تجزیه آماری نتایج به‌دست آمده از نرم‌افزارهای POPGENE version 1.31 و NTSYSpc version 2.0 استفاده شد و دندروگرام توسط روش UPGMA و ضریب Dice رسم گردید. برای مشخص نمودن هاپلوتایپ‌ها بر اساس روش

و اضافه در محدوده ۵۰bp-۲۰ بیان شده است. با توجه به آن‌که در مطالعه حاضر نیز تفاوت اندازه قطعات مشاهده شده که حالت چندشکلی را نشان می‌دادند در این محدوده بود می‌توان بیان کرد که دلیل مشاهده حالات چندشکلی در بررسی ژنوم کلروپلاست گیاه چای نیز رخ دادن جهش‌های محدود و کوتاه ۵۰bp-۲۰ حذف و اضافه است. در مطالعه‌ای که با هدف بررسی کاربرد روش PCR-RFLP برای بررسی ژنوم کلروپلاست گیاه چای صورت گرفته است (۹) آغازگرهای مشابهی با آغازگرهای بررسی حاضر مورد استفاده قرار گرفت، که نتایج به‌دست آمده در بررسی حاضر از نظر قدرت تکثیر آغازگرها مشابه نتایج مطالعه آن‌ها می‌باشد که این موضوع نشان از حفاظت‌شدگی بالای ژنوم کلروپلاست به‌خصوص در نواحی که از روی آن‌ها آغازگر طراحی شده است دارد زیرا این آغازگرها جهت تکثیر نواحی بین ژنی طراحی شده‌اند که تنوع بیشتری را نسبت به نواحی ژنی نشان می‌دهند، در بخش مقایسه قطعات هضم شده نیز برخی ترکیبات آغازگر- آنزیم برشی مابین مطالعه (۹) با پژوهش پیش‌رو مشابه‌اند، اما تفاوت‌هایی در نتایج به‌دست آمده دیده می‌شود، بر اساس نتایج گزارش شده توسط (۹) در اکثر ترکیبات آغازگر- آنزیم برشی تعداد قطعات چندشکلی به‌دست آمده بیشتر است که دلیل این امر تنوع بالاتر گیاهان به‌کار برده شده توسط آن‌ها می‌باشد. زیرا آن‌ها تنوع را در سطح رقم بررسی نموده‌اند و کشور چین به‌عنوان یکی از غنی‌ترین مخازن ژنتیکی گیاه چای در جهان و زادگاه آن مطرح می‌باشد اما بررسی حاضر تنوع کلروپلاستی در سطح ژنوتیپ مورد بررسی قرار گرفته است و از آنجایی‌که منشا تمام ژرم‌پلاسما چای‌های تحت کشت در ایران محدود به واردات آن می‌باشد، این موضوع که تعداد قطعات چندشکل کم‌تری نسبت به مطالعه چن و همکاران (۹) به‌دست آید که کاملاً

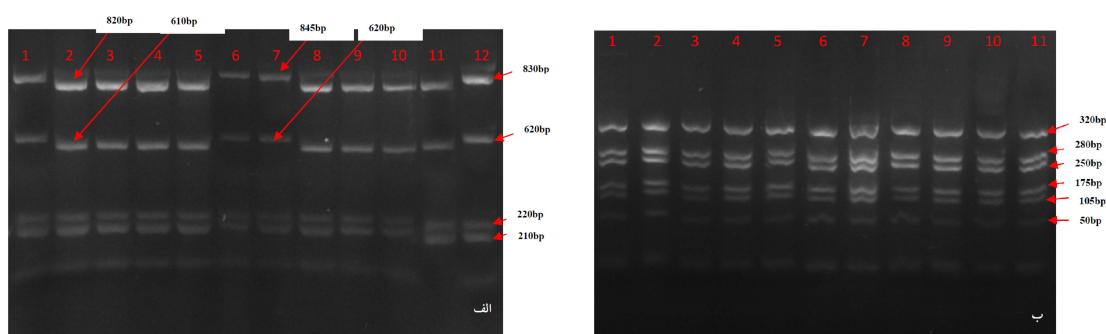
بازگردد. در بررسی تنوع کلروپلاستی گیاه چای با استفاده از روش CAPs در رابطه با آغازگرهای LF، DT و Sfm نتایج مشابهی را از نظر اندازه قطعات تکثیرشده و قدرت تکثیر آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گزارش شده است (۱۸) که با توجه به این موضوع می‌توان به درستی قطعات تکثیرشده با اطمینان نگریست. با توجه به نتایج به‌دست آمده پنج پرایمیری که قدرت تکثیر مناسب داشتند برای هضم با آنزیم برشی و بررسی انتخاب گردیدند. هیچ حالت چندشکلی در محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل با استفاده از هر یک از جفت آغازگرهای مورد آزمایش مشاهده نشد.

با توجه به اندازه قطعات تکثیر شده در این مطالعه ۶۹۸۰bp از ژنوم کلروپلاست تکثیرشده که در مقایسه با توالی کلی ژنوم کلروپلاست ارائه شده برای جنس *Camellia* که در محدوده ۱۵۷۱۶۶bp-۱۵۶۶۰۷ گزارش شده است (۲۳) حدود ۴/۴۴ درصد کل ژنوم گیاه چای مورد بررسی قرار گرفته است. از ترکیب پنج قطعه تکثیرشده توسط آغازگرها و چهار آنزیم برشی (PstI و AluI، HinfI، BglII) از ۲۰ حالت هضم ممکن چهار ترکیب DT/AluI، DT/HinfI، HK/HinfI، LF/PstI حالت چندشکلی نشان دادند. ترکیب HK-HinfI با دارا بودن چهار جایگاه برش و تولید پنج قطعه در دو جایگاه تولید حالت چندشکلی نمود که جایگاه اول سه حالت چند شکلی و جایگاه دوم دو حالت چند شکلی را نشان دادند. سه ترکیبات دیگر (DT/AluI، DT/HinfI و LF/PstI) تنها در یک جایگاه تولید چندشکلی نمودند. سایر ترکیبات ممکن نیز تولید حالت چندشکلی نکردند. در مطالعات کلروپلاست گیاه سیب (۲۰) و گیاه گیلان (۳۴، ۲۷) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) دلیل مشاهده حالات چندشکلی رخدادن جهش‌های حذف

دارای منشأ شرق آسیا و بر اساس منابع ثبت نشده کشور چین هستند، هیچ نمونه‌ای در کنار ژنوتیپ‌های وارداتی از گرجستان قرار نگرفته است. البته این موضوع دلیل بر عدم تشابه بین نمونه‌های مورد بررسی و آن ژنوتیپ‌ها نمی‌باشد. زیرا دامنه مطالعه حاضر برای بیان این مطلب محدود است و برای بیان جملاتی با این شدت نیاز به بررسی ژنوم هسته در کنار ژنوم کلروپلاست می‌باشد، از سوی دیگر تفاوت ایجاد شده تنها به تعداد محدودی جهش حذف و اضافه باز می‌گردد.

قابل قبول است و باید تنوع کم‌تری را مشاهده نمود. قطعه تکثیرشده توسط آغازگر HK و قطعات حاصل از هضم ترکیبات HK/HinfI و SC/AluI در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

بر اساس این حالت‌های چند شکلی نمونه‌های مورد بررسی در هفت حالت هاپلوتایپی متفاوت قرار گرفتند. جدول ۳ هاپلوتایپ‌های شناسایی شده و نحوه قرارگیری نمونه‌های مورد بررسی در آن‌ها را نشان می‌دهد. همان‌طور که از جدول ۳ به دست می‌آید از آنجایی که نمونه‌های تحت کشت در ایران



شکل ۱- الگوی برش دو ترکیب پرایمر- آنزیم برشی HK/HinfI (الف) و SC/AluI (ب) که در ژل آگارز مشخص شده‌اند. چاهک‌ها بر اساس شماره به ترتیب نمونه‌های G11, G1, G2, G3, G5, G32, G33, G6, G22, G24, G3 و G14 می‌باشند.

Fig. 1. The cutting pattern of two Primer-Restriction enzyme combinations HK/HinfI (a) and SC/AluI (b) were shown in agarose gel. Wells (based on the number) are G11, G1, G2, G3, G5, G32, G33, G6, G22, G24, G3 and G14 respectively.

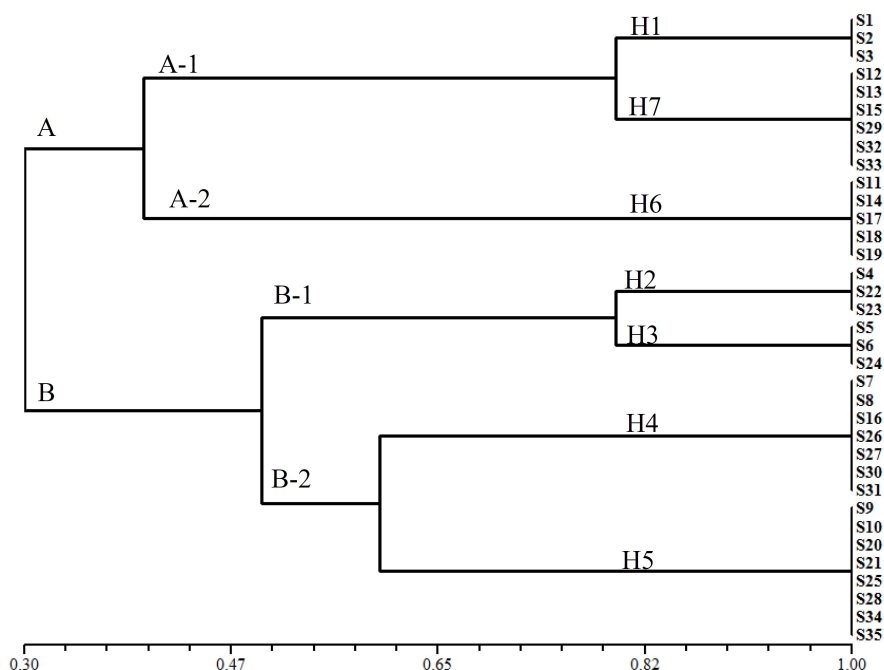
جدول ۳- هاپلوتایپ‌های شناسایی شده و نحوه قرارگیری نمونه‌های مورد بررسی در آن‌ها.

Table 3. Identified haplotypes and including samples.

هاپلوتایپ haplotypes	کد نمونه‌ها Samples cod
H1	S1, S2 & S3
H2	S4, S22 & S23
H3	S5, S6 & S24
H4	S7, S8, S16, S26, S27, S30 & S31
H5	S9, S10, S20, S21, S25, S28, S34 & S35
H6	S11, S14, S17, S18 & S19
H7	S12, S13, S15, S29, S32 & S33

در دندروگرام به‌دست آمده از داده‌های حاصل از PCR-RFLP (شکل ۲) مشخص است که کل نمونه‌ها از حد تشابه ۳۰ به دو گروه اصلی (A و B) تقسیم شدند که گروه اصلی A شامل سه هاپلوتایپ H1، H6 و H7 بود. خود این زیرگروه مجدداً در حد تشابه ۴۰ تقسیم شد (A-1 و A-2) که در این‌جا مشاهده گردید که گروه اول (A-1) هاپلوتایپ H1 که تنها نمونه‌های گرجستان را در برداشت در کنار هاپلوتایپ H7 که تنها نمونه‌های ایرانی را در بر داشت، قرار گرفت که این موضوع در تضاد با نتیجه جدا شدن کامل نمونه‌های گرجستان از نمونه‌های ایران می‌باشد و نشان از رابطه ژنتیکی مابین این نمونه‌ها می‌باشد. زیرا تنها تفاوت مابین این دو هاپلوتایپ رخ دادن یک جهش حذف و اضافه در قطعه اول حاصل از ترکیب آغازگر- آنزیم برشی HK/HinfI می‌باشد.

سه هاپلوتایپ شناسایی شده اول (H1، H2 و H3) هر کدام با پوشش سه نمونه کوچک‌ترین هاپلوتایپ‌های شناسایی شده بودند و نکته مهم در این سه هاپلوتایپ به‌دست آمده جدا شدن نمونه‌های کشورهای گرجستان و ژاپن از نمونه‌های کشور سریلانکا و ایران می‌باشد. هر چند در هاپلوتایپ‌های H2 و H3 به ترتیب دو و یک نمونه از ژنوتیپ‌های ایران قرار دارد که این موضوع می‌تواند به رابطه ژنتیکی گیاهان چای تحت کشت در کشور ژاپن با مخزن ژنتیکی چای کشورهای چایخیز مانند چین و سریلانکا باز گردد که منشا گیاهان چای ایران نیز ایز این منابع می‌باشد. چهار هاپلوتایپ دیگر دارای تعداد عضو مشابه بودند. از پنج کلون وارداتی از کشور سریلانکا تعداد سه کلون در هاپلوتایپ H6 در کنار دو ژنوتیپ ایرانی قرار گرفتند در دو هاپلوتایپ H5 و H7 تنها یک کلون سریلانکایی قرار گرفت و در هاپلوتایپ H4 هیچ نمونه‌ای از کلون‌های سریلانکایی مشاهده نشد.



شکل ۲- دندروگرام به‌دست آمده برای برخی ژنوتیپ‌های چای ایران و چند کلون وارداتی توسط آنالیز UPGMA با کاربرد ضریب Dice. (شماره‌ها بر اساس جدول ۱ می‌باشد).

Fig. 2. Dendrogram obtained for some Iranian tea genotypes and some imported clone using UPGMA analysis with Dice coefficient.

تمام هاپلوتایپ‌ها در سطح تشابه ۸۰٪ از یکدیگر جدا شده و به صورت تکی قرار گرفتند.

یکی از کاربردهای شناسایی هاپلوتایپ‌ها امکان فراهم کردن شرایط شناسایی برخی ارقام، ژنوتیپ‌ها و حتی جمعیت‌ها می‌باشد، به طوری که موهانتی و همکاران (۲۷) و تورکیچ و همکاران (۳۴) نیز نتایج مشابهی را برای شناسایی برخی نمونه‌های مورد بررسی خود گزارش نموده‌اند که در این بررسی با توجه به اینکه سه نمونه وارداتی از گرجستان و سه کلون وارداتی از ژاپن حالت هاپلوتایپی منحصر به فردی نشان دادند، می‌توان از آن برای شناسایی آن‌ها استفاده نمود.

شاخص‌های میانگین تعداد نوار مشاهده شده (na) کل، میانگین تعداد نوار مؤثر (ne)، میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) کل، میزان شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I)، حداکثر تنوع ژنتیکی (Ht)، میانگین تنوع بین‌جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و زیرجمعیت‌ها محاسبه گردید (جدول‌های ۴ و ۵).

گروه اصلی دیگر (B) که شامل هاپلوتایپ‌های H2، H3، H4 و H5 بود، بر خلاف گروه اول اصلی (A) در سطح تشابه ۵۶٪ از یکدیگر جدا شده و در دو گروه (B-1 و B-2) قرار گرفتند. گروه‌های فرعی B-1 شامل هاپلوتایپ‌های H2 و H3 و گروه فرعی B-2 شامل هاپلوتایپ‌های H4 و H5 بود. نکته مهم در این گروه (گروه B) جدا شدن نمونه‌های ژاپنی که در هاپلوتایپ‌های H2 و H3 قرار داشتند، از سایر نمونه‌های ایرانی بود. در این گروه تنها یک نمونه سریلانکایی قرار داشت که این مورد می‌تواند نشان از فاصله والد مادری مابین نمونه‌های ایرانی که بر اساس منابع منتشر نشده عموماً از منشا چینی ذکر شده‌اند، باشد. البته این موضوع با توجه به هاپلوتایپ هاپلوتایپ H6 نیز قابل قبول است، زیرا تنها دو نمونه چای ایرانی در کنار سه کلون وارداتی از سریلانکا قرار گرفته‌اند. در این‌جا لازم است اشاره گردد جهت بیان مواردی با این دقت نیاز به بررسی‌های بسیار روی منابع ژنتیکی بسیار گسترده‌تر و با استفاده از دو دسته نشانگر هسته‌ای و اندامکی می‌باشد. به طور کلی

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.

Table 4. Sample size, observed number of alleles, effective number of alleles, Nei's gene diversity and Shannon's information index in each population and all samples.

شاخص تنوع ژنتیکی شانون Shannon's Information index (I)	شاخص تنوع ژنتیکی نی Nei's gene diversity (h)	تعداد نوار مؤثر Effective number of alleles (ne)	تعداد نوار مشاهده شده Observed number of alleles (na)	اندازه نمونه Sample size	جمعیت population
0.41	0.28	1.48	1.73	8	فشالم Fashalam
0.61	0.43	1.83	1.90	8	لاهیجان Lahijan
0.48	0.34	1.64	1.73	8	نشتارود Nashtarood
0.00	0.00	1.00	1.00	3	گرجستان Georgia
0.55	0.38	1.67	1.90	5	سریلانکا Sri Lanka
0.11	0.08	1.14	1.18	3	ژاپن Japan
0.64	0.45	1.86	2.00	35	کل Total

جدول ۵- شاخص‌های تنوع کل جمعیت، تنوع درون زیرجمعیت‌ها، تنوع بین زیرجمعیت‌ها.

Table 5. Total genetic diversity (Ht), the genetic differentiation within population (Hs) and the genetic differentiation among population (Gst).

تنوع بین زیرجمعیت‌ها The genetic differentiation among population (Gst)	تنوع درون زیرجمعیت‌ها The genetic differentiation within population (Hs)	تنوع کل Total genetic diversity (hT)	اندازه نمونه Sample Size	
0.45	0.25	0.46	35	میانگین Mean.
-	0.00	0.00	-	خطا استاندارد St. Dev

تنوع ژنتیکی درون جمعیت (Gst) حساب شده بیش‌تر می‌باشد و حتی نسبت به برخی گونه‌های جنگلی مانند *Querus petraea* ($Gst = 0/90$) و ($Gst = 0/83$) *Fagus sylvatica* (۱۱) و ($Gst = 0/60$) *Argania spinosa* (۲۷) بسیار کم‌تر می‌باشد. با توجه با آن‌که در تمام گونه‌های ذکر شده Gst محاسبه شده توسط ژنوم کلروپلاست بسیار پایین‌تر از Gst محاسبه شده توسط استفاده از ژنوم هسته (تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها با کاربرد مارکرهای هسته‌ای) می‌باشد (۳۰) می‌توان بیان نمود که توارث هسته‌ای در مقایسه با توارث سیتوپلاسمی با سازماندهی کم‌تری روی می‌دهد زیرا جریان ژن‌های سیتوپلاسمی برخلاف ژن‌های هسته‌ای توسط عامل پخش شدگی بذرها محدود می‌گردد.

از دلایل کمبود مقایسه با سایر مطالعات مشابه می‌توان به عدم بررسی تنوع ژنتیکی کلروپلاست گیاه چای، تعداد کم نمونه‌های مشترک در معدود مطالعات انجام شده، پرایمرهای متنوع برای تکثیر نواحی متفاوت ژنوم کلروپلاست و تعدد آنزیم‌های برشی که باعث ایجاد ترکیبات زیاد پرایمر- آنزیم برشی می‌شوند، اشاره کرد که این مسأله در این بررسی نیز مشاهده گردید.

در مطالعات دیگر روی کلروپلاست با کاربرد روش PCR-RFLP حداکثر تنوع ژنتیکی (Ht)، میانگین تنوع بین جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) محاسبه شده توسط جهانگیرزاده خیای و همکاران (۱۷) در جنس *Malus* ($Ht=0/467$ ، $Hs=0/445$ و $Gst = 0/048$)، خیای و همکاران (۲۰) میزان گزارش شده است ($Ht=0/444$ ، $Hs=0/382$ و $Gst = 0/1409$) و موهانتی و همکاران (۲۷) در جمعیت‌های وحشی و برخی ارقام *Prunus avium* ($Ht=0/40$ ، $Hs=0/37$ و $Gst = 0/08$) بود. با مقایسه میزان حداکثر تنوع ژنتیکی (Ht)، میانگین تنوع بین جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) محاسبه شده در پژوهش حاضر ($Ht=0/46$ ، $Hs=0/25$ و $Gst = 0/45$) با میزان محاسبه شده در پژوهش‌های ذکر شده مشخص می‌گردد نتایج به‌دست آمده برای این ژنوم به‌شدت حفاظت شده قابل‌قبول بوده و این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی اندامک کلروپلاست در گیاه چای قابل استفاده است. با توجه به Gst به‌دست آمده و مقایسه آن با باقی‌Gst‌های محاسبه شده در جنس‌های *Malus* ($Gst = 0/04$) (۱۷)، *Malus* ($Gst = 0/14$) (۲۰)، *Prunus avium* ($Gst = 0/08$) (۲۷) و *Prunus spinosa* ($Gst = 0/19$) (۲۶) مشخص می‌گردد که

وجود ندارد؛ هم‌چنین این نتایج تأیید نمود که امکان کاربرد روش PCR-RFLP ژنوم کلروپلاست برای بررسی تنوع مابین ژنوتیپ‌های چای و ارقام آن وجود دارد. البته جهت دستیابی به نتایج دقیق نیاز به کاربرد تعداد بیش‌تر نشانگرها و آنزیم‌های بررسی ماست. با استفاده از این روش، تنوع ژنتیکی در DNA اندامکی بین ژنوتیپ‌های چای مشاهده شد اما این تنوع به‌گونه‌ای نبود که قادر باشد ژنوتیپ‌های مناطق مختلف را از هم تفکیک نماید. به‌نظر می‌رسد شاید با افزایش تعداد آغازگرها و آنزیم‌های بررسی، بتوان به این تفکیک دست‌یافت. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌های چای کشت شده در ایران به‌دلیل آن‌که اکثراً درگذشته به‌صورت جنسی تکثیر شده‌اند، دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشند. به‌طورکلی جهت انجام کارهایی مشابه بررسی پیش‌رو مناسب است از روش‌های تکرارپذیر و با دقت بالا مانند روش استفاده شده یا ¹cpSSR استفاده گردد تا نتایج در کارهای اصلاحی دورگه‌گیری به‌صورت دقیق‌تر در انتخاب والدین به‌کار برده گردد.

به‌طورکلی شناسایی هاپلوتایپ‌ها با تعریف مسیرهای تکاملی و توزیع جغرافیایی و هم‌چنین تقسیم بندی جمعیت‌های بزرگ به گروه‌های کوچک‌تر باعث راحت‌تر شدن کارهای مطالعاتی و بررسی‌های ژنتیکی با نشانگرهای زمان‌بر مانند ریزماهواره‌ها (SSR) و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) می‌گردد. البته امروزه با پیشرفت علوم مولکولی به‌ویژه توالی‌یابی سریع قطعات مطالعات فیلوژنتیکی و مولکولی به‌سمت استفاده از این روش تغییر مسیر داده است. هر چند به‌علت مشکلاتی که در انجام توالی‌یابی وجود دارد (هزینه بالا و زمان‌بر بودن) توصیه می‌شود از هر دو روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم PCR-RFLP و توالی‌یابی به‌صورت ترکیبی استفاده گردد، به این صورت که در حالتی که نتایج مقداری پیچیدگی نشان می‌دهند از توالی‌یابی استفاده گردد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که هیچ‌گونه ساختار ژنتیکی مدونی مابین نمونه‌های مناطق مورد بررسی

منابع

- Ahadi Dolatsara, E., Salami, S.A.R., Shokrpour, M., Naghavi, M.R. and Soorni, A. 2015. Evaluation of chloroplast DNA diversity and phylogenetic relationship among 28 Iranian Artemisia species. Iran. J. Hort. Sci. 45: 4. 401-415. (In Persian)
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and HALL: An International Thomson Publishing Company.
- Badenes, M.L. and Parfitt, D.E. 1995. Phylogenetic relationships of cultivated Prunus species from an analysis of chloroplast DNA variation. Theor. Appl. Gen. 90: 7-8. 1035-1041.
- 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). Mol. Breed. 32: 3. 735-741.
- Bouhadida, M., Martín, J.P., Eremin, G., Pinochet, J., Moreno, M.Á. and Gogorcena, Y. 2007. Chloroplast DNA diversity in Prunus and its implication on genetic relationships. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132: 5. 670-679.
- Brettin, T.S., Karle, R., Crowe, E.L. and Lezzoni, A.F. 2000. Brief communication. Chloroplast inheritance and DNA variation in sweet, sour and ground cherry. J. Hered. 91: 1. 75-79.

7. Chang, H.T. 1984. A revision of the tea resource plants. *Acta Scientia Natural Univer Sunyats*, 1: 1-12.
8. Chen, L., Yu, F. and Tong, Q. 2000. Discussions on phylogenetic classification and evolution of Sect. *Thea*. *J. Tea Sci.* 20: 2. 89-94.
9. Chen, S.X., Qi, G.N., Li, H., Shan, H.L. and Zou, Y. 2012. Rapid establishment of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) system for chloroplast DNA in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Afric. J. Biotech.* 11: 33. 8181-8188.
10. Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Repor.* 1: 4. 19-21.
11. Demesure, B., Comps, B. and Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution.* 50: 6. 2515-2520.
12. Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M.H. and Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* 6: 4. 393-397.
13. Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadi, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'bakraee' (*citrus* sp.) and some known citrus genotypes through *ssr* and *pcr-rflp* markers. *Sci. Hort.* 148: 147-153.
14. Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G.G. and Petit, R.J. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Mol. Ecol. Not.* 1: 4. 345-349.
15. Hamza, N.B. 2005. Population genetic analysis of European and African willows (*Salix* spp.) using nuclear microsatellite and chloroplast markers (Doctoral dissertation, University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria).
16. Heinze, B. 2001. A data base for PCR primers in the chloroplast genome [DB]. Version 1.0 (November 2002-356 primer sequences), from <http://bfw.ac.at/200/1859.html>.
17. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Ashourpour, M. and Keshavarzi, Sh. 2018a. Studying of chloroplast diversity in some apple genotypes from North-West of Iran in comparison of some Alborz genotypes, commercial cultivars and rootstocks. *J. Plant Prod. Res.* 25: 2. 1-15. (In Persian)
18. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Falakro, K., Azadi Gonbad, R. and Mehdi Roodi, M. 2018b. Haplotype identification of some tea genotype of central tea cultivation region using CAPs method. In *Proceedings of 1th National Congress of Horticulture and Crop Production*, 25 Jan., Gonbad-e Kavus University, Gonbad-e Kavus, Iran. (In Persian)
19. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Zamani, Z., Mardi, M., Moghdam, M.F. and Ashourpour, M. 2018. Comparison of chloroplast DNA diversity in some Iranian apple genotypes, commercial cultivars and rootstocks. *Plant Gen. Res.* 5: 1. 77-86. (In Farsi)
20. Khiavi, S.J., Zamani, Z., Mardi, M. and Moghdam, M.F. 2013. Evaluation of chloroplast relationship between some apple genotype from Azerbaijan of Iran and their comparison with other local genotypes, cultivars and rootstocks. *Afric. J. Agric. Res.* 8: 1. 106-112.
21. Konieczny, A. and Ausubel, F.M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 2. 403-410.
22. Kucuk, O., Gulbýttý-Onarýcý, S. and Sumer, S. 2006. RFLP of analyses of an intergenic spacer region of chloroplast DNA in some wild wheat species. *Afric. J. Biotech.* 5: 22.
23. Li, W., Zhang, C., Guo, X., Liu, Q. and Wang, K. 2019. Complete chloroplast genome of *Camellia japonica* genome structures, comparative and phylogenetic analysis. *PloS one*, 14: 5. e0216645.
24. Lin, C.M., Liu, Z.Q. and Kung, S.D. 1986. *Nicotiana* chloroplast genome: X. Correlation between the DNA sequences and the isoelectric focusing patterns of the LS of Rubisco. *Plant Mol. Biol.* 6: 2. 81-87.

25. Lotfy, S., Luro, F., Carreel, F., Froelicher, Y., Rist, D. and Ollitrault, P. 2003. Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 2. 225-230.
26. Mohanty, A., Martin, J.P. and Aguinalde, I. 2000. Chloroplast DNA diversity within and among populations of the allotetraploid *Prunus spinosa* L. *Theor. Appl. Gen.* 100: 8. 1304-1310.
27. Mohanty, A., Martin, J.P. and Aguinalde, I. 2001. Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theor. Appl. Gen.* 103: 1. 112-117.
28. Mousadik, A.E. and Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol. Ecol.* 5: 4. 547-555.
29. Panda, S., Martín, J.P. and Aguinalde, I. 2003. Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. *Gen. Res. Crop Evol.* 50: 5. 489-495.
30. Petit, R.J., Kremer, A. and Wagner, D.B. 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor. Appl. Gen.* 87: 1-2. 122-128.
31. Roy, S.C. 2006. Karyotype analysis in three cultivated varieties of tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze] for their characterization. *J. Phytol. Res.* 19: 2. 203-207.
32. Struss, D., Boritzki, M., Glozer, K. and Southwick, S.M. 2001. Detection of genetic diversity among populations of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by AFLPs. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76: 3. 362-367.
33. Tsumura, Y., Kawahara, T., Wickneswari, R. and Yoshimura, K. 1996. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor. Appl. Gen.* 93: 1-2. 22-29.
34. Turkec, A., Sayar, M. and Heinze, B. 2006. Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Gen. Res. Crop Evol.* 53: 8. 1635-1641.
35. Widmer, A. and Baltisberger, M. 1999. Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba aizoides* L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure. *Mol. Ecol.* 8: 9. 1405-1415.