Archiv

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Investigation the efficiency of molecular markers to assess genetic diversity of Iranian tea clones

Mojtaba Kordrostami

* Ph. D. Graduate, Young Researchers and Elite Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak. Tel: +989177015872, E-mail: kordrostami009@gmail.com

Mehdi Rahimi

Assistant Professor, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: me.rahimi@kgut.ac.ir

Sanam Safaei Chaeikar

Assistant Professor, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran. E-mail: sanamsafaei@yahoo.com

Ali Seraji

Assistant Professor, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran. E-mail: seraji1167@gmail.com

Reza Azadi

Assistant Professor, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran. E-mail: r.azadi@areeo.ac.ir

Abstract

Objective

The genetic diversity of the 20 tea populations collected from the Tea Research Organization of Iran was evaluated using 20 microsatellite markers and 10 RAPD markers.

Materials and methods

Plant materials in this experiment were 20 tea clones selected from the Tea Research Institute of the Iran. DNA extraction from young leaf samples of tea populations was performed with a few changes using the CTAB method. In this study, 20 microsatellite

www.SID.ir

markers and 10 RAPD markers were used to study the genetic variation of tea populations.

Results

The results showed that SSR and RAPD markers produced 105 and 160 polymorphic bands, respectively. Among the microsatellite markers, the MSE0143 and the MSG0681 primers with 9 bands and the MSG0610 primer with 2 bands produced the highest and the least number of amplified bands. MSG0681, MSE0113, MSG0403 markers with the highest amount of observed allele, effective allele, Nei index, Shannon index and PIC were identified as the most effective markers for analyzing genetic diversity in the studied tea genotypes. Among the RAPD markers, the OS-03 primer with 19 bands produced the highest number of bands and the OR-12 primer with 13 bands produced the least number of bands.

Conclusions

By comparing the mean PIC of the two marker systems, the microsatellite markers were more effective than RAPD markers. For example, the mean PIC value for SSR markers was measured 0.66 across the tea germplasm. By comparing QND and EMI indices, we found that microsatellite markers were superior to RAPD markers. Also, by comparing the results of cluster analysis of two markers, the microsatellite markers were better able to classify individuals based on their geographic origin.

Keywords: Tea, Microsatellite markers, Marker efficiency, RAPD, Polymorphism information content.

Citation: Kordrostami M, Rahimi M, Safaei Chaeikar S, Seraji A, Azadi, R (2019) Investigation the efficiency of molecular markers to assess genetic diversity of Iranian tea clones. Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 79-100.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 79-100.

DOI: 10.22103/jab.2019.13662.1120

Received: April 28, 2019; Accepted: June 25, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی کارآیی نشانگرهای مولکولی در ارزیابی تنوع ژنتیکی کلون‌های مختلف چای ایران

مجتبی کردرستمی

* نویسنده مسئول، دانش‌آموخته دکتری، باشگاه پژوهش‌گران جوان و نخبگان، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران. تلفن: ۰۹۱۷۷۰۱۵۸۷۲؛ ایمیل: kordrostami009@gmail.com

مهدی رحیمی

استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان. ایمیل: me.rahimi@kgut.ac.ir

صنم صفائی چائی‌کار

استادیار، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران. ایمیل: sanamsafaei@yahoo.com

علی سراجی

استادیار، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران. ایمیل: seraji1167@gmail.com

رضا آزادی

استادیار، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران. ایمیل: r.azadi@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٤/۰٤

چکیده

هدف: تنوع ژنتیکی ۲۰ کلون چای جمع‌آوری شده از سازمان تحقیقات چای کشور، با استفاده از ۲۰ نشانگر ریزماهواره و ۱۰ نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها: مواد گیاهی در این آزمایش ۲۰ کلون چای انتخابی در موسسه تحقیقات چای کشور بود. استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان کلون‌های چای با استفاده از روش CTAB با اندکی تغییرات انجام گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره و RAPD به ترتیب تعداد ۱۰۵ و ۱۶۰ نوار چندشکل تولید کردند. از میان نشانگرهای ریزماهواره، آغازگر MSE0143 با ۹ باند و آغازگر MSG0681 با ۸ باند بیشترین و آغازگر MSG0610 با ۲ باند، کمترین تعداد قطعات تکثیرشده را ایجاد کردند. نشانگرهای MSG0681، MSE0113، MSG0403 با دارا بودن بیشترین میزان تعداد آلل مشاهده شده، آلل مؤثر، شاخص تنوع ژنی نئی، شاخص شانون و میزان اطلاعات چند شکلی در این مطالعه به عنوان مؤثرترین نشانگرهای ریزماهواره جهت تجزیه تنوع ژنتیکی در کلون‌های مطالعه شده شناسایی شدند. از میان نشانگرهای RAPD، آغازگر OS-03 با تعداد ۱۹ باند، بیشترین تعداد باند و آغازگر OR-12 با تعداد ۱۳ باند کمترین تعداد باند را تولید کردند.

نتیجه‌گیری: با مقایسه میانگین میزان اطلاعات چند شکل (PIC) دو سیستم نشانگری مشخص شد که نشانگرهای ریزماهواره نسبت به RAPD کارایی بیشتری دارند. به عنوان مثال، میانگین مقدار PIC برای نشانگرهای SSR ۰/۶۶ در سراسر کلون‌های چای اندازه‌گیری شد. با مقایسه شاخص‌های QND و EMI مشخص شد که نشانگرهای ریزماهواره نسبت به نشانگرهای RAPD برتر هستند. همچنین با مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای دو نشانگر تعیین گردید که نشانگرهای ریزماهواره بهتر قادر بودند تا کلون‌ها را بر اساس منشا جغرافیایی‌شان طبقه‌بندی کنند.

کلمات کلیدی: چای، نشانگرهای ریزماهواره، کارآیی نشانگر، محتوای اطلاعات چندشکلی، RAPD.

مقدمه

چای با نام علمی (*Camellia sinensis* L.) پس از آب و شیر متداول‌ترین نوشیدنی در دنیاست. طبق آمار سال ۲۰۱۶، مصرف چای در ۵۴ کشور به‌عنوان یک نوشیدنی متداول مطرح می‌باشد و در این کشورها سالانه هر فرد به طور میانگین ۵۰۰ گرم چای مصرف می‌نماید. بر طبق این آمار، ترکیه با ۳/۱۶ کیلوگرم به ازای هر فرد در رتبه اول و کشورمان ایران با ۲/۱۹ کیلوگرم به ازای هر فرد در رتبه دوم قرار دارد (Quartz 2016). کشور ایران یکی از مصرف‌کنندگان عمده چای است و این محصول در زندگی و اقتصاد خانواده‌های ایرانی و کشور جایگاه ویژه‌ای دارد، چرا که مصرف آن در تمام مراسمات مذهبی، ملی و سنتی، رایج است (Rezaee et al. 2016). منشاء چای ایران به سه واریته بذری به نام‌های Betjan، Dhunjan و Rajghur باز می‌گردد (Ahuja et al. 2013). بوته‌های موجود در یک باغ چای، نه تنها از لحاظ صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و عملکرد متفاوتند، بلکه کیفیت هر بوته با بوته دیگر متفاوت است (Sivapalan et al. 1986). تیپ چینی چای که در ایران رایج می‌باشد (*Camellia sinensis* L.)، یک بوته بزرگ با ساقه‌های متعدد و منشعب شده از یک محل بوده که دارای برگ‌های قائم و

www.SID.ir

Archive of SID

کوچک به طول ۱۴ – ۱/۵ سانتی‌متر و عرض ۲/۵ – ۱ سانتی‌متر می‌باشد. برگ‌ها دارای نمای واکسی یا چرمی بوده و عمدتاً با رنگ سبز تیره دیده می‌شوند. بوته‌های تیپ چینی دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد را هم تحمل می‌کنند. برگ سبز حاصل از بوته‌های این تیپ زراعی، برای تولید چای سبز و نیمه تخمیر مناسب است. کم محصول‌تر از سایر تیپ‌های زراعی‌اند، اما کیفیت چای تولیدی آن‌ها بسیار عالی است. هر چند که چای آن کم رنگ است، ولی خوش‌عطر می‌باشد. این تیپ زراعی چای در کشورهای چین، ژاپن، ایران، ترکیه و گرجستان کشت می‌شود (Wachira et al. 2013). باغ‌های چای ایران نیز مرکب از تک‌بوته‌های بذری هستند که به خاطر بسیاری از خصوصیات ریخت‌شناسی‌شان، به‌عنوان هیبریدهای تیپ چینی شناخته می‌شوند. با توجه به مطالب ذکر شده متوجه می‌شویم که تنوع ژنتیکی وسیعی بین کلون‌های چای ایرانی موجود است و بنابراین مطالعه تنوع ژنتیکی این کلون‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

همانطور که در بالا نیز عنوان گردید، دستیابی به تنوع ژنتیکی موجود از اقدامات اساسی است که قبل از انجام هر برنامه اصلاحی باید مورد توجه قرار گیرد تا به‌نژادگر بتواند به نحو مطلوبی از خصوصیات ذخایر ژنتیکی آگاهی کامل کسب کند (Poehlman 2013). تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی بسیار مهم بوده و اصلی مهم برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (Cregan & Schaap 2010). تنوع ژنتیکی به جهت فراهم آوردن اطلاعات لازم برای توسعه منابع ژنتیکی در جهت انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های به‌نژادی و حداکثر بهره‌وری از پدیده هتروزیس از اهمیت بالایی برخوردار است (Melchinger 1999). دانش کافی و کامل از تنوع ژنتیکی، اصلاح‌گران را قادر به انتخاب منابع والدی مناسب در جهت ایجاد جمعیت متنوع از نظر ژنتیکی می‌سازد. چندین روش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان وجود دارد که یکی از آن‌ها به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی است. نشانگرهای مولکولی در کاهش اندازه جمعیت در جهت اندازه‌گیری میزان تنوع در مراحل اولیه مفید خواهند بود (Weising et al. 2005). یکی از انواع مهم نشانگرهای مولکولی که به وفور در بررسی تنوع ژنتیکی به‌کار برده می‌شود، ریزماهواره‌ها می‌باشند (Kordrostami et al. 2016). ریزماهواره‌ها شامل طیف وسیعی از نشانگرها هستند که همگی بر اساس توالی‌های تکراری ژنوم استوار هستند. تکرارها می‌توانند AG، AC، GC و ... باشند، ولی در ژنوم گیاهی تکرارهای $(AT)_n$ و $(A)_n$ بیش از سایرین به چشم می‌خورند. این گروه نشانگرهای چندشکلی بسیار زیادی دارند و از طرفی هم بارز نیز هستند (Naghavi et al. 2009). نشانگر ریزماهواره در حال حاضر برای استفاده در تجزیه و تحلیل‌های درون‌گونه‌ای بر سایر نشانگرهای DNA و میتوکندری پیشی گرفته است. با تمام فواید اشاره شده برای نشانگرهای ریزماهواره، توسعه این نشانگر نیاز به توالی‌یابی ژنوم دارد. بنابراین جهت کاوش ژنوم‌های ناشناخته نیاز به استفاده از نشانگرهای تصادفی مانند RAPD[۱] احساس می‌شود (Xu 2010). RAPD یکی از روش‌های پایه‌ای است که در آن آغازگرهای اختیاری برای تکثیر قطعه های DNA الگو استفاده می‌شوند (Naghavi et al. 2009).

۱. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

www.SID.ir

Archive of SID

با استفاده از نشانگرهای مولکولی، مطالعات مختلفی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی انواع تیپ چای انجام گرفته است. پژوهشگران (Chen & Yamaguchi 2002) تنوع ژنتیکی در گیاه چای (*Camellia sinensis*) و ۲۳ گونه نزدیک به آن را با استفاده از نشانگرهای RAPD ارزیابی کردند. در این تحقیق از ۶۷ پرایمر استفاده شد و ۱۰۲ باند چندشکل ایجاد شد. بر اساس نتایج این تحقیق، نشانگر مولکولی RAPD تنوع بسیار زیادی را در چای و گونه‌های خویشاوند آن نشان داد، همچنین شواهد دقیقی مبنی بر نزدیکی زیاد گونه زراعی چای و گونه‌های وحشی خویشاوند آن بدست آمد. محققان تایوانی (Lai et al. 2001) تنوع ژنتیکی در کلون‌های چای زراعی بومی در تایوان را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR [۱] مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، تعداد ۳۷ کلون چای با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR ارزیابی شدند که شامل ۲۱ کلون از چین، ۳ کلون از آسام، ۷ کلون هیبرید بین چای چینی و آسام و ۶ نمونه منفرد چای وحشی بومی تایوان بود. در کل از ۵ نشانگر RAPD و ۵۶ نشانگر ISSR استفاده شد. نتایج تجزیه کلاستر حاصل از نشانگرهای RAPD نشان داد که سه گروه اصلی می‌تواند تشخیص داده شود. چای وحشی بومی تایوان به‌طور نزدیکی با چای آسامی نسبت به چای ارقام چینی و رقم‌های هیبریدی تایوان گروه‌بندی شد و تنوع ژنتیکی داخل جوامع چای وحشی بومی تایوان بالاترین مقدار را در بین سه جمعیت مورد مطالعه داشته است. در دندروگرام حاصل از نشانگرهای ISSR، کلون‌های چای وحشی بومی تایوان با کلون‌های تیپ آسامی طبقه‌بندی شدند، سپس کلون‌های تیپ چینی و تایوانی در کنار یکدیگر قرار گرفتند. تنوع ژنتیکی جمعیت چای وحشی بومی، بالاترین مقدار از سه جمعیت مورد مطالعه را دارا بوده است. در آزمایشی (Bhardwaj et al. 2014) به منظور ارزیابی تنوع مولکولی و طبقه‌بندی ۱۵ ژنوتیپ چای با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، تعداد ۱۲۷ نوار چندشکل با متوسط ۶/۰۵ آلل در هر مکان ژنی گزارش کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که کلون‌های چای موجود در غرب هیمالیا از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بودند که می‌تواند شرایط مناسبی را برای به‌نژادی چای فراهم کند. در پژوهشی (Zhang et al. 2018) به منظور انتخاب و بهینه‌سازی نشانگرهای مولکولی در گیاه چای، از تعداد ۱۱۸ نشانگر مولکولی (از جمله ۴۰ نشانگر EST-SSR، ۴۰ نشانگر SRAP [۲] و ۳۸ نشانگر SCoT [۳]) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۵۰ کلون چای (*Camellia sinensis*) از کینبا استفاده شد. در این مطالعه آن‌ها بدین نتیجه رسیدند که نشانگرهای SCoT نسبت به سایر نشانگرها دارای مقادیر بیشتری برای تعداد باند چندشکل، درصد چندشکلی و شاخص نشانگری بودند. اما با بررسی شاخص‌های نشانگری بدین نتیجه رسیدند که نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی را دارا بودند.

به علت زیاد بودن مصرف سرانه چای (سرانه هر فرد ۲/۱۹ کیلوگرم در سال) (Quartz, 2016)، ایران هم تولیدکننده و هم واردکننده چای است. از این رو توجه به تمام ویژگی‌های این محصول لازم و حائز اهمیت است و می‌تواند در بهبود وضع

۱. Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)
۲. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)
۳. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

زندگی و رضایت خاطر مردم، چه آن‌هایی‌که در امر تولید چای کار می‌کنند و چه آن‌هایی‌که به مصرف چای عادت و علاقه دارند مؤثر باشد. بنابراین مطالعه حاضر، برای اولین بار، به جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی مولکولی (توسط نشانگرهای ریزماهواره و RAPD) کلون‌های چای موجود در موسسه تحقیقات چای کشور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این آزمایش ۲۰ کلون چای انتخابی در موسسه تحقیقات چای کشور بود (جدول ۱). استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان کلون‌های چای با استفاده از روش CTAB[1] (Murray & Thompson 1980) انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. سپس عکس‌برداری باندها با دستگاه ژل داک (مدل Bio-Rad) انجام شد. در این مطالعه از ۲۰ نشانگر ریزماهواره (جدول ۲) و ۱۰ نشانگر RAPD (جدول ۳) جهت مطالعه تنوع ژنتیکی کلون‌های چای استفاده شد. برای نشانگرهای ریزماهواره، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR[2]) در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳/۸ میکرولیتر محلول مادری (شرکت سیناکلون) و آغازگر مستقیم و معکوس هر یک با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر به میزان ۰/۵ میکرولیتر بود که به تیوب‌های محتوای ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر اضافه شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. به تیوب‌ها مقدار ۱۲ میکرولیتر روغن معدنی اضافه شد و بلافاصله به دستگاه ترموسایکلر ABI, Applied Biosystems منتقل شدند. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵–۶۵ درجه سیلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه بود که در انتها بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس انجام شد. محصولات به دست آمده از PCR به منظور مشاهده نحوه تکثیر DNA و الگوی نواری ایجاد شده، روی ژل‌های پلی‌اکریل‌امید ۱۰ درصد منتقل و الکتروفورز آن‌ها با ولتاژ ثابت ۱۴۰ ولت به‌وسیله دستگاه الکتروفورز عمودی BioRAD انجام شد. برای مشاهده نوارهای ایجاد شده به‌وسیله کلون‌های مختلف از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. سپس به‌منظور بررسی نتایج، ژل در دستگاه ژل داگ Bio DOC Analyzer Biometrat مورد مشاهده قرار گرفت. همچنین الگوی دمایی برای آغازگر RAPD نیز به این شرح بود: اولین چرخه حرارتی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ سیکل به‌صورت ۱ دقیقه واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای Tm[3] (بسته به آغازگر متفاوت بود)، ۱ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، سپس نگهداری در دمای ۴ درجه

۱. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
۲. Polymerase chain reaction
۳. Melting Temperature (Tm)

www.SID.ir

Archive of SID

سلسیوس بود. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۷۰ ولت طی یک ساعت الکتروفورز تفکیک شدند. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. سپس به منظور بررسی نتایج، ژل در دستگاه ژل داگ Bio DOC Analyzer Biometrat مورد مشاهده قرار گرفت.

جدول ۱. لیست کلون‌های چای مورد مطالعه و نماد آن‌ها

Table 1. List of studied tea genotypes and their symbol

ردیف Row	کد ژنوتیپ Genotype code	منشا Origin	عملکرد Yield	نماد Symbol
1	SAYAMA KAORI	Japan	Unknown	G1
2	YABUKITA	Japan	Unknown	G2
3	Oiwase	Japan	Unknown	G3
4	3014	Sri Lanka	High	G4
5	DG7	Sri Lanka	High	G5
6	DG39	Sri Lanka	High	G6
7	3015	Sri Lanka	High	G7
8	3016	Sri Lanka	High	G8
9	3017	Sri Lanka	High	G9
10	3013	Sri Lanka	High	G10
11	272	China	High	G11
12	276	China	Average	G12
13	277	China	Average	G13
14	278	China	Average	G14
15	279	China	Average	G15
16	280	China	Average	G16
17	282	China	Average	G17
18	284	China	Average	G18
19	285	China	High	G19
20	Bazri	China	Average	G20

www.SID.ir

Archive of SID

الگوی باندی بر اساس وجود یا عدم وجود باندها به ترتیب (یک و صفر) نمره‌دهی شدند. داده‌های حاصل به صورت یک ماتریس وارد نرم افزار Excel شدند که در آن کلون‌ها به‌عنوان ردیف و باندهای مشاهده شده‌ی آغازگرها به‌عنوان ستون‌های ماتریس در نظر گرفته شدند. همچنین برای هر الل نشانگری در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت ۱، ۲، ۳ و ... نام‌گذاری و برای برآورد فراوانی آللی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه استفاده شدند. درصد چندشکلی براساس رابطه ۱، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC[۱]) یک نشانگر بر اساس رابطه ۲، نسبت چندگانه مؤثر (EMR[۲]) براساس رابطه ۳، شاخص نشانگری (MI[۳]) براساس رابطه ۴، تعداد آلل‌های مؤثر (N_e[۴]) براساس رابطه ۵، شاخص شانون براساس رابطه ۶ و شاخص تنوع نئی بر اساس رابطه ۷ محاسبه گردیدند (Nei 1973; Powell et al. 1996; Hartl et al. 1997; Lynch & Walsh 1998; Shannon 2001).

$$\text{Polymorphism } \% = \left(\frac{np}{n}\right) * 100$$ رابطه ۱)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i$$ رابطه ۲)

$$EMR = n_p \times \beta$$ رابطه ۳)

$$MI = PIC \times EMR$$ رابطه ۴)

$$N(e) = \frac{1}{\sum p_i^2}$$ رابطه ۵)

$$I = -\sum_{i=1}^{n} p_i \ln p_i$$ رابطه ۶)

$$Nei = -ln \frac{Jxy}{\sqrt{JxJy}}$$ رابطه ۷)

همچنین ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار PAST ver 2.12 انجام شد. جهت مشخص شدن رابطه میزان همبستگی بین دندروگرام‌های حاصل از نشانگر SSR و نشانگر RAPD با همدیگر از آزمون مانتل استفاده شد (Powell et al. 1996). در این روابط، Pi، (i از یک تا n)، فراوانی آلل iام و n تعداد آلل، n_p، تعداد کل نوارهای چندشکل و β نسبت تعداد نوار چند شکل به تعداد کل نوار، Jx، Jy و Jxy به ترتیب میانگین حسابی همه آلل‌ها برای فرد x، y و مجموع آن‌ها می‌باشد. شاخص QND[۵] طبق روش برکت و همکاران (Baraket et al. 2011) محاسبه شد. آن‌ها QND را به‌صورت $QND = DC \times QM$

۱. Polymorphism information content (PIC)
۲. Effective multiplex ratio
۳. Marker index
۴. Number of effective alleles
۵. Qualitative nature of data

www.SID.ir

Archive of SID

PR × تعریف کردند، جایی‌که DC[۱] قابلیت استناد، QM[۲] کیفیت نشانگر و PR[۳] قابلیت تولید مجدد قطعه(ها)/ باند(ها)ی یک سیستم نشانگری در آزمایشگاه‌های مختلف است. DC و PR برای سیستم‌های نشانگری مختلف عددی ثابت هستند؛ با این‌حال، QM یک مقدار متغیر بوده و برای سیستم‌های نشانگری مختلف متفاوت است.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Specification of SSR primers used in this study

	ردیف Row	نام آغازگر Primer name	آغازگر رفت Forward	آغازگر برگشت Revers
SSR	1	MSG	ACTCATCACCATGCC	GTTTAGCTCAACTGGTG
	2	MSG	AGATGGAGGTAGAG	GTTTGTCCCTCTCATTTT
	3	MSE0	GTGTTCACCAACAAC	TGTCGAACAAAGATAC
	4	MSG	AGGACCGTTCTTCCC	GTTTGAGATTGAGGATG
	5	MSE0	ATAGCCAATCAAGCT	AGTCTGTTCCTCCCTTG
	6	MSG	AGACCTAGCCAAGAC	GTTTCCCCTATTTTCCC
	7	MSE0	CTTCCCCAAACCACC	GAAATTGAAGAACACG
	8	MSG	ACAGACCTTCACCCT	GTTTACCTCTGCCTTCG
	9	MSE0	TGCTATGCCGCCTAA	ACCACCAACAACAATTC
	1	MSG	ATGTTGGACCAGTAG	GTTTCGGGTTCCTTTCT
	1	MSG	ACTCCATGTGCTGCT	GTTTGCAGGAAGTTGAG
	1	MSG	ACAGAGGAGGAAGA	GTTTGAAGAAGAAGAA
	1	MSE0	AGTCCATGGTGGTTG	TTGGGAGTAGGATTCTT
	1	MSG	ATGATCGCCGGTTTA	GTTTAAGCTGGCTAACC
	1	MSE0	CTCTCCTTCTTCACAC	TTGTTCTCAAAGAACCT
	1	MSE0	AATCAAATAACACTT	AAAAAGAGAAAGTCAC
	1	MSE0	TACCTTCTGCAACTC	TGAGATTGACCATCTTT
	1	MSE0	GCCTTTTTGTCAGAA	CAGCAATCTTTGGTTTT
	1	MSG	AGGGTTTGCGTCTTC	GTTTGTAACACTTGCCA
	2	MSE0	TCTCTCTACTCCTGCG	TCAAAGATGTTGCTCTC

۱. Documentation capability
۲. Quality of marker
۳. Percent reproducibility

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر ثابت DC و PR برای نشانگرهای مختلف به صورت زیر تنظیم می‌شوند: مقدار DC برای نشانگرهای هم‌بارز ۰/۷۵ و برای نشانگرهای غالب ۰/۲۵ در نظر گرفته می‌شود (Varshney et al. 2007). مقدار PR برای نشانگرهای هم‌بارز و بارز به ترتیب ۱ و ۰/۵ می‌باشد. همانطور که عنوان شد، QM یک مقدار متغیر بوده و برای سیستم‌های نشانگری مختلف متفاوت است. بنابراین، کاربر نیاز دارد تا مقدار QM را در هر آزمایش بر اساس مقیاس زیر تعریف کند: ۱،۰۰، نشانگر با کیفیت خوب – باند تکی و قوی؛ ۰/۷۵ باند ضعیف؛ ۰/۵ باند بسیار ضعیف و ۰/۲۵ باندی که به دشواری می‌توان به آن اسکور داد (نیاز به تلاش‌های ویژه برای آشکارسازی باند دارد). در نهایت، شاخص نشانگری موثر (EMI[1])، به شرح زیر محاسبه شد:

$$EMI = MI \times QND$$ رابطه ۸)

جدول ۳. مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این مطالعه

Table 3. Specification of RAPD primers used in this study

	ردیف Row	نام آغازگر Primer	دمای اتصال آغازگر TM	توالی Sequence
RAPD	1	CS-44	32	5' ATTCGGCCG C 3'
	2	CS-46	34	5' GGGATCTAG C 3'
	3	CS-56	32	5' TGGTGGGTC C 3'
	4	OH-04	34	5' GGAAGTCGC C 3'
	5	OR-12	30	5' ACAGGTGCG T 3'
	6	OS-03	34	5' CAGAGGTCC C 3'
	7	SA-F	32	5' CGGCCCCTG T 3'
	8	SA-R	34	5' AGGTCACTG A 3'
	9	BB13	34	5' TTCCCCCGC T 3'
	10	OA12	32	5' TCGGCGATA G 3'

نتایج و بحث

اطلاعات مربوط به نوارهای تولید شده توسط نشانگرهای ریزماهواره در جدول ۴ آورده شده است. ۲۰ آغازگر ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق، در مجموع ۱۰۵ نوار مختلف ایجاد کردند. آغازگر MSE0143 با ۹ باند و آغازگر MSG0681 با ۸ باند بیشترین و آغازگر MSG0610 با ۲ باند، کمترین تعداد قطعات تکثیرشده را ایجاد کردند. متوسط تعداد باند برای هر آغازگر ۵/۲۵ باند بود. تمامی باندهای ایجادشده چندشکل بودند. در آزمایشی Bhardwaj et al. (2014) به منظور ارزیابی تنوع

۱. Effective marker index

www.SID.ir

Archive of SID

مولکولی و طبقه‌بندی ۱۵ ژنوتیپ چای با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مشابه نشانگرهای استفاده شده در مطالعه حاضر ۱۲۷ نوار چندشکل با متوسط ۶/۰۵ آلل در هر مکان ژنی گزارش کردند که از تحقیق حاضر به مراتب بیشتر بود. دلیل آن نوع کلون‌های مطالعه شده در این دو تحقیق بود، به‌طوری که محققان دیگر (Bhardwaj et al. 2014) از ۱۵ ژنوتیپ متفاوت استفاده کردند، در حالی‌که در تحقیق حاضر فقط ۳ کلون تیپ ژاپنی مورد مطالعه قرار گرفت و سایر کلون‌ها اکثراً چینی و سریلانکایی بودند. در پژوهشی Yao et al. (2012) نیز جهت ارزیابی ژنوتیپ‌های چای از ۹۶ نشانگر ریزماهواره استفاده نمودند که نشانگرهای مزبور در مجموع ۴۰۹ باند (با متوسط ۶/۳ آلل برای هر نشانگر) تولید نمودند. نتایج آن‌ها نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نتیجه تحقیق حاضر دارد. تفاوت موجود در تعداد آلل در هر لوکوس در تحقیقات مختلف به‌دلیل تفاوت تنوع ژرم‌پلاسم‌ها، تعداد کلون‌ها و انتخاب نشانگرهای SSR با تعداد متفاوت آلل‌های قابل امتیازدهی (اسکوردهی) می‌باشد. بررسی نتایج حاصل از پژوهش‌های محققین دیگر در مورد تعداد آلل‌های مشاهده شده در جایگاه نشانگرهای ریزماهواره بسیار متفاوت است. به‌طوری که تعداد آلل مشاهده شده در نشانگر MSG0258 در مطالعه Taniguchi (2014) معادل ۲۱ عدد بود، در حالی‌که در این مطالعه فقط ۵ آلل مشاهده شد. اگر چه تفاوت در تعداد آلل‌ها در مکان‌های ژنی مختلف می‌تواند به علت تفاوت در نوع کلون‌ها و مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف و احتمالاً به‌علت تغییر در طول واحد تکراری در اثر وقوع جهش در زمینه‌های ژنتیکی مختلف باشد (Nili et al. 2017)، اما دلیل اصلی تفاوت نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر مطالعات نوع کلون‌های مورد مطالعه است. محتوای اطلاعات چندشکل در این تحقیق برای نشانگرهای SSR در محدوده ۰/۳۴ تا ۰/۸۱ با میانگین ۰/۶۶ بود. بالاترین میزان PIC برای نشانگرهای MSG0681 و MSE0113 به ترتیب ۰/۸۱ محاسبه شد که بیانگر کارآیی بالاتر این دو نشانگر در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر می‌باشد. میانگین PIC در مطالعات مختلف (Yao et al. 2012) ۰/۶۱، (Bhardwaj et al. 2014) ۰/۳۶، (Zhang et al. 2018) ۰/۸۵، و (Wang et al. 2016) ۰/۵۵ گزارش شد. در این تحقیق نیز به جز نشانگر MSG0610، سایر نشانگرها از PIC بالایی برخوردار بودند. شاید دلیل مقادیر مناسب PIC در پژوهش حاضر، انتخاب مکان‌های SSR مورد استفاده براساس میزان اطلاعات چندشکلی و قدرت تمایز آن‌ها در مطالعات قبلی باشد. مقادیر بالای ارزش اطلاعات چندشکل در این آزمایش حاکی از آن است که نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه، چندشکلی بالایی داشته و برای بررسی تنوع ژنتیکی کلون‌های چای مورد استفاده در این تحقیق در سطح DNA بسیار مناسب هستند. در این بررسی (جدول ۴) تعداد آلل مؤثر در محدوده بین ۵/۵-۱/۱، با میانگین ۳/۷ که کمترین آن مربوط به نشانگرهای MSG0610 و MSE0250 و بیشترین آن به‌ترتیب مربوط به نشانگرهای MSE0113 MSG0681 بود. نتایج نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین نتایج این مطالعه و سایر مقالات وجود دارد. به عنوان مثال تعداد آلل موثر در این مطالعه از Bhardwaj et al. (2014) و Tan et al. (2015) (به‌ترتیب ۲/۹، و ۲/۶۸) بیشتر بود. از جهتی در مقایسه با تحقیقات مشابه (Yao et al. 2012) این میزان به مراتب کمتر بود. بعضی محققان (Nili et al. 2017) وجود این تفاوت را به تفاوت در ژنوتیپ‌ها و مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش‌های مختلف نسبت دادند. آلل مؤثر از معیارهای مهم انتخاب نشانگرهای مطلوب است. باتوجه به حداکثر بودن PIC در

www.SID.ir

Archive of SID

MSG0681 و زیاد بودن تعداد آلل موثر در آن، این نشانگر می‌تواند جز نشانگرهای مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی و انتخاب کلون‌های چای قرار گیرد. به طور کلی، بالا بودن میانگین‌های تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع ژنی نئی و میزان اطلاعات چند شکل در جایگاه‌های ریزماهواره بیانگر کارآمدی ریزماهواره‌های مورد استفاده برای تمایز ژنتیکی کلون‌های مورد مطالعه می‌باشند. بنابراین نشانگرهای MSG0681، MSE0113، MSG0403 با دارا بودن بیشترین میزان تعداد آلل مشاهده شده، آلل موثر، شاخص تنوع ژنی نئی، شاخص شانون و میزان اطلاعات چند شکل در این مطالعه به‌عنوان موثرترین نشانگرها جهت تجزیه تنوع ژنتیکی در کلون‌های مطالعه شده شناسایی شدند (جدول ۴). نتایج مقایسه گروه‌بندی کلون‌ها با روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و معیارهای متفاوت تشابه بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک، شکل دندروگرام و نوع گروه‌بندی نشان داد که گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، بهترین روش گروه‌بندی را ارایه داد (میزان ضریب کوفنتیک در این روش ۰/۸۹ بود که بیان‌گر کارایی بالای این روش در گروه‌بندی کلون‌ها است).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، کلون‌های موجود در یک کشور با ضریب تشابه بالا در کنار یکدیگر قرار گرفتند، اگرچه در برخی از خوشه‌ها نیز کلون‌های چای از کشورهای مختلف نیز در کنار یکدیگر گروه‌بندی شدند. به عنوان مثال، در گروه اول کلون‌های ۱، ۲ و ۳ از ژاپن در کنار یکدیگر قرار گرفتند. هر چند در این گروه کلون ۱۲ از چین نیز در این گروه قرار گرفته بود. همچنین، گروه دوم دارای دو کلون ۵ و ۹ بود که هر دو از کشور سریلانکا بودند. گروه سوم دارای دو زیر خوشه بود. زیرخوشه اول دارای ۵ کلون ۴، ۷، ۸، ۶ و ۱۰ بودند که همگی از کشور سریلانکا بودند. زیرگروه دوم نیز دارای ۹ کلون چای بود. کلون‌های ۲۰، ۱۴، ۱۱، ۱۸، ۱۶، ۱۳، ۱۷، ۱۹، ۱۵ که در این زیرگروه قرار گرفتند همگی از کشور چین بودند. این مساله صحت گروه‌بندی را نشان می‌دهد و بیانگر این است که نشانگرهای ریزماهواره به خوبی قادر هستند تا کلون‌ها را بر اساس منشأ جغرافیایی‌شان گروه‌بندی کنند. ده ترکیب آغازگری RAPD مورد استفاده در ۲۰ کلون مورد مطالعه در مجموع ۱۶۰ باند تولید نمودند که از بین آن‌ها ۱۴۶ باند (۹۱/۲ درصد) چندشکل بودند. میانگین تعداد باندهای چندشکل به ازای هر ترکیب آغازگر برابر با ۱۴/۶ باند بود (جدول ۵). در این پژوهش با توجه به تعداد باند و درصد چندشکلی (۹۱/۲ درصد) می‌توان اظهار داشت که نتایج قابل اعتمادی به‌دست آمده است.

در بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر OS-03 با تعداد ۱۹ باند، بیشترین تعداد باند و آغازگر OR-12 با تعداد ۱۳ باند کمترین تعداد باند را تولید کردند. آغازگر CS-44 با ۸۶/۷ کمترین درصد چندشکلی و آغازگر SA-F با ۱۰۰ درصد بیشترین درصد چندشکلی را دارا بودند، که نشان دهنده تنوع بالا در بین کلون‌های چای و قدرت تفکیک این آغازگرها در تفکیک بین جمعیت‌ها است. چند محقق (Boonerjee et al. 2013) تنوع ژنتیکی در جمعیت چای را با استفاده از ۲۰ آغازگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند. از ۷۵۵ باند آشکار شده ۹۷٪ باند چندشکل بودند. کمترین و بیشترین تعداد باند در هر آغازگر به ترتیب برابر با ۱۴ و ۲۵ بدست آمد که به مراتب بیشتر از نتایج این مطالعه بود.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤. ویژگی‌های نشانگری نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق

Table 4. Microsatellite marker features used in this research

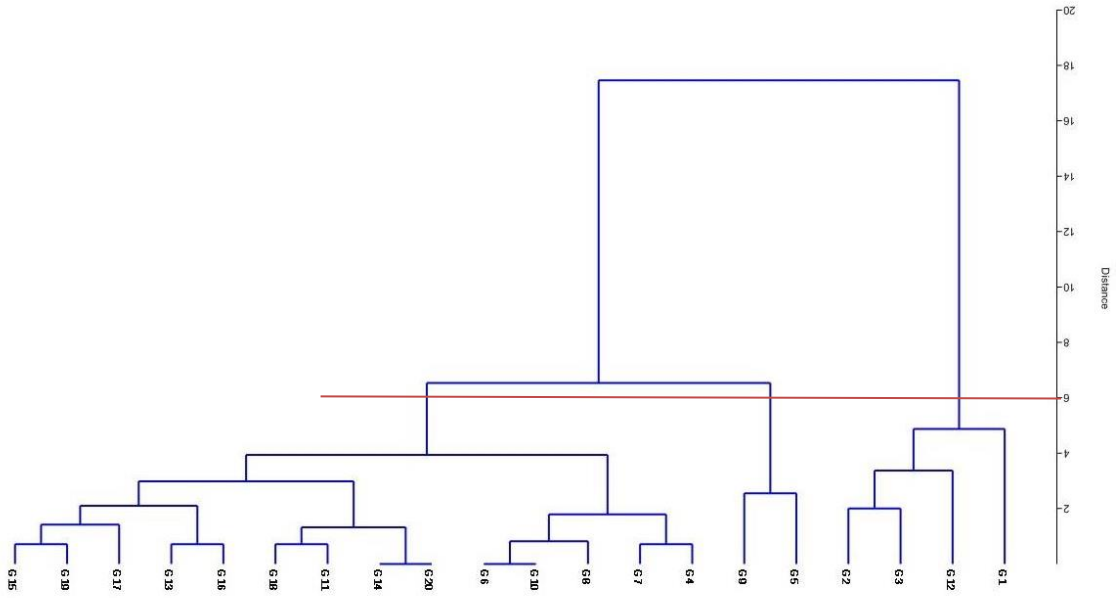
نام آغازگر Primer	Na	Ne	Nei	I	PIC
MSG0258	5	3.4	0.71	1.37	0.68
MSG0361	6	4.6	0.78	1.62	0.69
MSE0173	5	4.1	0.76	1.50	0.73
MSG0429	4	3.2	0.69	1.27	0.65
MSE0029	4	3.1	0.68	1.23	0.65
MSG0533	4	2.7	0.62	1.17	0.57
MSE0250	4	2.2	0.54	0.87	0.46
MSG0380	6	4.6	0.78	1.62	0.76
MSE0313	5	2.9	0.67	1.28	0.62
MSG0702	5	3.9	0.74	1.48	0.72
MSG0423	5	4.2	0.76	1.49	0.74
MSG0610	2	1.1	0.04	0.09	0.34
MSE0108	5	2.9	0.65	1.24	0.61
MSG0403	6	4.7	0.79	1.65	0.77
MSE0237	6	3.1	0.67	1.37	0.66
MSE0291	4	2.8	0.65	1.17	0.59
MSE0113	7	5.5	0.82	1.79	0.81
MSE0143	9	3.7	0.73	1.63	0.76
MSG0681	8	5.3	0.81	1.80	0.81
MSE0107	5	3.1	0.68	1.34	0.65
Mean میانگین	5.25	3.7	0.71	1.35	0.66

محققان دیگر (Kaundun et al. 2000) در ارزیابی ۲۷ جمعیت چای با استفاده از ۱۷ آغازگرهای RAPD، ۹۹ باند به‌دست آوردند که ۵۹ درصد چند شکل بود. میانگین کل باندها و باندهای چندشکل به ترتیب ۱۲/۲ و ۱۱/۴ درصد بود. که از نتایج این مطالعه به مراتب کمتر بود. در پژوهشی Roy and Chakraborty (2009) با استفاده از ۱۲ پرایمر RAPD و ۷ پرایمر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ ژنوتیپ چای، تعداد باند را در دو سیستم نشانگری RAPD و ISSR به ترتیب ۷۲ و ۷۰ بدست آوردند. جهت ارزیابی سودمندی نشانگرهای RAPD از معیارهای تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی، شاخص PIC و شاخص تنوع شانن استفاده شد. در این پژوهش میزان آلل مشاهده شده بین ۱/۸۶ تا ۲ متغیر بود و میانگین ۱/۹۱ بدست آمد. بیشترین تعداد آلل

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شده در ترکیب آغازگری SA-F و کمترین میزان مربوط به ترکیب آغازگری OA12 بود. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر ۱/۵۲ به‌دست آمد و از ۱/۲۸ تا ۱/۶۷ متغیر بود. کمترین تعداد آلل مؤثر را ترکیب آغازگری BB13 داشت که میزان آن ۱/۲۸ بود. بیشترین تعداد آلل مؤثر مربوط به ترکیب‌های CS-46، OH-04، و CS-56 در بین کلون‌ها بود (جدول ۵). با توجه به اینکه تعداد آلل مؤثر یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگر مناسب و سودمند است، می‌توان از این آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی در کلون‌های مختلف چای استفاده کرد (Nili et al. 2017).



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA برای نشانگرهای SSR

Figure 1. Cluster analysis dendrogram based on Jaccard similarity coefficient and UPGMA method for SSR markers

یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نئی می‌باشد. میزان تنوع ژنی نئی از ۰/۲ تا ۰/۳۸ متغیر بود (جدول ۵) و آغازگرهای BB13 و OH-04 به ترتیب کمترین و بیشترین میزان تنوع ژنی نئی را دارا بودند. میانگین تنوع ژنی نئی در این مطالعه ۰/۳۳ بود. ضریب شانون نیز بیانگر میزان چندشکلی در بین جمعیت‌ها است. در این مطالعه میانگین ضریب شانون ۰/۴۸ بود. ترکیب‌های آغازگری CS-46، CS-56، SA-F بیشترین میزان شاخص شانون و ترکیب آغازگری BB13 با ۰/۳۴ کمترین میزان را دارا بودند (جدول ۵). محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) به تفکیک برای هر یک از آغازگرهای مورد استفاده محاسبه و نتایج مربوطه در جدول ۶ ارائه شده است. میزان اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۳۷ تا ۰/۴۸ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۴۵ بود. بالاترین میزان PIC در ترکیب‌های آغازگر CS-56، SA-F، و OA12 به میزان ۰/۴۸می‌باشد که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیق می‌باشد. هم‌چنین به‌منظور تعیین کارآیی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان (EMR) برای ترکیب آغازگر SA-F با ۱۹/۶ و کمترین میزان EMR به مقدار ۱۱/۱ برای ترکیب آغازگر OR-12 بدست آمد. ترکیب SA-F با ۹/۴ بیشترین مقدار MI را دارا بود و ترکیب OR-12 با ۴/۴ کمترین مقدار MI را داشت.

جدول۵- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این پژوهش

Table 5. RAPD marker features used in this research

نام آغازگرها Primers	تعداد باند No of bands	تعداد باند چندشکل Polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism %	تعداد آلل مشاهده شده No of observed	تعداد آلل مؤثر No of effective alleles	تنوع ژنی نئی Nei genetic index	شاخص شانون Shannons index
CS-44	15	13	86.7	1.87	1.54	0.3	0.49
CS-46	16	14	87.5	1.87	1.67	0.38	0.54
CS-56	17	16	94.1	1.94	1.6	0.36	0.53
OH-04	15	13	86.7	1.86	1.66	0.38	0.53
OR-12	13	12	92.3	1.92	1.38	0.37	0.42
OS-03	19	17	89.5	1.89	1.49	0.29	0.46
SA-F	17	17	100	2	1.57	0.35	0.53
SA-R	16	14	87.5	1.88	1.56	0.34	0.5
BB13	17	16	94.1	1.94	1.28	0.2	0.34
OA12	15	14	93.3	1.93	1.45	0.29	0.45
کل Total	160	146	–				
میانگین Mean	16	14.6	91.2	1.93	1.45	0.29	0.45

در بررسی ساختار ژنتیکی واریته‌ها و جمعیت‌های بومی زرشک استان خراسان (Heidari et al. 2009) با استفاده از نشانگر AFLP، تعداد آلل مشاهده شده بین ۱/۰۲۷ تا ۱/۳۴۵ و تعداد آلل مؤثر بین ۱/۰۱۲ تا ۱/۱۹۴ بدست آمد. هم‌چنین تنوع ژنی نئی بین ۰/۰۰۸ تا ۰/۱۱۶ متغیر بود. کمترین مقدار تعداد آلل مؤثر و تنوع ژنی نئی مربوط به واریته‌ها و بیشترین مقدار این دو شاخص مربوط به جمعیت‌های شیروان بود. تجزیه خوشه‌ای با روش‌های UPGMA، Complete و Single و با استفاده از ضرایب تشابه مختلف نشان داد که گروه‌بندی بر اساس روش UPGMA و ضریب تطابق ساده بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های مورد بررسی است. گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه با ترسیم خط برش در فاصله ۱۴، ۲۰ کلون مورد مطالعه را در ۴ گروه اصلی قرار داد (شکل ۲). گروه‌های یک و دو به ترتیب شامل ۳ و ۹ کلون بودند. آغازگرهای مورد استفاده به خوبی توانستند کلون‌ها را از هم جدا کنند. گروه‌های ۳ و ۴ نیز هرکدام دارای ۴ کلون بودند. گروه ۱ دارای سه کلون ۱۷، ۱۶ و ۱۹ از چین بود.

www.SID.ir

Archive of SID

گروه دوم مخلوطی از کلون‌های ژاپن، سریلانکا و چین بود. به‌نحوی که این خوشه دارای دو زیرخوشه بود. زیر خوشه اول دارای دو کلون ۴ و ۹ از سریلانکا بود. زیرخوشه دوم دارای سه کلون ۱، ۲ و ۱۰ بودند که ۱ و ۲ از ژاپن و ۱۰ از سریلانکا بود.

جدول ٦- خصوصیات نشانگرهای RAPD

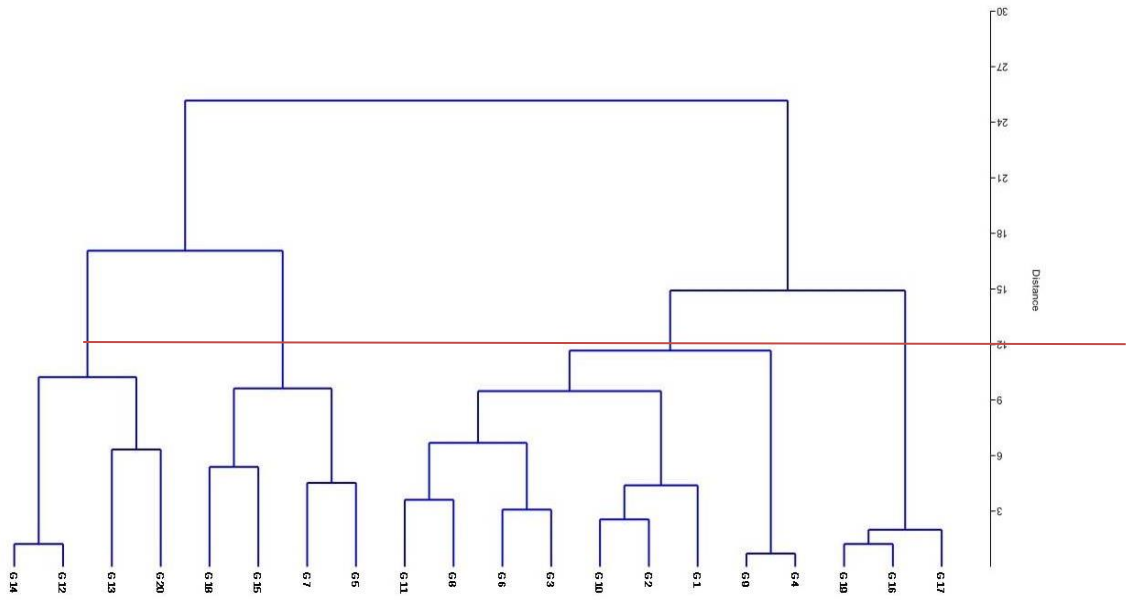
Table 6. Specifications of RAPD primers

Primer **نام آغازگر**	PIC	EMR	MI
CS-44	0.46	15.1	6.9
CS-46	0.44	13.1	5.8
CS-56	0.48	11.3	5.4
OH-04	0.46	11.3	5.2
OR-12	0.40	11.1	4.4
OS-03	0.45	15.2	6.8
SA-F	0.48	19.6	9.4
SA-R	0.47	15	7.1
BB13	0.37	15.1	5.6
OA12	0.48	12.3	5.9
Mean **میانگین**	0.45	11.3	6.4

زیرخوشه سوم نیز دارای ۴ کلون بود که کلون ۳ از ژاپن، ۶ و ۸ از سریلانکا و ۱۱ از چین بود. گروه سوم دارای ۴ کلون بود که کلون‌های ۵ و ۷ از سریلانکا و کلون‌های ۱۵ و ۱۸ از چین در کنار یکدیگر قرار گرفتند. گروه چهارم نیز دارای ۴ کلون بود که همگی از کشور چین بودند. با مقایسه میانگین PIC دو سیستم نشانگری در می‌یابیم که نشانگرهای ریزماهواره نسبت به RAPD نشانگرهای کاراتری بودند (جدول ۷). در واقع، نشانگرهای SSR در این مطالعه سطح پلی‌مورفیسم بسیار بالایی را در درختان چای مورد بررسی نشان دادند، به عنوان مثال، میانگین مقدار PIC برای نشانگرهای SSR ۰/۶۶ در سراسر ژرم پلاسم چای اندازه‌گیری شد. همچنین با مقایسه شاخص‌های QND و EMI در می‌یابیم که نشانگرهای ریزماهواره نسبت به نشانگرهای RAPD برتر بودند. همچنین با مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای دو روش در می‌یابیم که نشانگرهای ریزماهواره بهتر قادر بودند تا افراد را بر اساس منشا جغرافیایی‌شان طبقه‌بندی کنند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای کلون‌های چای بر اساس نشانگرهای RAPD

Figure 2. Cluster analysis of tea genotypes based on RAPD markers

جدول ۷. بررسی کارآیی دو سیستم نشانگر مورد استفاده در این مطالعه

Table 7. Evaluation of the efficiency of the two markers system used in this study

سیستم نشانگری Marker system	تعداد آغازگر مورد استفاده No of markers	تعداد باند تکثیر شده Amplified bands	میانگین (PIC) PIC mean	نسبت نشانگرهای پلی مورف (β) Polymorphic bands ratio	EMR = n × β	MI = EMR × PIC	QND	EMI
SSR	20	20	0.66	1	1	0.66	0.75	0.49
RAPD	10	160 (146)	0.45	0.88	11.3	5.1	0.09	0.45

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج ما نشان داد که دو نوع سیستم نشانگری مورد مطالعه دارای ویژگی‌های متفاوتی بودند. به طور کلی با توجه به شاخص‌های اندازه گیری شده نشانگرهای MSG0681، MSE0113، MSG0403 برای تفکیک کلون‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

مناسب‌ترین نشانگرها شناخته شدند. در مجموع نتایج بدست آمده در این تحقیق مبین وجود تنوع ژنتیکی در کلون‌های چای مورد مطالعه می‌باشد. نشانگرهای SSR در این مطالعه سطح پلی‌مورفیسم بسیار بالایی را در کلون‌های چای مورد بررسی نشان دادند و با مقایسه شاخص‌های QND و EMI مشخص شد که نشانگرهای ریزماهواره نسبت به نشانگرهای RAPD برتر هستند اما با مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای نشانگرهای ریزماهواره بهتر قادر بودند تا کلون‌ها را بر اساس منشأ جغرافیایی‌شان طبقه‌بندی کنند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد اراک انجام شده است. نویسندگان مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد اراک برای حمایت مالی و معنوی و اجرای این پژوهش سپاس‌گزاری می‌نمایند.

References

Ahuja P, Gulati A, Singh R et al. (2013) Science of Tea Technology. Scientific Publishers.

Baraket G, Chatti K, Saddoud O et al. (2011) Comparative assessment of SSR and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of fig, *Ficus carica* L., genetic resources in Tunisia. Plant Mol Biol Rep 29**,** 171-184.

Bhardwaj P, Sharma R, Kumar R et al. (2014) SSR marker based DNA fingerprinting and diversity assessment in superior tea germplasm cultivated in Western Himalaya. In: Proc Indian Natn Sci Acad. pp. 157-162.

Boonerjee S, Islam MN, Hoque M et al. (2013) Genetic diversity analysis of eighteen tea (*Camellia sinensis* L.) clones of Bangladesh through RAPD. Plant Tissue Cult Biotechnol 23**,** 189-199.

Chen L, Yamaguchi S (2002) Genetic diversity and phylogeny of tea plant (*Camellia sinensis*) and its related species and varieties in the section Thea genus Camellia determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J Hortic Sci Biotechnol 77**,** 729-732.

Cregan P, Schaap T (2010) Application of DNA Markers for Identification and Breeding of Perennial Fruit Crops I. Plant Breed Rev 76**,** 195.

Hartl DL, Clark AG, Clark AG (1997) Principles of population genetics. Sinauer associates Sunderland.

Heidari S, Marashi H, Farsi M et al. (2009) Assessment of genetic structure and variation of native Berberis populations of Khorasan provinces (Iran) using AFLP markers versus morphological markers. Iran J Biotechnol 7, 101-107.

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

Kordrostami M, Rabiei B, Kumleh H (2016) Association analysis, genetic diversity and haplotyping of rice plants under salt stress using SSR markers linked to *SalTol* and morpho-physiological characteristics. Plant Syst Evol 302**,** 871-890.

www.SID.ir

Lai J-A, Yang W-C, Hsiao J-Y (2001) An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Bot Bul Acad Sin 42, 93-100.

Lynch M, Walsh B (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Sunderland, MA: : Sinauer Associates, Inc., 1998. Pp.

Melchinger A (1999) Genetic diversity and heterosis. The genetics and exploitation of heterosis in crops. Crop Sci Soc Am, Madison, 99-118.

Naghavi MR, Qarayazi B, Hosseini Salekdeh Q (2009) Molecular markers. Tehran University Press.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci 70**,** 3321-3323.

Nili A, Rabiei B, Allahgholipour M et al. (2017) Assessing molecular diversity and genetic relationships among rice (Oryza sativa L.) varieties. Cereal Res 7**,** 33-50.

Poehlman JM (2013) Breeding field crops. Springer Science & Business Media.

Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breed 2**,** 225-238.

Quartz (2016) Annual per capita tea consumption worldwide as of 2016, by leading countries (in pounds). In Statista - The Statistics Portal.

Rezaee E, Mirlohi M, Hassanzadeh A et al. (2016) Factors affecting tea consumption pattern in an urban society in Isfahan, Iran. J Educ Health Promot 5**,** 1-5.

Roy S, Chakraborty B (2009) Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis*) cultivars as revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. Indian J Biotechnol 8, 370-376.

Shannon CE (2001) A mathematical theory of communication. ACM SIGMOBILE Mob Comput Commun Rev 5**,** 3-55.

Sivapalan P, Kulasegaram S, Kathiravetpillai A (1986) Handbook on tea. Tea Research Institute of Sri Lanka.

Tan L-Q, Peng M, Xu L-Y et al. (2015) Fingerprinting 128 Chinese clonal tea cultivars using SSR markers provides new insights into their pedigree relationships. Tree Genet Genomes 11**,** 90.

Taniguchi I (2014) Development of Genomic Resources and Core Collections of Germplasm for Tea Breeding University of Tsukuba.

Varshney RK, Chabane K, Hendre PS et al. (2007) Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. Plant Sci 173**,** 638-649.

Wachira FN, Kamunya S, Karori S et al. (2013) The tea plants: botanical aspects. In: Tea in health and disease prevention. Elsevier. pp. 3-17.

Wang RJ, Gao XF, Kong XR et al. (2016) An efficient identification strategy of clonal tea cultivars using long-core motif SSR markers. Springer Plus 5, 1152.

Weising K, Nybon H, Wolff K et al. (2005) DNA fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications**.** Boca Raton: CRC Press, 472 pp.

Xu Y (2010) Molecular Plant Breeding., CABI Publishing.

Yao M-Z, Ma C-L, Qiao T-T et al. (2012) Diversity distribution and population structure of tea germplasms in China revealed by EST-SSR markers. Tree Genet Genomes 8**,** 205-220.

www.SID.ir

Archive of SID

Zhang DX, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Mol Ecol 12**,** 563-584.

Zhang Y, Zhang X, Chen X et al. (2018) Genetic diversity and structure of tea plant in Qinba area in China by three types of molecular markers. Hereditas 155**,** 22.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir