ارزیابی تنوع ژنتیکی کلون‌های زراعی چای در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی راپید

م. ع. احمدی شاد[۱]، س. ک. کاظمی تبار[۲]، ن. ع. بابائیان جلودار[۳]، م. غلامی[۴] و ح. کاظمی پشت مساری[۵]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۰

چکیده

چای (Camellia sinensis(L.)O.Kuntze) از مهمترین محصول نوشابه‌ای ایران است. اساس ژنتیکی بوته‌های چای کشور از سه توده بذری عمومی (jat) به نامهای Batjan، Rajghur و Dhonjan مشتق شده است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۳۰ کلون زراعی چای با استفاده از ۴۵ نشانگر مولکولی راپید ۱۰ نوکلئوتیدی و ۱۳ صفت مورفولوژیکی و ۴ صفت شیمیائی مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۱۶ نشانگر ۹۶ نوار تولید شد که ۸۹ نوار بین کلون‌های مورد مطالعه چند شکل و ۷ نوار یک شکل بدست آمد و میزان قطعات چند شکل ۹۲/۷۱٪ برآورد شد. اندازه باندها از ۲۵۰ bp تا ۲۵۰۰ bp متغیر بودند. نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرها، نشان داد که تعداد سه گروه اصلی می‌توان تشخیص داد: گروه اول شامل کلون‌های انتخابی داخلی، شوروی برگ ریز، ارقام کلونی سریلانکائی (DN.KEN.3020)، گروه دوم شامل کلون‌های سریلانکائی ۳۰۱۳ و ۳۰۱۹، شوروی برگ پهن، دارجلینگ ۲۷، کلون امیدبخش ۱۰۰ و در گروه سوم رقم کلونی یابوکیتا، دارجلینگ ۲۱، ارقام کلونی آسام، دارجلینگ ۱۳، دارجلینگ ۱۸، تنوع ژنی بین کلون‌ها براساس شاخص "نی" به طور متوسط ۰/۳۴ برآورد شد. با انجام بررسی‌های مورفولوژیکی و شیمیائی، قرار گیری کلون‌ها در دندروگرام براساس نشانگر رپید، مورد تائید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: چای، (Camellia sinensis L.)، تنوع ژنتیکی، راپید

پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۱- کارشناس ارشد اصلاح نباتات سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان
۲- دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- مربی موسسه تحقیقات چای کشور (لاهیجان)
۵- مربی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

چای (*Camelliasinensis(L.)O.Kuntze*) از مهمترین محصولات نوشابه‌ای در ایران است. اساس ژنتیکی محدود چای ایران از سه واریته بذری عمومی (jat) به نام‌های Rajghur، Betjan و Dhonjan مشتق شده است. چای گیاهی دگرگشن بوده و ارقام کلونی آن از تکثیر رویشی ژنوتیپ‌های برتر حاصل می‌شوند (۵ و۴). نشانگرهای مولکولی از قبیل RFLP، AFLP، RAPD، SSR و ... استفاده می‌شوند و اطلاعات ژنتیکی قابل توجهی را در تعدادی از گونه‌ها مهیا کرده‌اند. مزایای نشانگرهای مولکولی این است که کمتر تحت تاثیر فاکتوهای محیطی قرار گرفته و از نظر تعداد نامحدود می‌باشند (۱ و ۳). نشانگرهای راپید که به وسیله واچیرا و همکاران (۱۲) ارائه شد، به‌طور گسترده در تشخیص رقم‌ها و صفات استفاده می‌شود. در گیاه چای این نشانگر جهت بررسی تنوع ژنتیکی، اختلاف داخل و بین گونه‌های زراعی چای استفاده می‌شود (۱۱). این نشانگر به دلیل احتیاج به مقدار کمی DNA، عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت آغازگر، هزینه کم و سرعت تولید و اجرا، امکان بررسی هم‌زمان چندین لوکوس در ژنوم نمونه‌ها، عدم نیاز به کاوشگر و موادرادیواکتیو و غیره جهت بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرد. تکنیک این نشانگر بر مبنای DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهایی با توالی تصادفی در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استوار است. این نشانگر غالباً جهت تشخیص چند شکلی (پلی‌مورفیسم) به عنوان نشانگرهای رده‌بندی در مطالعات جمعیتی در گستره وسیعی از موجودات بکار گرفته شده است. در مطالعه ای تنوع ژنتیکی ملونها (خیارچنبر، خربزه، دستنبو، گرمک و طالبی) در استانهای مرکزی و شمالی کشور با تعداد ۳۰ توده برای ارزیابی مولکولی انتخاب شد و با استفاده از ۱۰ آغازگر راپید مورد بررسی قرار گرفتند (۲). سلوکی و همکاران (۱۰) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی ارقام انگور ۶ ژنوتیپ متعلق به مناطق مختلف سیستان با ۳۱ آغازگر با مارکر مولکولی راپید مورد ارزیابی قرار دادند و در نهایت ارقام مطالعه شده در ۴ گروه اصلی طبقه بندی شدند. بطور کلی هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی کلون‌های زراعی چای در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی راپید بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی:

نمونه‌های برگی از ۳۰ کلون زراعی ایستگاه‌های تحقیقات و خدمات فنی فشالم، لاهیجان، ازبرم و شهید اسلامی جمع‌آوری و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل گردید (جدول ۱).

جدول ۱- شناسنامه کلون‌های چای جهت استخراج DNA

ردیف	کد مربوطه	محل جمع‌آوری نمونه	توضیحات
۱	ف-۱۰۶-۷۷	ایستگاه تحقیقات فشالم (فومن)	کلون انتخابی در جریان آزمایش
۲	ف-۱۰۴-۷۷	//	//
۳	ف-۳۰۵-۷۷	//	//
۴	ف-۲۰۵-۷۷	//	//
۵	ف-۱۰۳-۷۷	//	//
۶	ف-۱۰۲-۷۷	//	//
۷	ل-۳۰۲-۷۸	ایستگاه تحقیقات فجر لاهیجان	//
۸	ل-۲۰۴-۷۸	//	//
۹	ل-۳۰۷-۷۸	//	//
۱۰	ل-۳۰۴-۷۸	//	//
۱۱	ل-۲۰۱-۷۸	//	//
۱۲	ل-۳۰۳-۷۸	//	//
۱۳	ل-۱۰۷-۷۹	//	//
۱۴	ل-۱۰۶-۷۹	//	//
۱۵	ل-۳۰۲-۷۹	//	//
۱۶	رقم KEN	ایستگاه تحقیقات ازبرم (سیاهکل)	ارقام کلونی سریلانکایی
۱۷	رقم DN	//	//
۱۸	رقم ۳۰۲۰	//	//
۱۹	رقم ۳۰۱۳	//	//
۲۰	رقم ۳۰۱۹	//	//
۲۱	رقم یابوکیتا	//	رقم کلونی ژاپنی
۲۲	برگ ریز-۱۰۱	ایستگاه تحقیقات فجر لاهیجان	رقم کلونی شوروی
۲۳	برگ درشت-۱۰۱	//	//
۲۴	دارجلینگ ۱۳	//	کلون‌های ناشناخته دارجلینگ
۲۵	دارجلینگ ۱۸	//	//
۲۶	دارجلینگ ۲۱	//	//
۲۷	دارجلینگ ۲۷	//	//
۲۸	کلون امیدبخش ۱۰۰	//	کلون امید بخش انتخابی
۲۹	A.L.L	ایستگاه تحقیقات شهید اسلامی لاهیجان	گونه‌های آسامی
۳۰	A.D.L	//	//

استخراج DNA:

مقدار ۲ گرم از برگ‌های جوان هر کلون در داخل ازت مایع به خوبی پودر شده سریعاً به داخل لوله آزمایش انتقال داده شدند و مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج پیش گرما داده شده (Tris- ۱۰۰Mm HCl (PH=8.0)، EDTA ۲Mm، ۱/۴ M NaCl، ۱٪ PVP، ۲۰٪ CTAB مرکاپتواتانول ۰/۱٪) به آن اضافه گردید و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شدند. معادل حجم محلول داخل لوله آزمایش (حدوداً ۶۰۰ میکرولیتر) کلروفرم ایزوآمیل (۱: ۲۴) اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰Rd سانتریفیوژ گردید. بعد به آرامی محلول بالایی به لوله آزمایش جدید منتقل

شد و برای دوبار عمل فوق تکرار گردید. مایع بالایی به آرامی جدا و به داخل لوله آزمایش جدیدی انتقال داده شدند و سپس معادل حجم (مقدار ۶۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانل سرد به آرامی به محلول اضافه و مخلوط شد.

کلاف DNA به وسیله میله شیشه‌ای جدا و دوبار با اتانل ۷۰٪ به خوبی شسته و در دمای اتاق خشک گردید. کلاف DNA به داخل لوله آزمایش جدید منتقل و با ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE X ۱ حل شده سپس DNA ژنومی تعیین غلظت گردید. به این صورت که مقدار ۲میکرولیتر DNA ژنومی به همراه ۲ میکرولیتر بافر بارگیری[1] و مقدار ۶ میکرولیتر آب مقطر در کنار شاخص فاژ (لامبدا) (λDNA) با سه مقدار ۲۵ µg، ۵۰ µg، ۱۰۰ µg روی ژل ۰/۸٪ حاوی اتیدیوم بروماید به عنوان ماده رنگ‌آمیزی به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه با ولتاژ 73 ۳V/Cm الکتروفورز شده و باندهای حاصل از طریق دستگاه UV ترانس ایلو میناتور مشاهده گردید. باندهای DNA ژنومی به صورت چشمی با شاخص‌های فاژ لامبدا سنجیده و تعیین غلظت شدند. سپس نمونه‌های DNA به غلظت ۱۰ ng/µl تبدیل شدند.

تکثیر:

در این تحقیق تعداد ۴۵ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفت که تعداد ۱۵ آغازگر تولید ۸-۳ باند پلی‌مورفیک نمودند و یک آغازگر تولید باند مونومورفیک نمود (جدول ۲). بقیه آغازگرها باندی تولید نکردند. متوسط تعداد باند برای هر آغازگر ۶/۳۳ بوده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم µl ۲۵ با محتوی (dNTPs ۲۰۰µM، ۷/۵ پیکومول از هر پرایمر، DNA ژنومی به مقدار ۲۰ µg، یک واحد تک پلیمراز، ۲/۵ µl بافر پی‌سی‌آر، آب دوبار تقطیر، روغن مینرال به مقدار ۲۵ µl) روی دستگاه ترموسایکلر چهل بلوکه تاچژن (Touch gene) مدل اف.تی. جی. ۳۸۴ انگلاند با برنامه حرارتی زیر انجام شد: ۹۴ °C در ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل، ۹۴ °C در ۱ دقیقه ۳۶ °C در ۱ دقیقه، ۷۲°C در ۳ دقیقه، ۷۲ °C در ۵ دقیقه. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم‌بروماید در بافر TBE X ۱ ران شده و ژل‌ها با دستگاه UV ترانس ایلو میناتور مشاهده گردید و سپس با استفاده از دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری گردید. اشکال ۱ و ۲ الگوی باندی آغازگرهای OPV6 و OPM2 را نشان می‌دهند.

آنالیز آماری داده‌ها

بعد از عکس‌برداری ژل‌ها به کمک دستگاه ژل‌داک، با استفاده از نرم‌افزار Photoshop در روی هر ژل برای حضور باند امتیاز یک و عدم حضور باند امتیاز صفر لحاظ شد. بعد از کدبندی، داده‌ها به صورت صفر و یک وارد نرم‌افزار EXCEL شدند. این ماتریس برای همه آغازگرها و کلون‌ها تهیه شد. برای تحلیل نهائی داده‌ها به نرم‌افزار POPGENE 32 منتقل شد و تنوع ژنی براساس شاخص نِی (۸) و فرمول $H=1-\sum P_i$ محاسبه گردید که در این فرمول H و P به ترتیب شاخص تنوع ژنی و فراوانی i اُمین آلل می‌باشد. در این تحقیق از روش یو.پی. جی. ام. ای.[2] برای تجزیه خوشه‌ای و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شد.

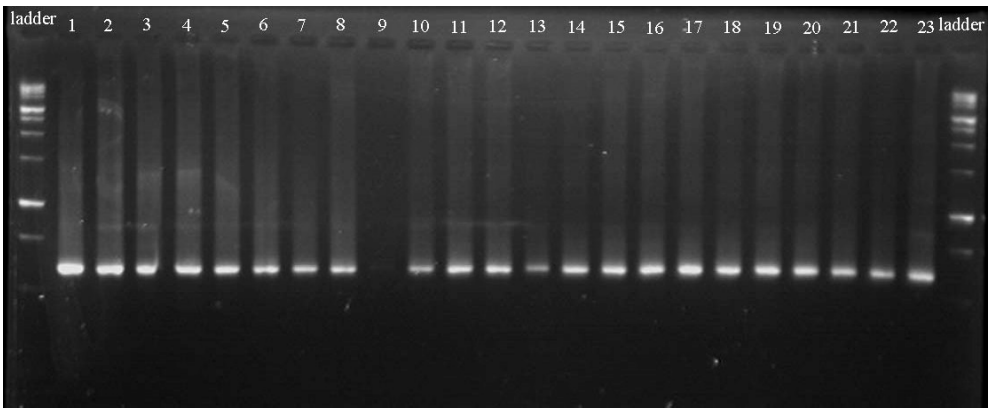
1- Loading Dye

2- UPGMA

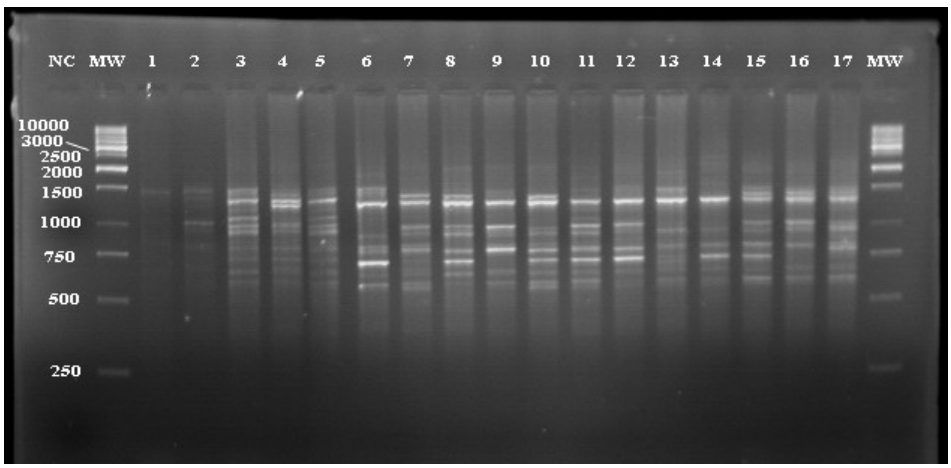
از نرم‌افـزار POPGENE 32 نیـز بـرای آنـالیز آماری و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده گردید.

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایشها

شماره آغازگر	توالی نوکلئوتیدی 5´→3´	شماره آغازگر	توالی نوکلئوتیدی 5´→3´	شماره آغازگر	توالی نوکلئوتیدی 5´→3´
1	TCC GGC TTT C	16	CCG CGT CTT G	32	AAA GCT GCG G
2	CCA GCA TCT A	17	CCT GGG CTT C	33	GTG AGG CGT C
3	GCT GGA AGC G	18	GGG GGG ATT A	34	GTT GCC AGC C
4	ACG CCC AGG T	19	TCC GGG TTT A	35	TCA CGA TGC A
5	AGT CAC TCC C	20	ACC GGG TTT C	36	TCT CGA TGA A
6	ACA ACG CCT C	21	CCC TTG GGG G	37	CGG CCC CTG T
7	TCG GCG ATA G	22	CCC GCG TTC C	38	TGG TCA CTG T
8	AAT GAC GGG G	23	ACA GGG GCG A	39	GGA CTG GAG T
9	CTG GTA TGC C	24	ACA GGG CTG A	40	TGG ACC GGT G
10	CGT CCG TCA G	25	TTT GGG CCC A	41	GGA CCC AAC C
11	CTG GCG GCTG	26	TTT GGG GGG A	42	GGG CTA GGG T
12	TTC CCC CCA G	27	CCG GCC TTA A	43	GAA ACG GGT G
13	TCG GTC ATA G	28	CCG GCC TTA C	44	GAC CGC TTG T
14	ACC CCC CAC T	29	CCG GCC TTA C	45	AAC GCG TCG G
15	GTG ACG TAG G	30	CCG GCC TTA G		



شکل ۱- الگوی باندی آغازگر OPM2 با توالی (َ۳-ACA ACG GGT C-َ۵) در تعداد ۲۳ کلون چای.



شکل ۲- الگوی باندهای پلی‌مورفیک آغازگر OPV6 با توالی (َ۳-ACA ACG GGT C-َ۵) که روی ژل آگاروز ۱/۵٪ در ۱۷ کلون چای مشخص شده است.

نتایج و بحث

از مجموع ۴۵ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی، تعداد ۱۶ آغازگر متناسب با ژنوم کلون‌های چای انتخاب شد. آزمایشات پی. سی. آر. با ۱۶ آغازگر برای ۳۰ کلون زراعی چای انجام گرفت. طبق جدول ۳ تعداد قطعات تکثیر یافته، از یک قطعه در آغازگر OPM2 تا ۸ قطعه در آغازگرهای BIO-04، Sc10-19، Opv12، Sc10-83، Opv2 متغیر بود. متوسط قطعات تکثیر یافته به ازای هر آغازگر از ۱۶ آغازگر فوق برابر با ۶/۳۳ قطعه است. طول قطعات تکثیر یافته در آغازگر های مختلف بین ۲۵۰bp تا ۲۵۰۰bp متغیر بود. به طور کلی تعداد ۹۶ قطعه از مجموع آغازگرهای فوق بدست آمد که ۸۹ قطعه در بین کلون‌های مورد مطالعه چند شکل و ۷ قطعه یک شکل حاصل شد. لذا درصد قطعات چند شکل ۹۲/۷۱٪ برآورد شد. در این تحقیق کلون‌های مورد مطالعه ابتدا براساس منشاء و محل تکثیرو ساختار مورفولوژیکی به ۷ گروه تقسیم شدند، و آنالیز داده‌های مولکولی با استفاده از برنامه نرم افزاری POPGENE 32 جهت مشخص کردن درجه خویشاوندی گروهها از همدیگر نشان داد که دندروگرام جمعیت‌ها در سه گروه اصلی قرار دارند (شکل ۳). با توجه به ساختار مورفولوژیکی بوته‌های چای، غیر از جمعیت ۴ (رقم کلونی یابوکیتا) که به صورت یک کلاستر در کنار جمعیت ۷ (آسام) قرار گرفته، در بقیه موارد ترسیم شاخه‌های دندروگرام مورد انتظار بود، به دلیل اینکه از جمعیت ۱ به سمت جمعیت ۷ برگ‌ها بزرگتر و ساختار رویشی گیاه گسترده‌تر می‌شود، قرارگرفتن جمعیت ۴ در کنار جمعیت ۷ به این دلیل که چون از یک کلون انفرادی بوده، در این موقعیت قرار گرفته است (شکل ۳).

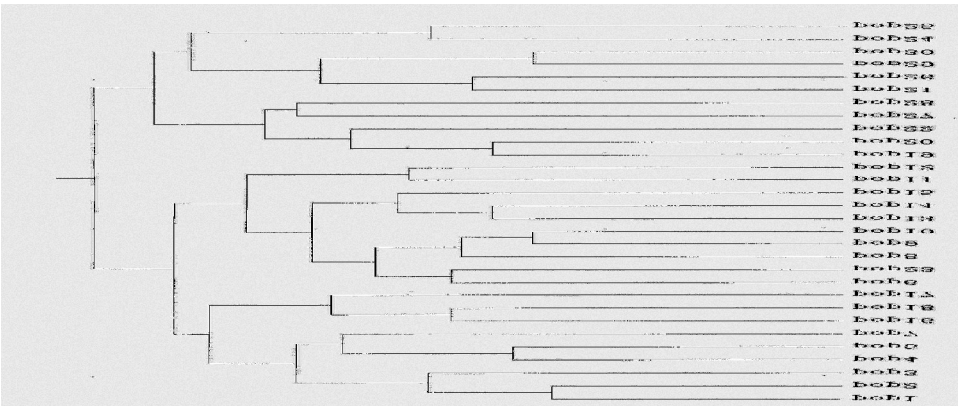
در جمعیت‌های مورد مطالعه غیر از رقم کلونی یابوکیتا که به صورت تک کلون بوده و محاسبه تنوع ژنتیکی در قالب جمعیت در آن مقدور نبوده، در بقیه جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی با استفاده از برنامه نرم‌افزاری POPGENE 32 محاسبه شد. که جمعیت ۲ (کلون‌های انتخابی داخلی ایستگاه تحقیقات دولتی فجر) دارای بیشترین تنوع (۰/۲۴) و کمترین مقدار در ارقام کلونی آسام (۰/۰۵۶) بدست آمد، همچنین بیشترین شباهت ژنتیکی بین دو جمعیت ۱ و ۲ (کلون‌های انتخابی داخلی) بوده و کمترین مقدار آن بین جمعیت ۷ و ۲ (ارقام کلونی آسام و کلون‌های انتخابی داخلی ایستگاه دولتی فجر) بدست آمد. تحقیقات مشابه‌ای توسط یانگ و همکاران (۱۳) انجام شد. آنها تنوع ژنتیکی کم بدست آمده در داخل ارقام کلونی آسام را به دلیل شدت انتخاب و منبع ژنتیکی محدود دانستند. با توجه به قرار گیری رقم کلونی یابوکیتا در کنار جمعیت ۷، در شکل ۳ دندروگرام مجموعه

کلون‌ها به روش یو. پی. جی. ام. ای در بخش مولکولی ترسیم شد. در این دندروگرام کلون‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند.

گروه اول شامل ارقام کلونی انتخابی داخلی (ایستگاه فشالم و لاهیجان)، سه رقم کلونی سریلانکائی (DN، KEN، ۳۰۲۰) و رقم کلونی شوروی برگ ریز (۱۰۱ برگ ریز). گروه دوم شامل دو رقم کلونی سریلانکائی (۳۰۱۳، ۳۰۱۹)، شوروی برگ درشت، دارجلینگ ۲۷، کلون امیدبخش ۱۰۰.

جدول ۳- تعداد قطعات چند شکل، یک شکل، درصد چند شکلی و مجموع قطعات بدست آمده به ازای هر آغازگر

آغازگر	درصد چند شکلی	قطعات یک شکل	قطعات چند شکل	قطعات تکثیر یافته
OPV2	۸۷/۵	۱	۷	۸
BIO-19	۱۰۰	–	۶	۶
BIO-24	۸۰	۱	۴	۵
OPA-12	۱۰۰	–	۷	۷
OPC-17	۱۰۰	–	۶	۶
BIO-04	۷۵	۱	۳	۴
OPV6	۱۰۰	–	۷	۷
P16	۱۰۰	–	۸	۸
Sc10-19	۱۰۰	–	۸	۸
OPV12	۸۷/۵	۱	۷	۸
Sc10-48	۱۰۰	–	۳	۳
Sc10-56	۸۵/۷	۱	۶	۷
Sc10-83	۸۷/۵	۱	۷	۸
Sc10-97	۱۰۰	–	۴	۴
Sc10-57	۱۰۰	–	۶	۶
OPM2	۰	۱	۰	۱



شکل ۳- دندروگرام داده های مولکولی.

گروه سوم شامل رقم کلونی یابوکیتا، دارجلینگ ۲۱، دارجلینگ ۱۸، دارجلینگ ۱۳ و ارقام کلونی آسام (برگ تیره و برگ روشن).

در گروه اول در سطح شباهت بالاتر مشخصاً کلون‌های ۷، ۵، ۴، ۳، ۲ و ۱ در کلاستر و ارقام سریلانکائی (DN، KEN، ۳۰۲۰) در یک کلاستر دیگر قرار گرفتند و نشان می‌دهد که کلون‌های ۱تا ۵ ایستگاه تحقیقات چای فشالم و کلون شماره ۷ (انتخابی داخلی ایستگاه دولتی فجر) و همچنین سه رقم کلونی سریلانکائی از نظر بنیان ژنتیکی بهم شبیه می‌باشند، در این گروه بیشترین شباهت ژنتیکی بین کلون‌ها شماره ۱ و ۲ و کمترین شباهت بین کلون‌های ۱۸ و ۲ وجود دارد و متوسط شباهت ژنتیکی بین کلون‌های این گروه ۰/۷ بدست آمد.

از طرفی کلون‌های شماره ۶ و ۲۳ (شوروی برگ ریز)، ۱۰، ۹، ۸، ۱۲، ۱۱، ۱۵، ۱۴ و ۱۳ در یک کلاستر قرار گرفتند. با توجه به اینکه اکثر ارقام کلونی انتخابی داخل کشور بودند و با توجه به شکل ظاهری رقم کلونی برگ ریز، قرار گرفتن این کلون در این گروه دور از انتظار نبود. در این گروه بیشترین شباهت ژنتیکی بین کلون‌های ۸ با ۹ و ۱۴ با ۱۳ به مقدار ۰/۸۰۲۱ و کمترین مقدار بین کلون‌های ۱۰ با ۲۳ به مقدار ۰/۲۶۰۳ بدست آمد، همچنین متوسط شباهت ژنتیکی در این گروه ۰/۶۵ بدست آمد.

درگروه دوم و در سطح شباهت بالاتر ارقام کلونی سریلانکائی (کلون‌های شماره ۱۹ و ۲۰)، شوروی برگ پهن، دارجلینگ ۲۷ و کلون امیدبخش ۱۰۰ در یک کلاستر قرار گرفتند. بیشترین مقدار شباهت بین کلون‌های ۱۹ با ۲۰ و کمترین مقدار بین کلون‌های ۲۲ با ۲۸ و متوسط شباهت ژنتیکی در این گروه ۰/۷ بدست آمد.

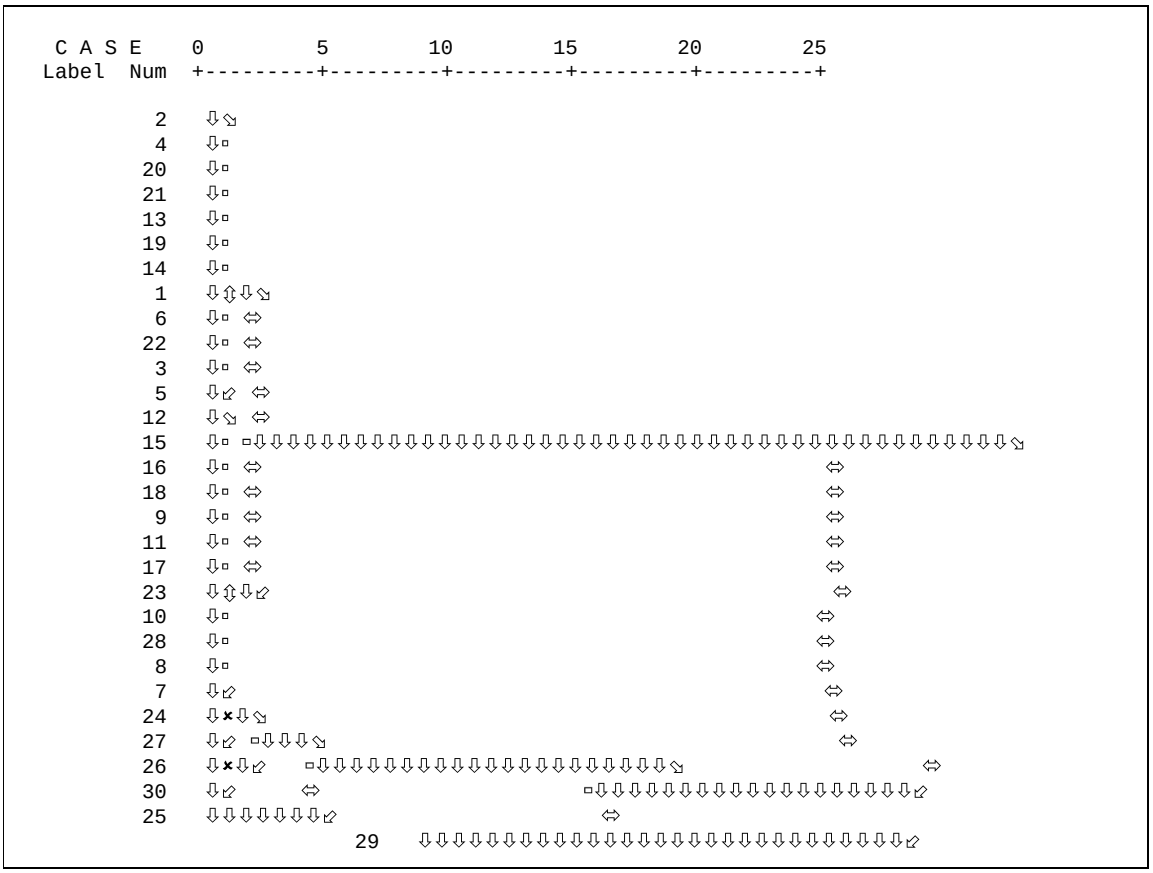
در گروه سوم رقم کلونی یابوکیتا، دارجلینگ ۲۱، ارقام کلونی آسام، دارجلینگ ۱۳، دارجلینگ ۱۸ قرار دارند. بیشترین شباهت ژنتیکی بین کلون‌های ۲۹ با ۳۰ (کلون‌های آسامی) به مقدار ۰/۸۲ و کمترین مقدار بین کلون‌های ۲۴ با ۳۰ به مقدار ۰/۵۹۳۸ و متوسط شباهت ژنتیکی در این گروه ۰/۷ بدست آمد. در این گروه غیر از رقم کلونی یابوکیتا، بقیه ارقام از لحاظ مورفولوژیکی نیز بسیارمشابه هم می‌باشند. ارقام کلونی آسام از جنوب چین به شمال هند انتشار یافته‌اند در این تحقیق نیز دو کلون معرفی شده (آسام) از هند که مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت فقط نماینده قسمت کوچکی از کل تنوع واریته‌های آسام می‌باشد. نتایج تحقیقات براساس نشانگر راپید بیان می‌کند که اختلافات قابل توجهی میان کلون‌های آسام و کلون‌های انتخابی داخلی وجود دارد و ژرم پلاسم کلون‌های انتخابی ایستگاه دولتی فجر می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی مفید باشد. براساس دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای انفرادی کلون‌ها با استفاده از گروه‌بندی به روش یو.پی. جی.ام.ای بکار

بردن اطلاعات بدست آمده از نشانگرهای راپید، در بسیاری از موارد (بیش از ۸۰٪) افراد هر جمعیت در گروه مربوطه قرار گرفتند. در مورد کلون‌های شماره ۱۷، ۱۶، ۱۸ و ۲۱ که در میان گروه‌های دیگر قرار گرفتند بررسی‌های مورفولوژیکی و شیمیائی نیز انجام شد. با انجام بررسی‌های مورفولوژیک (بررسی ۱۳ صفت) کلون‌های ۱۸، ۱۷ و ۱۶ در داخل کلون‌های انتخابی داخلی قرار گرفتند و نشان داد که نشانگرهای مولکولی تحت تاثیر عوامل محیطی نیستند. در این بررسی کلون یابوکیتا همانند کلون‌های داخلی و ارقام کلونی سریلانکائی و شوروی در یک کلاستر قرار گرفتند. که این موضوع انجام بررسی شیمیائی (عصاره آبی، ماده جامد، تانن، کافئین) را لازم دانست تا دلیل قرار گیری این کلون با توجه به شباهت به ارقام داخلی و سریلانکائی، در کنار ارقام کلونی آسام و دارجلینگ مشخص گردد و نتایج شیمیائی نشان داد که این کلون از نظر ترکیبات شیمیائی بیشتر به کلون شماره ۲۹ (آسام برگ روشن) شباهت دارد (شکل ۴) و می‌توان ادعا کرد که نشانگر راپید در تشخیص و تمیز این گیاه بسیار توانمند می‌باشد. نتایج مشابهی توسط واچیرا و همکاران (۱۲) بدست آمد. واچیرا و همکاران (۱۱) در بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه ژنتیکی ۳۸ کلون چای ارقام چینی، آسام، کامبوجی با استفاده از نشانگرهای راپید نشان دادند که ۳۰٪ کل تنوع براساس شاخص تنوع شانون، در بین جمعیت‌ها بوده در حالی که ۷۰٪ در داخل جمعیت‌ها قرار دارد. همچنین نتایج مشابهی توسط کاندانس و گوپارک (۷)، جو آن و همکاران (۶) و پارک یوانگ و همکاران (۹) به ترتیب در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلونی چای کره‌ای و تایوانی وکره‌ای بدست آمد.

با توجه به اینکه در کشت و پرورش چای شرایط اقلیمی یک عامل تعیین کننده در ایران می‌باشد، خصوصیاتی نظیر سازگاری با شرایط محیطی (خصوصاً مقاومت به بیماریهای منطقه‌ای) از اهمیت بالائی برخوردار می‌باشد. لذا باید کلون‌های مطلوب را شناسائی نمود و راجع به خصوصیات و ویژگیهای آنها اطلاعات جامعی بدست آورد تا در صورت لزوم از ژنهای آنها و ارقام وارداتی استفاده گردد.

تیپ ایده آل چای براساس IPGRI Descriptors از نظر مرفولوژیکی دارای برگهای باز قائم یا نیمه قائم بوده و سطح برگ آن مومی یا واکسی است که در تیپهای چینی تعداد شاخساره ها (shoot دو برگ و یک غنچه) بیشتر و وزن آنها کمتر است (۴). در تیپهای آسامی تعداد شاخساره کمتر اما وزن آنها بیشتر است. از نظر بیوشیمیای تیپ ایده آل، تیپی است که دارای دوتا ۵٪ کافئین داشته باشد و از نظر میزان پلی فنولها در دامنه ۲۵- ۱۵ قرار گیرد. براساس بررسهای انجام شده در مرکز تحقیقات چای کشور، کلون امید بخش ۱۰۰ دارای عملکرد و کیفیت برگ سبز بالایی بوده و از نظر چای خشک استحصالی نیز کیفیت بالایی

نسبت به بقیه کلونها دارد که از نظر IPGRI Descriptors تیپ ایده ال می باشد (۴) که این کلون نیز جز کلونها مورد مطالعه در این طرح بوده است. در این تحقیق، درجه بالا پلی‌مورفیسم بدست آمده با آنالیز راپید، می‌تواند در انگشت نگاری و تعیین تنوع ژنتیکی میان کلون‌هایی که از لحاظ مورفولوژیکی به هم نزدیک هستند مفید باشد. در این تحقیق کلون‌های مختلف موجود در ایستگاههای تحقیقات چای کشور مورد آزمون قرار گرفتند و به طور نسبی از همدیگر مجزا شدند و کلون‌های انتخابی داخلی ایستگاه دولتی فجر با دارا بودن تنوع درون گروهی می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی در آینده مفید باشد.



شکل ۴- دندروگرام داده‌های مورفولوژیکی و شیمیائی.

منابع

1. Baghari, A., A. Izadi Darbandi and M.A. Malbobi. 2001. Practices Applications of Plant Biology and Molecular. 232 p.
2. Feyziyan, A. 2004. Gathering of traditional melon clones in north and center of Iran and their Genetic variation Investigation of using morphological and molecular marker of RAPD. M.S thesis in plant breeding. Agriculture faculty of Tarbiat Modares University. 101 p.
3. Ghareyazi, B. 1996. Application DNA markers in plant breeding. 4th Proceeding of the national Conference of Iranian agronomy and plant breeding. Industrial University of Esfahan. 55 p.
4. Jamal Omidi, M. 2000. Determinate relationship and chemotaxonomy investigation of different tea cultivar (*Camellia sinensis*) in Iran. M.S thesis in plant science. Science Faculty of Uromiyh University. 128 p.
5. Hasan Poor, M. 1998. Tea planting and tea technology. Giulan University Press. 130 p.
6. Jou-Ann, L., Y. Wei-Chen and H. Ju-Ying. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Bot. Bull. Acad. Sin., 43: 93-100.
7. Kaunduns, S. and Y. GooPark. 2002. Genetic structure of six Korean tea population as revealed by RAPD-PCR markers. Crop Sci., 42: 594-602.
8. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat., 106: 283-292.
9. Park Young, G., S. Shiv and S. Kaundoun. 2002. Use of the bulked genomic DNA based RAPD methodology to assess the genetic diversity among abandoned Korean tea plantations. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 159-165.
10. Soloki, M., N. Rigi Nejhad, H. Kamalaldini and B. Siahsar. 2005. Investigation of Genetic variation Sistani grape cultivars using RAPD marker. Proceeding of the national Conference on Iranian biotechnology. International Center of Science and Development Technology and Environmental Science. Kerman, 108 p.
11. Wachira, F.N., J. Tanaka and Y. Takada. 2001. Genetic variation and differentiation in tea (*Camellia scinensis* L.) germplasm revealed by RAPD and AFLP. Journal of Horticulture Science and Biotechnology. 76: 557-563.
12. Wachira, F.N., R. Wough, C.A. Hachett and W. Powel. 1994. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia scinensis* L.) using RAPD markers. Genome. 38: 201-210.
13. Young-Goo, P., S.S. Kaundun and A. Zhyvoloup. 2002. Use of the bulked genomic DNA-based RAPD methodology to assess the genetic diversity among abandoned Korean tea plantations. Genetic Resources and Crop Evolution. 49: 159-165.

An Assessment of Genetic Diversity in Cultivated Tea (*Camellia sinensis* L.) Clones in Iran Using RAPD Markers

M.A. Ahmadishad[1], S.K. Kazemitabar[2], N.A. Babaeian Jelodar[3], M. Gholami[4] and H. Kazemi Poshtmasari[5]

Abstract

Tea (*C. sinensis* L.) is the most important beverage crop in Iran and genetic base of current Iranian tea shrubs were achieved from three mass seeds namely: Dhongan, Batjan and Raighur. In this study, genetic diversity of 30 cultivated tea clones were evaluated using 45 RAPD markers and 13 morphological and 4 chemical characters respectively. Sixteen and of 45 markers produced 96 bands that 89 bands among clones were polymorphic and monomorphic respectively (92.71% polymorphic). Bands size was variable between 250-2500 base pair. Three main groups could be recognized from cluster analysis based on markers data: The first group consisted of internal selective clones, narrow Russian leaf and Seri-Lanka clonal cultivar (3020, KEN, DN). The second group consisted of Seri-lanka clonal cultivar (3013, 3019), Blead Russian leaf, Darjileing 27, clon100. The third group consisted of Yaboukita clonal cultivar, Darjileing 21, Assamica clonal cultivar, Darjileing 13 and Darjileing 18. The average gene diversity between clones based on Nei's index is estimated 0.34. The morphological and chemical investigation, placed of clones in denderograme are approved based on RAPD markers.

Keywords: Tea (*Camellia sinensis* L.), Genetic diversity, RAPD

1- M.Sc. of Plant Breeding, Jahad-e-Keshvarzi of Guilan
2- Associate Professor, Sari Agriculture Science and Natural Resource University
3- Professor, Sari Agriculture Science and Natural Resource University
4- Instructor of Lahijan tea Research Institute
5- Instructor of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources