

کاربرد روش PCR-RFLP ژنوم کلروپلاست جهت ارزیابی هاپلوتایپی برخی ژنوتیپ‌های چای ایران

شاهین جهانگیرزاده خیای^{۱*}، صنم صفائی جایی کار^۱

۱- پژوهشگاه چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۹

چکیده

روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) برای ارزیابی و مشخص نمودن روابط هاپلوتایپی و ساختار جمعیتی در ۱۴ ژنوتیپ چای از سه کشور ایران، هند (آسام) و ژاپن به کار رفت. سه آغازگر عمومی کلروپلاست (HK، CS و B1B2) و چهار آنزیم برشی (*BglII* و *PstI*، *AluI*، *HinfI*) در این بررسی استفاده شدند و از ژل آگارز برای تفکیک باندها استفاده شد. آغازگر B1B2 به علت تولید چندین باند در این بررسی قابل بهره‌برداری نبود. همچنین آغازگر CS پس از برش، چندشکلی ایجاد نکرد و فقط برش قطعات حاصل از آغازگر HK و آنزیم *HinfI* حالت چند شکلی نشان داد. جهش‌های مشخص شده توسط ترکیب آغازگر- آنزیم برشی *HinfI*- HK جهش‌های حذف- اضافه در محدوده ۲۰-۵۰ bp بودند که نمونه‌ها را در پنج هاپلوتایپ (H1، H2، H3، H4 و H5) گروه‌بندی نمودند. توزیع نمونه‌ها در گروه‌های هاپلوتایپی با توزیع جغرافیایی همخوانی نداشت و هیچ هاپلوتایپی خاص یک سری نمونه نبود. با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که روش PCR-RFLP روشی مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چای در سطح اندامکی می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Camellia*، رابطه ژنتیکی، PCR، نشانگر مولکولی

Application of PCR-RFLP method of chloroplast genome for haplotype evaluation of some Iranian tea genotypes

Shahin Jahangirzadeh Khiavi^{1*}, Sanam safaei Chaeikar¹

1-Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran;

Received: January: 2022

Accepted: October: 2022

Abstract

The PCR-RFLP method was used to evaluate and determine haplotype relationships and population structure in 14 tea genotypes from three countries: Iran, India (Assam) and Japan. Three universal chloroplast primers (HK, CS and B1B2) and four restriction enzymes (*HinfI*, *AluI*, *PstI* and *BglII*) were used in this study and agarose gel was used to separate the bands. The B1B2 primer led to the production of several bands and thus found not applicable for the purpose of this study. Also, the DT primer produced a monomorphic state after cutting, and only the fragments obtained from the HK primer and *HinfI* enzyme showed a polymorphic state. The mutations identified by the primer-cutting enzyme HK-*HinfI* were deletion-addition mutations in the range of 20-50 bp, which grouped the samples into five haplotypes (H1, H2, H3, H4 and H5). The distribution of samples in haplotype groups did not correspond to the geographical distribution, and there was no specific haplotype of a sample series. According to the results, it can be said that the PCR-RFLP method is a suitable method for investigating the genetic diversity of tea genotypes at the organ level.

Keywords: *Camellia*, Genetic relationship, PCR, Molecular marker

۱- مقدمه

در دو دهه گذشته، کاربرد روش‌های جدید مولکولی در مطالعات بیولوژی در سطح وسیعی گسترش یافته است که از این بین نشانگرهای مولکولی مرتبط به ژنتیک نقش بزرگی در شرح و توصیف تکامل جمعیت‌ها و ساختار جمعیتی داشته‌اند و استفاده از آنها در حال افزایش است. متخصصین ژنتیک جمعیت معمولاً از نشانگرهای سیتوپلاسمی برای برآورد خویشاوندی نسبی داخل و میان جمعیت‌های مورد بررسی استفاده می‌کنند و تعیین نحوه وراثت ژنوم اندامک‌ها که یک عامل مهم تعیین سطح ساختار جغرافیایی در گیاهان است، از نکات حائز اهمیت قبل از هرگونه تلاش در مورد مطالعات مشابه است (Petit and Vendramin, 2007).

ژنوم اندامک‌ها (سیتوپلاسمی) منبع قابل توجهی از نشانگرهای مولکولی می‌باشند. برای مثال، از این نشانگرهای سیتوپلاسمی به‌طور گسترده‌ای در چند سال گذشته برای درک واکاوی مسیرهای مهاجرت پس از عصر یخبندان برای طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله درختان استفاده شده است (Taberlet et al., 1998). با این حال مشخص شده است که DNA میتوکندریایی گیاهان دارای سرعت جانشینی نوکلئوتیدی پایین‌تری از DNA کلروپلاستی می‌باشد (Palmer, 1992)، بنابراین ترجیحاً در گیاهان از DNA کلروپلاستی (به‌طور عمده برای گونه‌های دارای وراثت مادری) برای این‌گونه مطالعات استفاده می‌شود (Desplanque et al., 2000).

نشانگرهای سیتوپلاسمی (بیشتر DNA کلروپلاستی) در بسیاری از مطالعات تکامل نژادی مورد استفاده قرار گرفته است (Samuel et al., 2005). به دلیل توالی DNA در دسترس و همچنین به خاطر حفاظت‌شدگی ژن‌ها در ژنوم کلروپلاستی، طراحی آغازگرهای متعدد عمومی تسهیل گردیده

است (Demesure et al., 1995، Dumolin-Lapegue, 1997 و Grivet et al., 2001) که این موضوع به شدت مطالعات جمعیت و تکامل نژادی را ترویج و تشویق نموده است. از این آغازگرها برای تشخیص تنوع ژنتیکی، نحوه توارث، بررسی‌های فیلوژنی (Grivet et al., 2001)، رابطه جغرافیایی و مسیرهای تکامل گونه‌ها بعد از عصر یخبندان (Hamza, 2005)، در شناسایی دورگه‌ها در ترکیب با نشانگر DNA هسته‌ای (Heinze, 1998) و برای مطالعه گونه‌های نزدیک مرتبط (Hamza et al., 2009) مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

مطالعات زیادی با کاربرد نشانگرهای مولکولی DNA کلروپلاستی صورت گرفته است (Cross et al., 1998، Panda et al., 2003، Tanikawa et al., 2008، Golein et al., 2012، Chen et al., 2012، Khadivi et al., 2012، Khiavi et al., 2013، ivi-khub et al., 2014). با توجه به اینکه نمونه‌ها یا آغازگرهای متفاوت در بررسی‌ها به کار برده شده است، محدودیت امکان مقایسه وجود دارد. اما با این وجود، مشاهده می‌گردد که تعداد هاپلوتایپ‌ها در بررسی‌های مشابه نیز محدود و کم می‌باشد.

چن و همکاران (Chen et al., 2012) با کاربرد روش PCR-RFLP اقدام به تنظیم این روش برای کلروپلاست چای نمودند و بهترین شرایط برای انجام این آزمایش را بیان کردند. همچنین گزارش کردند در شرایط مناسب با کاربرد هفت جفت آغازگر عمومی کلروپلاست و ۱۰ آنزیم برشی ۱۳۵ نوار شناسایی شد که ۹۸ نوار چندشکلی نشان دادند (۷۲/۵۹٪). تفاوت ژنتیکی محاسبه شده بر اساس داده‌های بدست آمده از این آزمایش در محدوده ۰/۷۱ تا ۰/۴۹ گزارش شده است. به‌طور کلی آنها پیشنهاد نمودند که روش PCR-RFLP برای آنالیز cpDNA کلروپلاست روشی سریع و سودمند می‌باشد.

مطالعات فیلوژنتیکی می‌باشد.

این تحقیق به منظور بررسی سودمندی تجزیه و تحلیل جایگاه‌های برش DNA کلروپلاستی تکثیر شده توسط واکنش PCR برای اندازه‌گیری قدرت جداسازی و تفکیک این مولکول DNA در بین ژنوتیپ‌های چای صورت گرفته است تا از این راه کمکی به مدیریت و برنامه‌ریزی جهت حفاظت از ژرم پلاسم‌های ارزشمند چای ایران باشد.

۲- مواد و روش‌ها:

برگ‌های جوان کامل شده ۱۴ نمونه چای شامل ۱۰ ژنوتیپ ایرانی، سه کلون تجاری وارداتی از ژاپن و یک رقم آسامی به عنوان نمونه‌های بین‌المللی جمع‌آوری شدند (جدول ۱) و استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ‌گی به روش دلاپورتا و همکاران (Delaporta *et al.*, 1983) با اندکی تغییر صورت گرفت. جهت تکثیر DNA استخراج شده سه جفت آغازگر عمومی کلروپلاست (HK، B1B2، DT) (Grivet *et al.* 2001) استفاده شد. جدول ۲ شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، اندازه قطعات تکثیر شده و کیفیت تکثیر با کاربرد آغازگرهای عمومی DNA کلروپلاستی در چای را نشان می‌دهد. جدول ۳ نسبت و مواد بکار رفته در واکنش PCR را نشان می‌دهد. شرایط دمایی عبارت بود از واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال برای آغازگرها بر اساس جدول ۲ به مدت ۱ دقیقه و مرحله توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بر اساس جدول ۲ از لحاظ زمان بندی و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه توسعه نهایی انجام شد.

چن و همکاران (Chen *et al.*, 2012) با کاربرد روش PCR-RFLP تنوع ژنتیکی ژنوم کلروپلاست در ۳۰ رقم چای منطقه سی‌چوآن کشور چین را بررسی نمودند و بیان کردند این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی DNA کلروپلاست چای مناسب است. جهانگیرزاده و فلک‌رو (۱۳۹۹) در مطالعه تنوع DNA کلروپلاستی و روابط ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های چای با استفاده از روش PCR-RFLP با کاربرد ۵ جفت آغازگر عمومی کلروپلاست حدود ۶۹۸۰ bp از ژنوم کلروپلاست را مورد پژوهش قرار دادند. که کاربرد چهار نوع آنزیم برشی توانست نمونه‌های مورد بررسی را در هفت هاپلوتایپ قرار دهد. خیاوی و همکاران (Khiavi *et al.*, 2021) در تجزیه و تحلیل PCR-RFLP ژنوم کلروپلاست در برخی از ژنوتیپ‌های چای کشت شده در ایران از ۵ جفت آغازگر عمومی کلروپلاست استفاده نمودند و حدود ۴۰۷۰ bp از ژنوم کلروپلاست را تکثیر و بررسی کردند، کاربرد سه نوع آنزیم برشی توانست نمونه‌های مورد بررسی را در شش هاپلوتایپ قرار دهد. خیاوی و همکاران (Khiavi *et al.*, 2013) در بررسی هاپلوتایپی ۲۶ نمونه سیب بومی ایران از منطقه آذربایجان و دو رقم تجاری و دو رقم پایه پاکوتاه از روش CAPs با کاربرد ۳ جفت آغازگر عمومی کلروپلاست حدود ۴۱۳٪ از ژنوم کلروپلاست را مورد پژوهش قرار دادند. در بررسی آنها نمونه‌ها در هشت هاپلوتایپ قرار گرفتند که تمام این هاپلوتایپ‌ها نتیجه جهش‌های حذف و اضافه بودند.

تورکچ و همکاران (Turkec *et al.*, 2006) با استفاده از نشانگرهای cpSCAR ارقام گیلاس را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که آنالیز DNA کلروپلاست روش خوبی برای طبقه‌بندی ارقام گیلاس می‌باشد و با مقایسه نتایج خود با دیگران گزارش نمودند که cpSCAR روش خوبی برای

جدول ۱. نمونه‌های چای مورد بررسی، منشا، محل نمونه‌گیری و گروه‌های هاپلوتایپی مشخص شده

کد نمونه	منشا	نام نمونه	محل نمونه برداری	هاپلوتایپ
S1	آسام	assam	پژوهشکده چای	H3
S2	ژاپن	Owase	»	H4
S3	ژاپن	Sayama Kaori	»	H5
S4	ژاپن	Yabokita	»	H5
S5	منطقه غرب چایکاری	468	»	H2
S6	»	440	»	H2
S7	»	444	»	H2
S8	»	100	»	H2
S9	»	455	»	H3
S10	»	548	»	H1
S11	»	591	»	H1
S12	»	578	»	H1
S13	»	791	»	H3
S14	»	703	»	H3

جدول ۲. آغازگرهای عمومی کلروپلاست، توالی آنها، شرایط PCR، اندازه قطعه تکثیر شده و کیفیت تکثیر، به کار رفته در نمونه‌های چای در این مطالعه

آغازگر DNA کلروپلاس	(توالی 3'-5')	شرایط PCR		اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	کیفیت تکثیر*
		دمای اتصال (C°)	مدت زمان بست (.min)		
CS	F: GGTTCTGAATCCCTCTCTCTC R: GGTCGTGACCAAGAAACCAC	56	2:30	1340	+
HK	F: ACGGGAATTGAACCCGCGCA R: CCGACTAGTTCCGGGTTCGA	61	2	1880	+
B1B2	F: TGCCTTGGTATCGTGTTTCATAC R: CYTGTCTTYTTGTAGTTGGAT	53	3	-	NA

*: + تکثیر مناسب و na تکثیر نامناسب

جدول ۳. مواد تشکیل دهنده اجزای PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

مواد واکنش	غلظت نهایی	یک واکنش ۲۵ میکرولیتری
DNA (25ng/μl)	75ng	3μL
PCR بافر (2X)	1X	12.5μL
آغازگر رفت (10μM)	Mμ0.6	1.5μL
آغازگر برگشت (10μM)	Mμ0.6	1.5μL
آب	-	6.5μL

جدول ۴. مواد مورد استفاده در برش محصول PCR و مقدار مورد نیاز آنها

آنزیم	مقدار آنزیم	آب	بافر	مقدار محصول PCR	دمای فعال سازی (C°)	دمای غیر فعال سازی (C°)
<i>AluI</i>	1-2 μl	18μl	2 μl	10μl	37	65
<i>HinfI</i>	1-2 μl	18μl	2 μl	10μl	37	65
<i>BglI</i>	1-2 μl	18μl	2 μl	10μl	37	-
<i>PstI</i>	0.5 μl	16.3 μl	2 μl	10μl	37	65

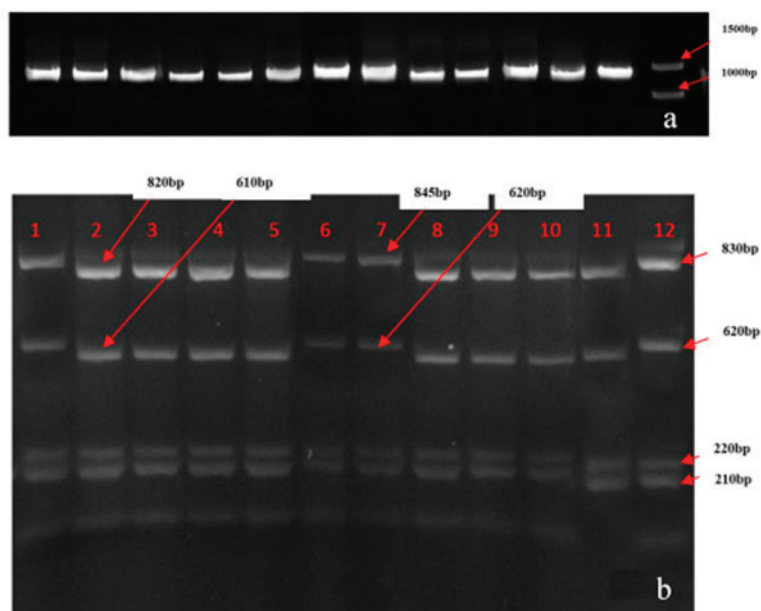
از اختصاص حروف به تمام باندها هر نمونه دارای کدهایی بر اساس باندهای مشاهده شده درون خود گردید و بر این اساس نمونه‌های دارای کدهای مشابه در یک گروه هاپلوتایپی مشابه قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

چندشکلی در مناطق غیرکدشونده DNA کلروپلاست در ۱۴ نمونه از بوته‌های چای موجود در ژرم پلاسما پژوهشکده چای لاهیجان مورد مطالعه قرار گرفت. قطعه تکثیر شده توسط آغازگر HK و قطعات حاصل از هضم ترکیب HK/*HinfI* در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. از سه آغازگری که برای بررسی ژنوم کلروپلاست چای به کار رفتند، فقط دو آغازگر HK و CS دارای تکثیر خوبی بودند و آغازگر B1B2 تولید چند باند نمود. از آنجا که هر کدام از این آغازگرها برای تکثیر ناحیه خاصی از ژنوم کلروپلاست‌اند و باید فقط یک قطعه تولید کنند، فقط دو آغازگر HK و CS برای بررسی با آنزیم برشی انتخاب شدند. اندازه قطعات تکثیر شده دو آغازگر HK و CS به ترتیب

فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط آنزیم‌های محدودگر *AluI*، *HinfI*، *BglI* و *PstI* به مدت نه ساعت در دماهای مشخص طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آنها برش داده شدند. محصولات برش داده شده تا زمان الکتروفورز، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اجزای واکنش برای هر آنزیم در جدول ۴ آمده است.

بعد از پایان مدت زمان برش و هضم، محصول واکنش هضم با ترکیب ۱۰ میکرولیتر محلول واکنش ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۲ میکرولیتر ماده ژل رد برای بررسی قطعات برش خورده روی ژل آگارز ۳ درصد در شرایط ۷۰ ولت به مدت ۴ ساعت الکتروفورز شد و از دو سائز مارکر kb ۱ و ۵۰ bp تولیدی شرکت فرمنتاز برای تخمین طول قطعات استفاده گردید و عکس‌برداری زیر نور ماوراء بنفش در دستگاه ژل داک صورت گرفت. تعیین هاپلوتایپ‌ها به روش خیای و همکاران (Khiavi et al., 2013) انجام شد و به حالات متفاوت مشاهده شده، یک حرف خاص اختصاص داده شد. بعد



شکل ۱- قطعات تکثیر شده توسط آغازگر HK (a) و الگوی برش ترکیب آغازگر- آنزیم برشی HK/HinFI (b) در ژل آگارز

از ترکیب دو قطعه تکثیر شده توسط آغازگرها و چهار آنزیم برشی (*Bgl*I، *Hinf*I، *Alu*I، *Pst*I) از HK/*Hin*FI تنها ترکیب HK/*Hin*- حالت چند شکلی نشان داد. این ترکیب HK/*Hin*- در دو جایگاه تولید چند شکلی نمود که جایگاه اول دارای دو حالت و جایگاه دوم سه حالت چند شکلی نشان داد. سایر ترکیبات ممکن نیز تولید حالت چندشکلی نکردند. تمام این حالات چند شکلی مشاهده شده، به دلیل جهش‌های حذف و اضافه در محدوده ۵۰-۲۰ bp بودند. مشابه همین نتایج توسط خیاوی و فلک‌رو (۱۳۹۹)، خیاوی و همکاران (*Khi*-) (avi *et al.*, 2021) در گیاه چای و خیاوی و همکاران (2013) (*Khiavi et al.*، جهانگیرزاده خیاوی و همکاران (1397)، تورکچ و همکاران (*Turkec et al.*, 2006) و موهانتی و همکاران (*Mohanty et al.*, 2001) در گیاهان غیرچای گزارش شده است. در مقایسه تحقیق حاضر با مطالعه چن و همکاران (Chen *et al.*, 2012) بر روی گیاه چای تمام آغازگرها مشابه می‌باشند که از نظر قدرت تکثیر تشابه کامل مشاهده می‌گردد. در بخش مقایسه قطعات هضم شده

bp ۱۸۸۰ و bp ۱۳۴۰ بود که در مجموع ۳۲۲۰ bp از کل ژنوم کلروپلاست گیاه چای را تکثیر نمود. اندازه های تخمین زده شده با اندازه‌های گزارش شده توسط منابع دیگر در گیاهان متفاوت (*Ahadi Dolatsara et al.*, 2015; *Khiavi et al.*, 2013; *Mohanty et al.*, 2001; *Grivet et al.*, 2001) تفاوت جزئی نشان می‌دهد که این موضوع حفاظت‌شدگی بالای ژنوم کلروپلاست را تایید می‌کند. نتایج مشابهی در مورد قدرت تکثیر آغازگرها در بررسی DNA کلروپلاست توسط احدی دولت‌سرا و همکاران (*Ahadi Dolat-sara et al.*, 2015) در گیاه *Artemisia sp*، خیاوی و همکاران (*Khiavi et al.*, 2013)، جهانگیرزاده خیاوی و همکاران (۱۳۹۷) در گیاه *Malus spp* و موهانتی و همکاران (*Mohanty et al.*, 2001) در گیاه *Prunus avium* مشاهده شده بود. با توجه به نتایج به دست آمده، دو آغازگری که قدرت تکثیر داشتند برای هضم با آنزیم برشی انتخاب گردیدند. هیچ حالت چند شکلی در محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل با استفاده از هر یک از جفت آغازگرهای مورد آزمایش مشاهده نشد.

نیز برخی ترکیبات هضمی مشابه‌اند اما تفاوت‌هایی دیده می‌شود و اکثراً تعداد قطعات چندشکل به دست آمده توسط آنها بیشتر است که دلیل آن تنوع بالاتر به کار برده شده توسط مطالعه چن و همکاران (Chen *et al.*, 2012) است. زیرا آنها تنوع را در سطح رقم بررسی نموده‌اند و کشور چین به عنوان یکی از غنی‌ترین مخازن ژنتیکی گیاه چای در جهان می‌باشد. اما بررسی حاضر، تنوع را در سطح ژنوتیپ مورد بررسی قرار داده و از آنجایی که منشا تمام ژرم پلاسما چای‌های زیر کشت در ایران محدود به واردات آن می‌باشد، این موضوع کاملاً قابل قبول است.

این حالت‌های چندشکلی مشاهده شده در هر دو باند به صورت ترکیبی با یکدیگر نمونه‌ها را در پنج گروه هاپلوتایپی تقسیم نمود. کد هاپلوتایپی BB در هیچ نمونه‌ای مشاهده نگردید. هاپلوتایپ H2 با کد هاپلوتایپی AB با پوشش ۴ نمونه دارای بیشترین فراوانی و بزرگترین هاپلوتایپ شناسایی شده بود که تنها نمونه‌های منطقه غرب چایکاری را تحت پوشش داشت. هاپلوتایپ H5 با کد هاپلوتایپی CB نیز کوچکترین هاپلوتایپ شناسایی شده بود که فقط شامل نمونه اویس (Owase) وارداتی از ژاپن بود. سه هاپلوتایپ باقی مانده دارای تعداد اعضا برابر با یکدیگر (سه نمونه) بودند. نکته مهم در رابطه با این هاپلوتایپ‌ها قرارگیری دو نمونه باقی‌مانده ژاپنی و تک نمونه آسام در یک هاپلوتایپ (H4) بود. تنها تفاوت مابین این هاپلوتایپ و هاپلوتایپ H5 رخ دادن یک جهش بود که نشان از ارتباط نزدیک این نمونه‌ها با یکدیگر است.

تعداد زیاد هاپلوتایپ شناسایی شده در این نمونه‌ها در ابتدا ممکن است دارای مشکل به نظر بیاید اما با توجه به آنکه نمونه‌های وارداتی هر کدام یک کلون مجزا می‌باشند در این رابطه هیچ گونه نکته مبهمی وجود ندارد. از سوی دیگر در مطالعات

چن و همکاران (Chen *et al.*, 2012) که تعداد ۳۰ نمونه را مورد بررسی قرار دادند تعداد بسیار زیادی حالت ممکن برای قطعات شناسایی کردند و در نهایت توانست ۲۶ هاپلوتایپ شناسایی نمایند و تقریباً هر هاپلوتایپ شناسایی شده دارای یک عضو بود. در بررسی حاضر نیز تعداد حالت ممکن برای شناسایی هاپلوتایپ‌ها شش مورد است که نمونه‌ها در نهایت در پنج هاپلوتایپ قرار گرفتند. خیاوی و همکاران (Khiavi *et al.*, 2013) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی کلروپلاست سیب با کاربرد ۳۰ نمونه توانستند هشت هاپلوتایپ را شناسایی کنند. در مطالعه دیگری جهانگیرزاده خیاوی و همکاران (۱۳۹۷) تنوع ژنتیکی کلروپلاست سیب را با کاربرد ۶۴ نمونه بررسی نمودند و توانستند شش هاپلوتایپ را شناسایی کنند که تمام موارد ذکر شده در بالا تاییدی بر تعداد هاپلوتایپ شناسایی شده در این تحقیق می‌باشد.

به طور کلی با توجه به ساختار هاپلوتایپی به دست آمده از ترکیب آغازگر- آنزیم برشی HK/HinFI مشخص گردید که بوته‌های چای بررسی شده دارای رابطه نزدیک ژنتیکی بوده و تقریباً نمونه‌های جمع‌آوری شده در ایران رابطه والدی نزدیکی با یکدیگر دارند که این نتیجه با نتایج بدست آمده در بررسی‌های مولکولی که از ژنوم هسته‌ای و صفات مورفولوژی استفاده نموده‌اند که در آنها اعلام شده است که رابطه بالایی بین نمونه‌های چای وجود دارد (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸؛ فلک‌رو و همکاران، ۱۴۰۱، Falakro & Khiavi, 2020) هم خوانی دارد.

۴- نتیجه گیری کلی

ژنوتیپ‌ها و ارقام بومی گیاهان مختلف ژرم پلاسما‌های ارزشمندی برای هر کشور می‌باشند که باید همواره در جهت حفظ آنها تلاش نمود؛ زیرا این گیاهان با شرایط متفاوتی سازگاری داشته و توانسته‌اند

بسیار حفاظت شده تهیه شده‌اند و نواحی بین ژنی را تکثیر می‌کنند این گونه مطالعات تسهیل شده است. به طور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که مطالعه گوناگونی DNA برای بررسی رابطه مادری ارقام و ژنوتیپ‌ها و بررسی مهاجرت ژنوتیپ‌ها مفید می‌باشد. در این ارتباط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (PCR-RFLP) برای مشخص نمودن تفاوت‌های هاپلوتایپی بین نمونه‌ها یک روش بسیار مناسب می‌باشد که به راحتی هاپلوتایپ‌ها را مشخص و قابل شناسایی می‌نماید. البته برای افزایش دقت تعیین هاپلوتایپ‌ها کاربرد آنزیم‌های برشی متفاوت یا تکثیر قطعات متفاوت نیز تاثیر زیادی دارند که بهتر است جهت تکمیل نمودن اطلاعات تا حد ممکن از تکنیک توالی‌یابی نیز استفاده نمود تا اطلاعات جامع‌تری به دست آید.

به بقای خود ادامه دهند. بنابراین شناخت مسیرهای تکاملی و روابط ژنتیکی آنها دارای اهمیت بالایی می‌باشد. یکی از راه‌های آسان و سریع بدست آوردن این اطلاعات، بررسی روابط ژنوم‌های سیتوپلاسمی (میتوکندری و کلروپلاست) است. با توجه به اینکه در DNA میتوکندریایی گیاهان تغییرات نوکلئوتیدی با سرعت پایین‌تری نسبت به دی.ان.ا. کلروپلاستی رخ می‌دهد (Palmer, 1992)، به همین دلیل ترجیحاً دی.ان.ا. کلروپلاستی در گیاهان (اکثراً برای گونه‌های دارای وراثت مادری) استفاده می‌شود (Desp- lanque et al., 2000). البته مطالعات محدودی نیز با کاربرد مولکول دی.ان.ا. میتوکندریایی صورت گرفته است که به عنوان مثال می‌توان به مطالعات انجام شده توسط (Desp- Dumolin-Lapegue et al. 1998 و lanque et al. 2000 اشاره نمود. امروزه با طراحی آغازگرهای عمومی کلروپلاست که از روی نواحی

تضاد و تعارض منافع

نویسنده هرگونه تعارض و تضاد منافع اعم از تجاری و غیرتجاری و شخصی را که در ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم با اثر منتشرشده است رد می‌نماید.

منابع

- خیاوی، ش. ج. و فلک‌رو، ک. (۱۳۹۹). مطالعه تنوع DNA کلروپلاستی و روابط ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های چای. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۷(۳)، ۲۶۴-۲۷۸.
- خیاوی، ش. ج. و فلک‌رو، ک.، چایکار، ص. ص.، رمزی، س. و کهنه الف. (۱۳۹۸). کاربرد نشانگرهای مورفولوژی و ISSR جهت شناسایی برخی ژنوتیپ‌های چای. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۶(۴)، ۱۳۱-۱۴۷.
- خیاوی، ش. ج.، زمانی، ذ.، فتاحی، م. ر. و عاشورپور، م. (۱۳۹۷). مقایسه تنوع DNA کلروپلاستی برخی ژنوتیپ‌های سیب ایرانی، ارقام تجاری و برخی پایه‌های متداول. پژوهش‌های ژنتیک گیاهی، ۵(۱)، ۷۷-۸۶.
- فلک‌رو، ک.، خیاوی، ش. ج.، غلامی، م. و پورعزیزیان، س. (۱۴۰۱). نشانگرهای RAPD وسیله‌ای برای مشخص کردن روابط ژنتیکی گیاه چای در ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۵(۱)، ۴۲-۵۴.
- 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. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 45 (4): 401-415 (In Farsi).
- Chen, S. X., Qi, G. N., Li, H., Shan, H. L., & 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]. *African Journal of Biotechnology*, 11(33), 8181-8188.
- Chen, S., Qi, G., Li, H., Zou, Y., & Shan, H. (2012). PCR-RFLP analysis of cpDNA in tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) in Sichuan of China. *Journal of Agricultural Science*, 4(5), 25.
- Cros, J., Combes, M. C., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon, S., Charrier, A., & Lashermes, P. (1998). Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(1), 109-117.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.
- Demesure, B., Sodzi, N., & Petit, R. J. (1995). A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular ecology*, 4(1), 129-134.
- Desplanque, B., Viard, F., Bernard, J., Forcioli, D., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., & Van Dijk, H. (2000). The linkage disequilibrium between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Molecular Ecology*, 9(2), 141-154.
- Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M. H., & Petit, R. J. (1997). An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular ecology*, 6(4), 393-397.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M. H., & Petit, R. J. (1998). Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10), 1321-1331.
- Falakro, K., & Khiavi, S. J. (2020). Assessment of genetic diversity and relationships among tea genotypes in Iran based on RAPD and ISSR markers. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 3(2), 209-220.
- Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M., & Golmohammadi, M. (2012). Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known *Citrus* genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. *Scientia horticulturae*, 148, 147-153.
- Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G. G., & Petit, R. J. (2001). Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*, 1(4), 345-349.
- Hamza, N. B. (2005). *Population genetic analysis of European and African willows (Salix spp.) using nuclear microsatellite and chloroplast markers* (Doctoral dissertation, Ph. D thesis, University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria).
- Hamza, N. B., Heinze, B., Gloessl, J., & Arnold, C. (2009). Chloroplast DNA identification of eight closely related European *Salix* species. *Austrian Journal of Forest Science*, 126(3), 175-193.
- Heinze, B. (1998). PCR-based chloroplast DNA assays for the identification of native *Populus nigra*

- and introduced poplar hybrids in Europe. *Forest Genetics*, 5(1), 31-38.
- Khadivi-Khub, A., Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Zamani, Z., Ahadi, A. and Aliyoun Nazari, S. (2014). Nuclear and chloroplast DNA variety and phylogeny of Iranian apples (*Malus domestica*), *Plant Systematics and Evolution*. 1;300(8):1803-17.
- Khiavi Sh.J., Z. Zamani, M. Mardi and M. Fatahi Moghdam. (2013). Evaluation of Chloroplast relationship between some apple genotype from Azerbaijan of Iran and their comparison with other local genotypes, cultivars and rootstocks. *African Journal of Agricultural Research*, 8(1): 106-112.
- Khiavi, S. J., Falakro, K., & Chaeikar, S. S. (2021). PCR-RFLP analyses of chloroplast DNA in some cultivated tea (*Camellia* sp.) genotypes. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 4(1), 25-36.
- Mohanty, A., Martin, J. P., & Aguinagalde, I. (2001). Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(1), 112-117.
- Palmer, J. D. (1992). Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. In *Molecular systematics of plants* (pp. 36-49). Springer, Boston, MA.
- Panda, S., Martín, J. P., & Aguinagalde, I. (2003). Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(5), 489-495.
- Petit, R. J., & Vendramin, G. G. (2007). Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction. *Phylogeography of southern European refugia*, 23-97.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., WUST-SAUCY, A. G., & COSSON, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4), 453-464.
- Tanikawa, N., Onozaki, T., Nakayama, M., & Shibata, M. (2008). PCR-RFLP analysis of chloroplast DNA variations in the atpI-atpH spacer region of the genus *Camellia*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(4), 408-417.
- Turkec, A., Sayar, M., & Heinze, B. (2006). Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(8), 1635-1641.