پژوهش در علوم باغبانی
جلد۱ شماره ۱ بهار و تابستان ۱۴۰۱ (ص۷۲-۵۷)

Journal of Reserch in Horticultural Science
Vol. 1, No.1 spring and summer 2022 (57-72)

تارنمای مجله: https://rhsj.areeo.ac.ir

خصوصیات مورفولوژیک و نشانگر ISSR ، ابزاری برای مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه چای در ایران

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[1*]، کلثوم چراغی[1]، رضا آزادی گنبد[2]

۱-پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران
۲-سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

چای (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) یکی از مهم‌ترین محصولات منطقه شمال ایران است که بسیاری از بوته‌های آن در معرض از بین رفتن قرار دارند، بنابراین داشتن اطلاعات درباره ژنتیک آن برای طراحی برنامه‌های اصلاحی با اهداف خاص کمک شایانی است. در این بررسی نشانگرهای مورفولوژی و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ درختچه چای از سه منطقه غرب، مرکز و شرق چای‌کاری مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از ۲۱ ویژگی مورفولوژی نشان داد که دامنه تشابه میان نمونه‌های چای مورد بررسی محدود است. در تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها در سطح تفاوت ۰/۸۶ به سه گروه تقسیم شدند گروه اصلی تشکیل شده گروه دوم (B) بود که ۵۷ درصد نمونه‌ها را در خود جای داد. با کاربرد ۷ آغازگر ISSR ۶۰ باند ایجاد شد که ۵۲ باند حالت چندشکلی نشان دادند. حداکثر و حداقل محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای تمام آغازگرها به‌ترتیب ۰/۴۹ و ۰/۴۴ بود. بر اساس داده‌های ISSR دامنه تشابه در محدوده ۰/۳۱-۰/۸۷ به‌دست آمد. در تجزیه کلاستر، نمونه‌ها در سطح تشابه ۰/۵۴ به دو گروه تقسیم شدند که گروه دوم بزرگ‌ترین گروه تشکیل شده با پوشش ۶۶/۸۵ درصد نمونه‌ها بود. از این نتایج می‌توان استنباط کرد که این صفات و آغازگرها تفاوت‌های ژنتیکی را بسیار خوب تشخیص می‌دهند. نتایج تحقیق بیان نمود که ژنوتیپ‌های چای ایران از آن‌جایی که اکثرا به‌صورت بذری تکثیر شده‌اند دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند.

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

Morphological characteristics and ISSR markers, tools for studying the genetic diversity of tea plant in Iran

Shahin Jahangirzadeh Khiavi[1*], Kolsoom Cheraghi [1], Reza Azadi Gonabad [2]

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

Abstract

Tea (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze) is one of the most important products in the northern of Iran, many of them are endangered, so having information about their genetics to design breeding programs for special purposes is a great help. In this study, morphological and ISSR markers were used to evaluate the genetic diversity of 28 tea plants from east, center and west of tea culturing regions. The use of 21 morphological traits showed narrow range of similarity between the studied tea samples. The samples were divided into three groups at a difference of 0.86. The main group formed was the second group (B), which contained 57% of the samples. Application of 7 ISSR primers produced 60 bands, of which 52 bands showed polymorphism. The maximum and minimum polymorphic information content (PIC) for all primers were 0.49 and 0.44, respectively. Based on ISSR data, the similarity ranges were in the ranges of 0.31 to 0.87. In cluster analysis, the samples were divided into two groups at the similarity level of 0.54, with the second group being the largest group with coverage of 66.85% of the total samples. From these results it can be inferred that this series of traits and primers can detect genetic differences very well. The results of study showed that Iranian tea genotypes have a high genetic diversity since they are mostly propagated by seeds.

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

* نویسنده مسئول: shjahangirzadeh@gmail.com

۱- مقدمه:

چای (Camellia *sinensis* (L.) O. Kuntze، 2n = 2x = 30) یکی از محبوب‌ترین نوشیدنی‌های غیرالکلی در سراسر جهان است و به‌دلیل طعم با طراوت، رایحه جذاب، خصوصیات درمانی و خواص محرک ملایم آن تقریباً توسط ۷۰ درصد از مردم جهان مصرف می‌شود (Karak and Bhagat, 2010). چای یک محصول مهم درختی است که در بیش از ۵۲ کشور آسیا ، آفریقا و آمریکای جنوبی رشد کرده است (Karunarathna *et al.,* 2018، Wambulwa et al., 2017). چای یک گیاه چند ساله همیشه سبز چوبی است و بر اساس گزارش موجود، بومی استان‌های یونان و سیچوان در چین و قسمت شمالی میانمار است (Wight, 1959).

اهمیت استفاده از منابع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی برای افزایش پتانسیل ژنتیکی محصول به‌خوبی شناخته شده است. بسیاری از روش‌های ارزیابی ژرمپلاسم، مانند مورفولوژی، بیوشیمی، نشانگرهای مولکولی و ارزیابی حسی، برای ارزیابی منابع ژرم‌پلاسم چای استفاده شده است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸؛ Chaeikar *et al.,* 2020؛ Falakro and Khiavi, ؛Chen and Zhou, 2005 ؛Khiavai *et al.,* 2020 ؛Feng *et al.,* 2014 ؛2020 ؛Wambulwa *et al.,* 2016 ؛Li *et al.,* 2016). از فنوتیپ می‌توان به‌عنوان یک استاندارد خوب برای ارزیابی ژرم‌پلاسم چای یاد کرد، زیرا این روش صرفاً براساس صفات مورفولوژیکی برای تجزیه و تحلیل ارزیابی تنوع ژنتیکی است(Gunasekare, 2007). اخیراً ثابت شده است که استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از موثرترین روش‌ها برای شناسایی انواع مختلف چای است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸؛ Chen *et al.,* ؛Chen and Yamaguchi, 2005 ؛Kafkas *et al.,* 2009 ؛Fang *et al.,* 2012 ؛2012 Young-Goo *et al.*, 2002).

چای گونه‌ای دگرگرده‌افشان است و ژنوتیپ‌های برتر منتخب به صورت رویشی تکثیر می‌شوند و ارقام کلون معرفی می‌شوند (Fang *et al.,* 2012؛ Lai *et al.*, 2001؛ Oh *et al.*, 2008). شناسایی کلون‌ها به‌طور سنتی بر اساس توصیفات مورفولوژیکی مانند شکل گیاه، عرض ساقه، شکل برگ، نوع برگ جوان و شکل میوه است(Korir *et al.,* 2013؛ Lai *et al.*, 2001). بااین‌حال، مانند بسیاری از محصولات دگرگشن، چای بسیار هتروزیگوت است و بیشتر توصیف‌نامه‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن تغییرات مداوم و قابلیت انعطاف‌پذیری بالا را نشان می‌دهند (Gai *et al.*, 2019؛ Jeong and Park, 2013). کورير و همکاران(Korir *et al.,* 2013) گزارش داده‌اند که صفات مورفولوژیکی با موانعی مانند تأثیر محیط بر بیان صفات، فعل و انفعالات اپیستاتیک[1]، و اثرات پلیوتروپیک[2] در میان دیگران با وجود ارزش و مزایای آنها همراه است. اما بااین‌وجود استفاده از این گروه از نشانگرها در میان گیاهان متفاوت خصوصا چای کاربرد داشته و در مطالعات زیادی استفاده شده است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸؛ Chen *et al*., 2005؛ Piyasun-dara *et al.,* 2008؛ Rajanna *et al.,* 2011). در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده چای از منطقه غرب مازندران جهانگیرزاده و همکاران (۱۳۹۶) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی دامنه تشابه بین نمونه‌های مورد بررسی را از ۰/۲۰ الی ۰/۶۰ گزارش نمودند. بر اساس نتایج بدست آمده در خوشه‌بندی نمونه‌ها آنها گزارش کردند که گیاه چای در منطقه شرق چایکاری (منطقه غرب مازندران) دارای تفاوت ژنتیکی پایینی می‌باشد. خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) با تجزیه و تحلیل ۲۱ ویژگی

1. Epistatic
2. Pleiotropic

مورفولوژیکی در ژنوتیپ‌ها و کلون‌های چای نشان دادند که تنوع موروفولوژیکی میان نمونه‌های چای مورد بررسی محدود است و دامنه تشابه باریکی برای آنها محاسبه کردند. در تجزیه خوشه‌ای در سطح تفاوت ۶/۶، نمونه‌ها به شش گروه تقسیم شدند گروه اصلی تشکیل شده گروه ششم بود که ۸۸ درصد نمونه‌ها را در خود جای داده بود. نتایج آزمون PCA در خصوص ویژگی‌های مورفولوژیکی نشان داد که پنج مولفه اصلی اول ۵/۲۱ درصد از واریانس کل را نشان می‌دهند.

نشانگرهای مولکولی به‌علت آن‌که کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند و به تعداد بسیارزیادی وجود دارند، نیز به شدت مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه‌بر این، امکان مشاهده مستقیم ژنوم و در نتیجه از بین بردن کاستی‌های ذاتی مشاهده فنوتیپ را فراهم می‌کنند (Lai *et al.,* 2001). در مطالعات پیشین، تنوع ژنتیکی، تبعیض و تمایز ژرم‌پلاسم‌های چای با استفاده از نشانگرهای مختلف DNA مانند (RELP)[1]، (Matsumoto *et al.,* 2004) (RAPD)[2] (Falakro and Khiavi, 2020، Kaundun *et al.,* 2000، Roy and Chakraborty, 2009)، (AFLP)[3]، (Kafkas *et al.,* 2009) (ISSR)[4] (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸، Falakro and Khiavi, 2020، Roy and Chakraborty, 2009)، (SRAP)[5] (Khiavi *et al.,* 2020)، (SCot)[6] (Chaeikar *et al.*, 2020)، (SSR)[7] (Wambulwa *et al.*, 2016 و (SNP)[8] (Yang *et al.*, 2016) ارزیابی شده است.

خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای در ایران از نشانگر مولکولی ISSR استفاده کردند و میزان چند شکلی را ۷۸/۲۶ درصدگزارش نمودند. بر اساس همین داده‌ها محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در دامنه ۰/۴۳ تا ۰/۵۰ بدست آمد. محدوه تشابه نیز ۰/۲۸ تا ۹۳/گزارش شد. در تجزیه کلاستر نمونه‌ها در سطح تشابه ۰/۵۵ به چهار گروه تقسیم شدند که گروه چهارم بزرگترین گروه تشکیل شده با پوشش ۶۶/۶۶ درصد کل نمونه‌ها بود. یائو و همکاران (Young-Goo *et al.*, 2002) تنوع ژنتیکی بین رقم‌های کشت شده در کشورهای چین، ژاپن و کنیا را با کاربرد نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که حداقل و حداکثر میزان تشابه میان نمونه‌های این کشورها به‌ترتیب حدود ۰/۱۶ تا ۰/۵۴ است. شاخص‌های تنوع ژنتیکی نی و شانون گزارش شده توسط آنها نیز ۰/۲۲ و ۰/۳۵ بود. با توجه به شاخص GST (۰/۲۰) محاسبه شده میزان تنوع درون جمعیتی بالایی توسط این محققان گزارش شده است. در مطالعه دیگری، در انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌های چای توسط نشانگرهای ISSR و RAPD میزان پلی‌مورفیسم به‌ترتیب ۸۸/۵۴ و ۷۷/۷۷ درصد بود. بر اساس نمودار حاصل از داده‌ها بر اساس ضریب ژنتیکی Nei و الگوریتم UPGMA نمونه‌های مورد بررسی در سه خوشه (فرم چینی، فرم آسامی و فرم مخلوط) گروه‌بندی شدند. میزان تنوع ژنتیکی (HT)، تنوع درون جمعیت (HS) و تنوع بین جمعیت (Gst) به‌ترتیب ۰/۳۸، ۰/۲۷ و ۰/۲۵ گزارش شد. جریان ژنی (Nm) به‌دست آمده نیز نشان می‌دهد که تغییرات ژنتیکی کمی مابین جمعیت‌ها رخ داده است (Roy and Chakraborty, 2009).

در ایران، پژوهشکده چای بوته‌های مطلوب و برتر از نظر ویژگی‌های ظاهری را از سطح باغ‌های چای جمع‌آوری نموده و در سه کلکسیون بومی و یک کلکسیون ارقام خارجی آنها را نگهداری می‌کند. خصوصیات ریخت‌شناسی این گیاهان و همچنین روابط ژنتیکی آنها به‌طور وسیعی مورد

1-Restriction Fragment Length Polymorphism
2-Random Amplification of Polymorphic DNA
3- Amplified fragment length polymorphism
4- Inter-Simple Sequence Repeat
5- Sequence-Related Amplified Polymorphism
6- Start Codon Targeted Polymorphism
7-Simple sequence repeat
8-Single-nucleotide polymorphism

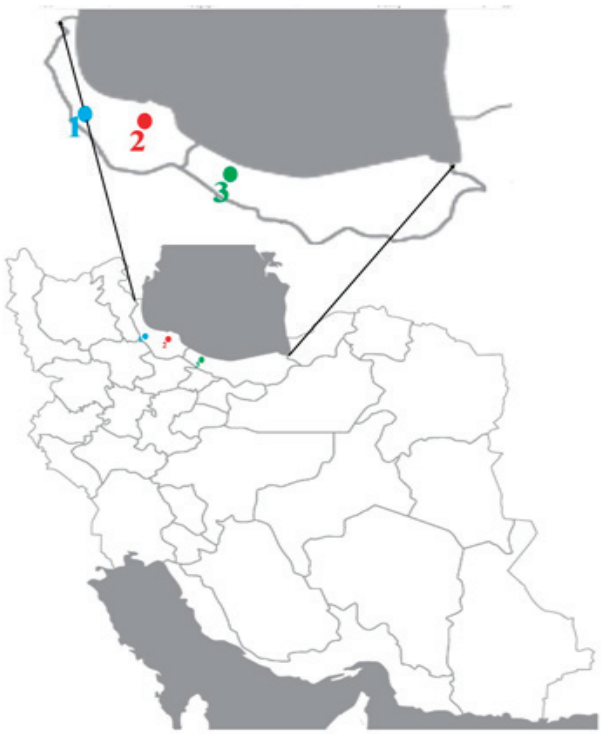
مطالعه قرار نگرفته است و اطلاعات در رابطه با آنها بسیار محدود است. البته مطالعات محدودی در زمینه بررسی روابط ژنتیکی این گیاهان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی و مولکولی صورت گرفته است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸، Chaeikar *et al.*, 2020، Falakro and Khiavi, 2020، Khiavi *et al.*, 2020). بااین‌حال، تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم چای ایران کافی نیست زیرا با در گذشته گیاه چای از طریق جنسی تکثیر می‌شده است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸) و خصوصا با توجه به ویژگی خودناسازگاری موجود در این گیاه (Chen *et al.*, 2012) بررسی تنها ژرم‌پلاسم انتخابی نمی‌تواند کافی باشد زیرا آنکه جمعیت محدود را شامل می‌شود.

دراین مطالعه ۲۸ ژنوتیپ چای ایرانی با استفاده از ۲۱ صفت مورفولوژی و هفت آغازگر ISSR برای ارزیابی و افزایش دانش در رابطه با تنوع ژنتیکی توجه به و ساختار جمعیتی چای ایران؛ و برآورد تمایز و منبع تغییرات ژنتیکی در میان جمعیت‌های موجود مورد بررسی شدند. فرضیه این است که نتایج مطالعه حاضر برای دستیابی به درک عمیق‌تر از تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و تمایز ژرم‌پلاسم چای برای هدایت گزینش موثر، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی چای در ایران مفید خواهد بود.

۲ – مواد و روش‌ها:

۲-۱ مواد گیاهی:

در این پژوهش تعداد ۲۸ ژنوتیپ چای از سهمنطقه غرب چایکاری (فشالم رشت) (۹ نمونه)، شرق چایکاری (نشتارود) (۹ نمونه) و مرکز چایکاری (لاهیجان) (۱۰ نمونه) (شکل ۱) به‌عنوان بخشی از ژرم‌پلاسم چای مورد بررسی قرار گرفت. جدول۱ اطلاعات مواد گیاهی تحقیق را نشان می‌دهد.



شکل ۱. مناطق جمع آوری نمونه‌های مورد بررسی (شماره ۱ غرب (فشالم) شماره ۲ مرکز (لاهیجان) و شماره ۳ شرق (نشتارود)

جدول ۱. نمونه‌های چای بکار رفته در بررسی

کد نمونه*	محل جمع‌آوری	نام علمی نمونه‌ها	کد نمونه*	محل جمع‌آوری	نام علمی نمونه‌ها
G1	غرب	*Camellia sinensis*	G15	مرکز	*Camellia sinensis*
G2	غرب	*Camellia sinensis*	G16	مرکز	*Camellia sinensis*
G3	غرب	*Camellia sinensis*	G17	مرکز	*Camellia sinensis*
G4	غرب	*Camellia sinensis*	G18	مرکز	*Camellia sinensis*
G5	غرب	*Camellia sinensis*	G19	مرکز	*Camellia sinensis*
G6	غرب	*Camellia sinensis*	G20	شرق	*Camellia sinensis*
G7	غرب	*Camellia sinensis*	G21	شرق	*Camellia sinensis*
G8	غرب	*Camellia sinensis*	G22	شرق	*Camellia sinensis*
G9	غرب	*Camellia sinensis*	G23	شرق	*Camellia sinensis*
G10	مرکز	*Camellia sinensis*	G24	شرق	*Camellia sinensis*
G11	مرکز	*Camellia sinensis*	G25	شرق	*Camellia sinensis*
G12	مرکز	*Camellia sinensis*	G26	شرق	*Camellia sinensis*
G13	مرکز	*Camellia sinensis*	G27	شرق	*Camellia sinensis*
G14	مرکز	*Camellia sinensis*	G28	شرق	*Camellia sinensis*

۲-۲- آنالیز مورفولوژی:

ارزیابی صفات بر اساس توصیف نامه مخصوص گیاه چای معرفی شده موسسه بین‌المللی مخازن ژنتیکی گیاهان (International Plant Genetic Re-sources Institute, 2000) انجام شد. حذف تاثیر سال این مطالعه در دو سال متوالی و در هر سال با سه تکرار در هر مرتبه نمونه‌گیری انجام گرفت. که در صورت وجود حالت موردنظر در گروه‌بندی‌ها بسته به صفات از اعداد ۱ الی ۹، و در صورت عدم وجود حالت موردنظر از عدد صفر برای نمره‌دهی استفاده شد. همچنین در یادداشت‌برداری‌ها اگر صفتی فقط دارای

جدول ۲ صفات مورفولوژیکی مورد بررسی

ردیف	صفات	ردیف	صفات
۱	طول میان گره (میلی‌متر)	۱۲	طول به عرض برگ بالغ
۲	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رشد)	۱۳	طول برگ بالغ (میلی‌متر)
۳	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رکود)	۱۴	عرض برگ بالغ (میلی‌متر)
۴	رنگ برگ نابالغ	۱۵	زاویه برگ
۵	رنگ برگ بالغ	۱۶	رگه بندی
٦	شکل برگ	۱۷	طرز قرار گیری برگ روی گیاه
۷	سطح بالایی برگ	۱۸	واکسی بودن برگ
۸	شکل انتهای (نوک برگ)	۱۹	رنگی بودن برگچه
۹	عادت رشد انتهای برگ (نوک برگ)	۲۰	طول دمبرگ برگ بالغ (میلی‌متر)
۱۰	شکل پایه برگ	۲۱	رنگ شاخه جوان
۱۱	حاشیه برگ		

دو حالت حضور یا عدم حضور بود از عدد یک برای حالت مشاهده ویژگی و از صفر به‌عنوان عدم حضور ویژگی موردنظر استفاده و ثبت شد. داده‌های حاصل برای بررسی ابتدا توسط نرم‌افزار NTSYS-pc, v. 2.02 و ضریب YBAR استانداردسازی شده و سپس توسط همین نرم‌افزار ماتریس تشابه بر اساس ضریب فاصله اقلیدسی محاسبه گردید. جهت طراحی کلاستر بر اساس ماتریس تشابه از الگوریتم UPGMA در نرم‌افزار NTSYS-pc, v. 2.02 استفاده شد. صفات مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده است.

۲-۳- آنالیز مولکولی (ISSR):

نمونه‌های برگی گیاه چای از سرشاخه‌های جوان بوته چای بدون علائم ظاهری ناشی از عوامل بیماری‌زا و فیزیولوژیک از مناطق مورد بررسی جمع‌آوری شد و به‌وسیله یخ خشک در سریع‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه ژنتیک پژوهشکده چای منتقل گردید و در فریزر ۸۰ - درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. برای استخراج DNA از روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) با اندکی تغییر استفاده شد. برای 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. تعداد ۷ آغازگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای ISSR به‌کار رفته در جدول ۳ آورده شده است.

برای اجرای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ترکیب مواد در داخل هر واکنش شامل DNA الگو ۵۰ نانوگرم، بافر(X۱۰)PCR به میزان ۱/۲۵ µl میکرولیتر، کلرید منیزیم۲میلی‌مولار، از هر dNTP به میزان۰/۲میلی‌مولار، آنزیم Taq پلیمراز به میزان ۱ واحد و ۰/۷۵ میکرومولار از آغازگر بود که در نهایت توسط آب مقطر به حجم ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرها نیز به‌صورت زیر تنظیم شد: ابتدا محلول واکنش به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس این محلول وارد مرحله دوم گردید که این مرحله به صورت ۳۵ چرخه و

جدول ۳- توالی و اطلاعات آماری آغازگرهای به‌کار رفته مورد استفاده در مطالعه

شماره آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل قطعات	تعداد قطعات چندشکلی	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چندشکلی
P1	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	۸	۶	۷۵	۰/۴۴
P2	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	۷	۶	۸۵/۷۱	۰/۴۹
P3	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۹
P4	CTCTCTCTCTCTCTCTTG	۸	۷	۸۷/۵۰	۰/۴۶
P5	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳	۰/۴۷
P6	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۶
P7	ACACACACACACACACC	۹	۷	۷۷/۷۸	۰/۴۷
جمع		۶۰	۵۲	۸۶/۶۷	۰/۴۹
میانگین		۸/۵۷	۷/۴۳		

شرایط به این صورت تنظیم شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سی ثانیه بود و در نهایت برای تکثیر و گسترش نهایی محلول واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت هفت دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler استفاده شد.

محصولات تکثیر شده به نسبت ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۲ میکرولیتر ژل رد[1] (Biotium, USA) در ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه تفکیک شدند و زیر نور UV توسط دستگاه ژل داک از ژل حاصل عکس‌برداری شد. از دوسایز مارکر kb1 و bp ۵۰ برای تخمین طول قطعات تکثیر شده استفاده شد. باندهای چندشکل غیرمبهم و دارای وضوح بالا در ژل آگارز آغازگرها بر اساس وجود و عدم وجود به صورت صفر و یک نمره دهی شدند. باندهای نامشخص و دارای وضوح کم که نشانه عدم تکثیر مطلوب به دلایل متفاوت (مانند عدم اتصال صحیح آغازگر، یا رقابت جایگاه‌های اتصال آغازگر و ...) است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸) و همچنین باندهای مونومورف در این نمره‌دهی قرار نگرفتند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)[2] بر اساس رابطه (PICi=2fi(1-fi که برای نشانگرهای غالب توصیه شده است، با استفاده از نرم افزار اکسل محاسبه شد. در این رابطه fi فراوانی قطعه نشانگر iام هنگام وجود و (1-fi) فراوانی قطعه نشانگر iام در حالت عدم وجود باند است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸). بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آنها به نرم افزار Ntsys ماتریس ضریب تشابه SM تشکیل شد و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها با الگوریتم UPGMA صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث:

۳- ۱-آنالیز مورفولوژی:

مطالعه مقایسه‌ای روی ۲۸ نمونه گیاه چای انتخاب شده از سه منطقه شرق، مرکز و غرب چایکاری ایران با استفاده از ۲۱ صفت مورفولوژی (کمی و کیفی) تنوع کمی را نشان داد. با توجه به نتایج چن و همکاران (Chen *et al.,* 2005) استفاده از خصوصیات مربوط به برگ و ساقه به دلیل داشتن اختلاف معنی‌دار برای مطالعات تنوع ژنتیکی در گیاه چای با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی کافی است. ایشان (Chen *et al.,* 2005) همچنین، گزارش کردند خصوصیات مربوط به میوه به‌دلیل معنی‌دار نبودن اختلافات برای بررسی مناسب نیست بنابراین در بررسی پیش رو لحاظ نشده‌اند. ماتریس تفاوت (فاصله) دوگانه میان نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله اقلیدسی محاسبه شد که این جدول (جدول آورده نشده است) میزان تفاوت کمی را مابین نمونه‌های مورد بررسی نشان داد (۰/۱۶ تا ۱/۴۰) در مطالعات پیشین بر روی ژرم‌پلاسم چای دامنه تفاوت مورفولوژی محدودی گزارش شده است (خیاوی و همکاران ۱۳۹۶، خیاوی و همکاران ۱۳۹۶، Rajanna *et al.,* 2011).

خیاوی و همکاران (۱۳۹۶) اقدام به مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه چای در منطقه مرکزی چایکاری ایران نموده‌اند و دامنه تفاوت میان نمونه‌ها را بر اساس ضریب اقلیدسی بسیار محدودتر از دامنه محاسبه شده در بررسی حاضر گزارش کردند ایشان کمینه و بیشینه میزان تفاوت را به‌ترتیب ۰/۱۹ و ۱/۷۴ به‌دست آوردند که دلیل عمده آن می‌تواند به محدود بودن منطقه نمونه‌برداری و همچنین تعداد کمتر صفات بررسی شده در بررسی آنها باز می‌گردد. خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی دیگری با استفاده از

1. Gelred
2. Polymorphic Information Content (PIC)

صفات مورفولوژی و نشانگر ISSR تنوع گیاهان چای ثبت شده در ژرم‌پلاسم پژوهشکده چای را بررسی نمودند و نتایج آنها نشان داد که تنوع موروفولوژیکی مابین نمونه‌های چای مورد بررسی محدود است و دامنه تشابه باریکی برای آنها محاسبه شد.

بر اساس این نتایج که بر روی بوته‌های چای موجود در ایران مطالعه شده است و نتایج حاصل شده از بررسی پیش رو می‌توان بیان کرد میزان دامنه تفاوت به‌دست آمده در مجموعه مورد بررسی قابل پذیرش است. دلایل متنوعی برای باریک بودن میزان تفاوت به‌دست آمده قابل ذکر است که مهمترین دلیل، وارد شدن گیاه چای در گذشته است به‌طوری که منشا تمام گیاهان چای موجود در ژرم‌پلاسم گیاه چای ایران نتیجه تکثیر بذری حاصل از گرده افشانی آزاد سه توده اولیه است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸). در کشور ترکیه که مانند کشور ایران گیاه چای وارداتی است، در مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه چای با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP نیز دامنه تشابه بالایی گزارش شده است (Kafkas et al., 2009). از طرف دیگر از آنجایی‌که در ایران تکثیر گیاه چای در گذشته به‌صورت بذری بوده است و دانهال‌هایی که دارای ویژگی‌های مناسب‌تر برای کشت در محل اصلی بودند مانند شروع به رشد اول فصل زود هنگام یا وارد شدن به رکود دیر هنگام در پایان فصل رشد، طول میانگره طویل‌تر، اندازه برگ درشت‌تر توسط انسان انتخاب شده‌اند و همچنین با توجه به محدود بودن تنوع ژنتیکی گیاهان وارد شده عموما کاهش تنوع ژنتیکی مشاهد می‌شود (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸) که این موارد به عنوان کاهش هتروزیگوتی (H) شناخته می‌شود (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸).

برای دستیابی به بهترین الگوریتم و ضریب تفاوت جهت محاسبه میزان تفاوت بین نمونه‌های مورد بررسی و همچنین طراحی کلاستر ضریب کوفنتیک محاسبه شد. این ضریب نشان می‌دهد که چه میزان از اطلاعات اولیه یا ماتریس ورودی توانسته است به دندروگرام منتقل شود. در واقع یک نوع همبستگی بین ماتریس ورودی و ماتریس خروجی را نشان می‌دهد. در این مطالعه به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های مورفولوژی، ضریب‌های CORR، DIST و ECLID محاسبه شد و هم‌چنین برای رسم دندروگرام از الگوریتم UPGMA استفاده شد. برای هر یک از دندروگرام‌های حاصل ضریب کوفنتیک محاسبه شد. بر این اساس، ضریب تفاوت ECLID، بهترین ضریب و الگوریتم UPGMA به‌عنوان بهترین الگوریتم خوشه‌بندی با ضریب کوفنتیک ۰/۶۵ انتخاب شد.

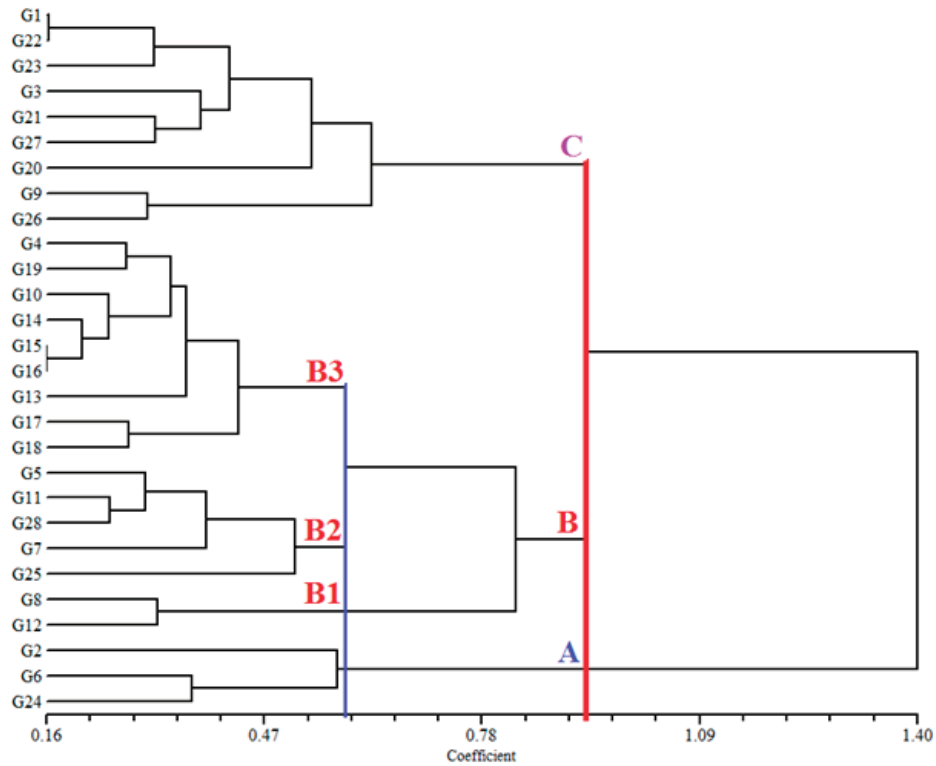
بر اساس داده‌های مورفولوژی و ضریب فاصله اقلیدسی و الگوریتم UPGMA نمونه‌ها به نحوی که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در سطح تفاوت ۰/۸۶ نمونه‌ها به سه گروه اصلی قابل تفکیک بودند. گروه اول شامل سه نمونه G2 و G6 از منطقه غرب چایکاری و نمونه G۲۴ از منطقه شرق چایکاری بود. گروه دوم که بزرگترین گروه قابل تشکیل بود و ۱۶ نمونه مورد بررسی (حدود ۵۷ درصد کل نمونه‌ها) را در بر گرفت. توزیع نمونه‌ها در این گروه با توزیع جغرافیایی هم‌خوانی نداشت که این مورد تأیید کننده منشا واحد برای گیاهان چای تحت کشت است. این گروه در حد فاصله ۰/۵۴ به سه زیر گروه تقسیم شد. زیر گروه اول دارای ۲ عضو (G8 و G12) بود که به‌ترتیب متعلق به مناطق غرب و مرکز بودند. زیر گروه دوم تشکیل شده دارای پنج عضو (G5، G7، G11، G25 و G28) از تمام مناطق نمونه‌گیری بود. زیر گروه سوم نیز دارای نه عضو بود که یک عضو (G4) از منطقه غرب و هشت عضو باقی‌مانده (G10، G13، G14، G15، G16، G17، G18 و G19) از منطقه مرکز بودند. گروه سوم اصلی تشکیل شده

بر اساس داده‌های مورفولوژی دارای چهار عضو از منطقه شرق چایکاری و دو عضو از منطقه مرکز چایکاری بود. همانطور که مشخص است گروه اصلی دوم را می‌توان به‌عنوان گروه اصلی این تحقیق در نظر گرفت. جدا شدن دو گروه A و C از سایر نمونه‌ها با این دلیل که به‌دلیل تلاقی آزاد و شرایط جغرافیایی و محیطی موثر بر برخی ویژگی‌های مورفولوژی می‌توانند توجیه شود.

با توجه به عدم همخوانی توزیع نمونه‌ها در نمودار بدست آمده (شکل ۲) با توجه به مناطق جغرافیایی در تجزیه خوشه‌ای مشاهد می‌گردد که نتایج مشابهی توسط خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای در ایران گزارش شده است. آنها نیز در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ بوته چای در تجزیه خوشه‌ای تعداد ۶ خوشه را شناسایی کردند که تنها یک خوشه حدود ۸۸ درصد کل نمونه‌ها را شامل می‌شد و آن را به عنوان خوشه اصلی گزارش کردند. در مطالعات قبلی بررسی تنوع توسط نشانگرهای مورفولوژیکی این نوع الگوریتم خوشه‌بندی مورد تایید قرار گرفته است (Rajanna *et al.*, 2011) و به طور کلی این نحوه گروه‌بندی با دانش موجود در مورد مورفولوژی و سیستماتیک گونه‌های *Camellia* سازگار است (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸، Balasaravanan *et al.*, 2003؛ Rajanna *et al.*, 2011؛ Wright, 1962). با توجه با نتایج مطالعات گذشته و نتایج تحقیق حاضر این موضوع که می‌توان بر اساس داده‌های مورفولوژیک اقدام به شناسایی نمونه‌ها کرد قابل تایید است. البته به‌منظور افزایش دقت و بالابردن کارایی این شناسایی استفاده از نشانگرهای مولکولی توصیه می‌شود.

۳-۲-آنالیز ISSR:

از میان ۲۰ آغازگر ISSR آزمون شده روی چهار نمونه انتخاب تصادفی، تعداد ۷ آغازگر که دارای بهترین تکثیر بودند انتخاب شدند. جدول ۳ اطلاعات توالی آغازگرهای به‌کار رفته، تعداد نوارهای تکثیری،



شکل ۲. نمودار ۲۸ نمونه چای مورد بررسی با استفاده از نشانگرهای موفولوژی به روش UPGMA.

تعداد نوارهای چندشکلی، درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی را نشان می‌دهد. تعداد کل نوارهای تکثیر شده برای آغازگرهای به‌کار رفته ۶۰ نوار بود که از این تعداد، ۵۲ نوار حالت چندشکلی[1] و ۸ نوار حالت یک‌شکلی[2] داشتند. دامنه تغییر تعداد نوارها به‌ترتیب از هفت نوار تا ۱۲ نوار برای آغازگرهای P2 و P5 ثبت شد. متوسط نوار به ازای هر آغازگر برابر ۸/۵۷ بود. تعداد نوارهای چندشکل حاصل از بررسی ژنوم توسط نشانگرهای ISSR در دامنه ۶ تا ۱۰ با متوسط ۷/۴۳ بود. با توجه به تعداد نوارهای کل و نوارهای چند شکل، درصد چندشکلی نیز محاسبه شد که این میزان در دامنه ۷۵ درصد برای آغازگر P1، و تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای P3 و P6 بود. درصد چندشکلی کل نیز برابر۸۶/۶۷ درصد محاسبه شد. با مقایسه درصدهای حاصل با مطالعات مشابه که روی ژنوتیپ‌های گونه *C. Sinensis* صورت گرفته است، مشاهده می‌شود که اکثر درصدها تقریبا در همین دامنه قرار دارند. Yao و همکاران (Yao *et al.*, 2008) تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی ۴۸ رقم از چای چین، ژاپن و کنیا را توسط نشانگر ISSR برای انتخاب والدین جهت برنامه‌های اصلاحی، بررسی کردند. از مجموع ۳۸۲ باند ISSR، ۳۸۱ باند (۹۹/۷ درصد) پلی‌مورفیسم بودند. احمدی شاد، (۱۳۸۸) تنوع ژنتیکی ۳۰ کلون‌های چای ایران را با ۱۶ نشانگر رپید بررسی کرد که از مجموع ۹۶ نوار حاصل ۸۹ نوار چندشکل و ۷ نوار یک‌شکل بود و درصد قطعات چند شکل ۹۹/۷۱ درصد به‌دست آمد. فلک رو و خیاوی (Falkro and Khiavi, 2020) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ‌های چای ایران از منطقه لاهیجان با کاربرد نشانگرهای ISSR دامنه درصد چندشکلی را از ۶۶/۷ تا ۱۰۰ درصد گزارش نمودند. خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی و ISSR مناطق سه‌گانه چای‌کاری ایران و برخی ارقام وارداتی نیز دامنه درصد چندشکلی را در محدوده ۶۳/۶۴ الی ۱۰۰ درصد به‌دست آوردند. قطعات تکثیر شده از نظر اندازه در دامنه bp ۱۰۰ تا bp ۲۰۰۰ بودند ولی دامنه قطعات قابل بررسی در محدوده bp ۲۰۰ تا bp ۱۵۰۰بودند.

برای بررسی میزان توانایی آغازگرها در تشخیص تنوع و چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی آنها برای تمام آغازگرها محاسبه شد، که دامنه تغییرات آن از ۰/۴۴ تا ۰/۴۹ بود. دامنه تغییرات محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) می‌تواند در محدوده صفر تا ۰/۵ باشد که هرچه میزان محاسبه شده بالاتر باشد، نشانه کاربرد و قدرت تفکیک بهتر آغازگرهاست. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی برای تمام نوارهای تکثیری توسط تمام آغازگرها محاسبه شد که میزان PIC کل برابر ۰/۴۹ بدست آمد. از روی این میزان محتوای اطلاعات چندشکلی کل محاسبه شده می‌توان بیان داشت که آغازگرهای به‌کار رفته در این بررسی دارای قدرت بالایی در تشخیص تنوع ژنتیکی نمونه‌های چای هستند. در بررسی فلک رو و خیاوی (Falkro and Khiavi, 2020) و خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) نیز دامنه PIC محاسبه شده مشابه اعداد بدست در مطالعه پیش رو بود. خیاوی و همکاران (Khiavi *et al.*, 2016) در بررسی تنوع ژنتیکی لایم‌های ایران در منطقه جنوب که از یک جنس و گونه هستند و تکثیر آن‌ها نیز عموماً بذری است نیز دامنه تغییرات PIC را از ۰/۴۲ تا ۰/۴۹ گزارش نموده‌اند و بیان کرده‌اند که این محدوده از میزان PIC نشان‌دهنده توانایی بالای این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه مورد بررسی است. با توجه به مجموع این نتایج مشخص می‌شود نشانگرهای انتخاب شده دارای شرایط مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای بودند.

1- Polymorphism

2- Monomorphism

ضریب کوفنتیک به منظور تشخیص بهترین ضریب برای محاسبه ماتریس تشابه دو به دو و تجزیه کلاستر برای سه ضریب دایس، جاکارد و تشابه ساده محاسبه شد و ضریب تشابه جاکارد دارای بالاترین میزان بود (۰/۷۳). میزان محاسبه شده این ضریب نشان می‌دهد که چه مقدار از اطلاعات ماتریس تشابه به‌دست آمده به کلاستر طراحی شده منتقل شده است. بر این اساس ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه ماتریس تشابه و الگوریتم UPGMA برای طراحی کلاستر مورد استفاده قرار گرفت.

دامنه تشابه به‌دست آمده در ماتریس تشابه محاسبه شده، از ۰/۳۱ تا ۰/۸۷ متغیر بود که بیانگر تنوع در بین نمونه‌های این مناطق بود. حداقل میزان تشابه میان نمونه‌های G15 و G17 از منطقه فجر لاهیجان و G24 و G20 از منطقه نشتارود مازندران با مقدار ۰/۳۱ دیده شد، که این نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی زیاد بوته‌های والد که اغلب بذری هستند است. حداکثر تشابه بین دو نمونه‌ی G6 و G7 مربوط به منطقه فشالم رشت با مقدار ۰/۸۷ بود که چون بوته‌های مذکور از بوته‌های انتخابی منطقه هستند این تشابه را تأیید می‌کند. متوسط میزان تشابه بدست آمده نیز ۰/۶۲ بود. دامنه تشابه حاصل توسط نشانگر ISSR در این مطالعه با میزان گزارش شده توسط مطالعات دیگر همخوانی داشت. لی‌یو و همکاران (Liu *et al*., 2010) تنوع و روابط ژنتیکی اکسشن‌هایی از ژرم‌پلاسم چای یونان[1] مربوط به ۸ گونه را توسط نشانگر ISSR بررسی کردند و میزان تشابه ژنتیکی[2] (GS) بین اکسشن‌های مورد بررسی را در محدوده ۰/۴۴۵ تا ۰/۸۱۹ محاسبه کردند. احمدی شاد و همکاران (۱۳۸۸)، در بررسی تنوع ژنتیکی برخی کلون‌های چای ایران را با نشانگر رپید بیشترین فاصله ژنتیکی را بین گونه‌های آسام و کلون انتخابی موجود در ایستگاه فجر لاهیجان و کمترین فاصله ژنتیکی را بین کلون‌های انتخابی ایستگاه فجر و فشالم عنوان کردند که نشان‌دهنده قرابت بین این کلون‌ها بود. واچیرا و همکاران (Wachira *et al.,* 1995) در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی کلون‌های خویشاوند گیاه چای از سه واریته اصلی این گیاه (-as sinensis ،samica و زیرگونه lasiocalyx از گونه assamica) با استفاده از نشانگر RAPD، تنوع وسیعی بین و درون گونه‌ها تشخیص دادند و میزان این تنوع را ۷۰ درصد گزارش کردند. چن و همکاران (Chen and Yamaguchi, 2005) تنوع و روابط ژنتیکی چای چینی (C. sinensis) را توسط نشانگر RAPD بررسی کردند و فاصله ژنتیکی را در محدوده ۰/۱۶ تا ۰/۶۲ با میانگین ۰/۳۷ بدست آوردند. لی‌یو و همکاران (Liu *et al*., 2009) از روش ISSR برای مشخص کردن روابط ژنتیکی ژرم‌پلاسم چای استفاده کردند و فاصله ژنتیکی را در محدوده ۰/۱۶ الی ۰/۷۹ با حد متوسط ۰/۵۰ به‌دست آوردند. فانگ و همکاران (Fang *et al*., 2012) روابط بین ارقام چای را توسط نشانگر SSR و صفات مورفولوژی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که شاخص تنوع ژنتیکی، بین ۰/۲۳ و ۰/۸۰ با میانگین ۰/۵۴ است. این نتایج تاییدکننده دامنه تشابه محاسبه شده در تحقیق پیش رو است.

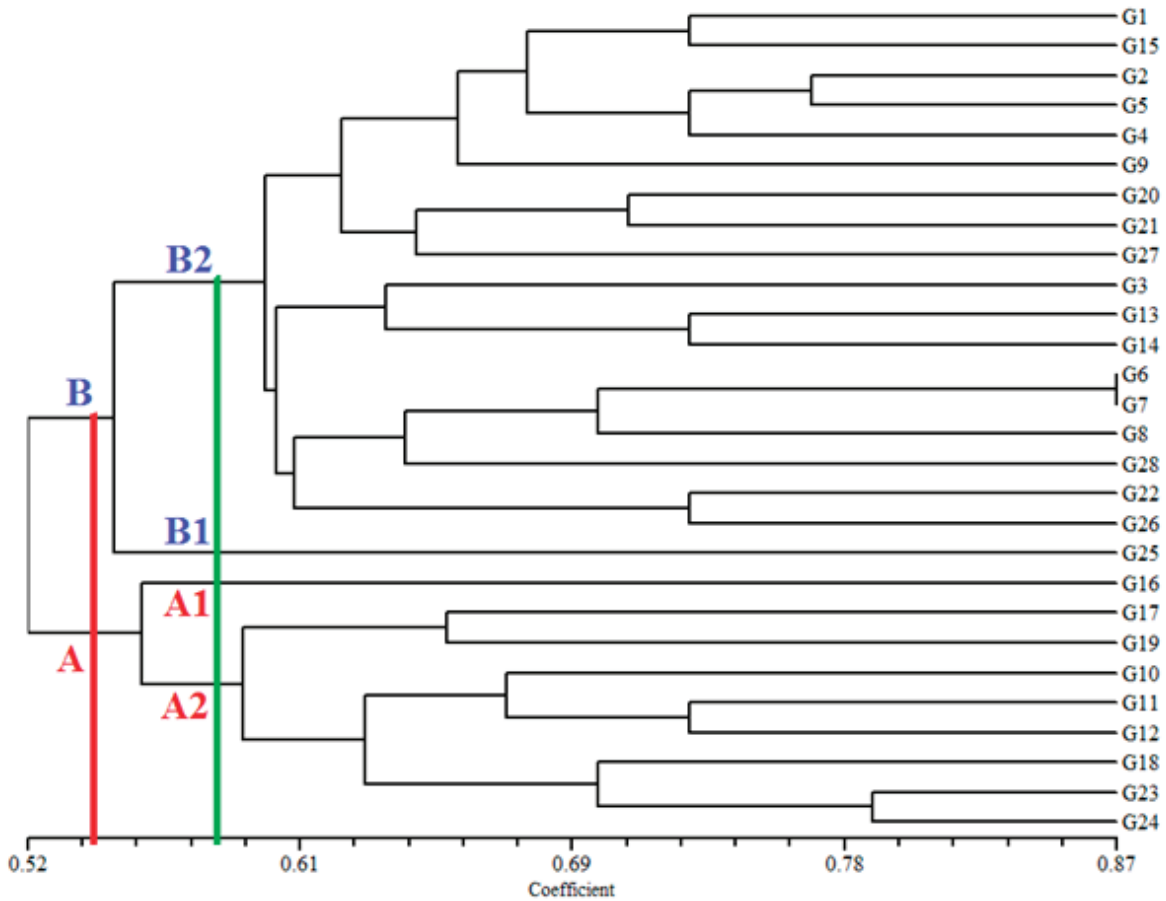
بر اساس خوشه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی توسط داده‌های ISSR (شکل ۳) نمونه‌ها در سطح تشابه ۰/۵۴ در دو خوشه اصلی قرار گرفته‌اند. گروه اول (A) که در سطح شباهت ۰/۵۲ از بقیه‌ی نمونه‌ها جدا شد شامل ۹ نمونه بود که به دو زیرگروه در سطح تشابه ۰/۵۸ تقسیم شد. زیرگروه اول شامل یک نمونه (G16) از منطقه مرکز چای‌کاری بود که در سطح تشابه ۰/۵۶ از زیرگروه دیگر جدا شد. زیرگروه دوم شامل اکثر نمونه‌های منطقه مرکز چای‌کاری و دو نمونه (G23 و G24) از منطقه شرق چای‌کاری است.

1- Yunnan

2- Genetic similarity

با توجه به اینکه بوته‌های چای در ابتدا محدود بوده و با تکثیر بذری و یا تکثیر رویشی (قلمه) تعداد آنها افزایش یافته و عمل انتخاب‌گیری بوته‌های مناسب در گذشته توسط چایکاران صورت گرفته و این بوته‌ها به مناطق مختلف برده شده‌اند، این شباهت بوته‌ها در مناطق مذکور را می‌توان پذیرفت.

گروه دوم (B) که گروه بزرگتری است و ۶۷/۸۵ درصد کل نمونه‌های مورد بررسی را شامل می‌شود شامل تمام نمونه‌های منطقه غرب چای‌کاری و دو نمونه از منطقه مرکز چای‌کاری (G13و G14) و بیشتر نمونه‌های منطقه شرق چای‌کاری است. این گروه در سطح تشابه ۰/۵۸ به دو زیرگروه (B1 و B2) تقسیم شد. زیرگروه اول (B1) شامل یک نمونه (G25) از منطقه شرق چایکاری بود. زیرگروه دوم که قسمت بزرگ نمونه‌ها را شامل می‌شود شامل تمام نمونه‌های منطقه غرب چایکاری (۹ نمونه مورد بررسی) و اکثر نمونه‌های منطقه شرق چایکاری (شش نمونه از نه نمونه مورد بررسی) و دو نمونه از منطقه مرکز چایکاری (G13 و G14) است. با توجه به این که اکثر بوته‌های چای سطح مناطق چایکاری از بوته‌های محدودی تکثیر شده‌اند این ارتباط نزدیک و اختلاط بالا و عدم تفکیک شدن، منطقی به نظر می‌رسد، بطوری که در بررسی گیاهان چای وحشی کشور تایوان نیز اختلاط و رابطه نزدیکی بین ژنوتیپ‌های وحشی و ارقام چای گزارش شده است (۲۷). خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) نیز در بررسی تنوع زنتیکی گیاه چای اختلاط مناطق نمونه‌گیری را گزارش کرده‌اند.



شکل ۳. نمودار ۲۸ نمونه چای با استفاده از نشانگرهای ISSR به روش UPGMA.

بر اساس منابع موجود در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای نشانگرهای ISSR به عنوان ابزاری کار آمد شناخته می‌شوند (خیاوی و همکاران، ۱۳۹۸، Falakro and Khiavi, 2020؛ Liu *et al.*, 2009؛ Roy and Chakraborty, 2009). نشانگر ISSR دارای حساسیت بالایی برای تشخیص و شناسایی رابطه ژنتیکی بین افراد نزدیک است. نتایج حاصل از بررسی داده‌های حاصل از کاربرد نشانگرهای مولکولی ISSR در مطالعات تنوع موجود در بین اکسشن‌های گیاه چای نشان می‌دهد که اختلاف بالایی میان تک نمونه‌های چای موجود در مناطق مختلف چایکاری وجود دارد و این تفاوت با توزیع جغرافیایی هیچ گونه ارتباطی نشان نمی‌دهد. خیاوی و همکاران (۱۳۹۸) و فلک رو و خیاوی (Falakro and Khiavi) نیز در مطالعات خود اعلام کرده‌اند که فاصله جغرافیایی این تنوع‌های مشاهده شده بایکدیگر همخوانی ندارند.

٤- نتیجه‌گیری کلی

در ژنوتیپ‌های چای انتخاب شده در سطوح مورفولوژیکی و مولکولی، تغییرات قابل توجهی مشاهده شد. بررسی مورفولوژی نشان داد که این توزیع گیاه چای در گذشته هر چند بر اساس ویژگی‌های مطلوب بوده است اما با توجه به محدود بودن منبع اولیه وارداتی این گیاه تنوع چندانی در بین ژنوتیپ‌های مناطق دیده نمی‌شود. در ارتباط با نشانگر ISSR نیز درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی قابل توجه حاصل از آغازگری بکار رفته در این پژوهش بیانگر توانمندی این نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های چای است. از این نتایج می توان درک کرد که این سری از صفات و آغازگرها می‌توانند تفاوت‌های ژنتیکی را بسیار خوب تشخیص دهند. با استفاده از این نشانگرها تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های چای مشاهده شد اما این تنوع به گونه‌ای نبود که قادر باشد ژنوتیپ‌های مناطق مختلف را از هم منفک نماید. به نظر می‌رسد شاید با افزایش تعداد آغازگرهای مورد استفاده و استفاده از سایر نشانگرها همانند SNP، SSR و غیره بتوان به این تفکیک دست یافت. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌های چای ایران به دلیل آنکه اکثرا به صورت جنسی تکثیر شده‌اند دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشند.

تضاد و تعارض منافع- نویسنده هر گونه تعارض و تضاد منافع اعم از تجاری و غیر تجاری و شخصی را که در ارتباط مستقیم یا غیر مستقیم با اثر منتشر شده است رد می نمایند.

منابع:

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

خیاوی، ش.ج.، آزادی گنبد، ر.، فلک‌رو، ک. نصراله زاده، س. (۱۳۹۶). بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های جمع آوری شده چای غرب مازندران با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی، نخستین همایش ملی تولیدات گیاهان زراعی و باغی، گنبد کاووس، ایران، ۵ بهمن ۱۳۹۶

خیاوی، ش.ج.، پیشداد، آ.، محقق منتظری، م.، مظفری، س. (۱۳۹۶). ارزیابی گوناگونی ژنتیکی در بین برخی ژنوتیپ های چای منطقه لاهیجان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی. نخستین کنفرانس بین المللی و دهمین کنفرانس کنگره ی ملی علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، ۱۳-۱۶ شهریور ۱۳۹۶

خیاوی، ش.ج.، فلک‌رو، ک.، چائی کار، 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

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

Chaeikar, S.S, Falakro, K., Rahimi, M., Khiavi, Sh.J., & Ashourpour, M. (2020). The investigation of genetic diversity based on SCoT markers, morphological, and chemical characters in tea (Camellia sinensis L.) clones. *Journal of Horticulture and Postharvest Research, 3*(2), 269-284.

Chen, J., Wang, P., Xia, Y., Xu, M., & Pei, S. (2005). Genetic diversity and differentiation of Camellia sinensis L.(cultivated tea) and its wild relatives in Yunnan province of China, revealed by morphology, biochemistry and allozyme studies. *Genetic Resources and Crop Evolution, 52*(1), 41-52.

Chen, L., & Yamaguchi, S. (2005). Rapd markers for discriminating tea germplasms at the inter-specific level in china. *Plant breeding, 124*(4), 404-409.

Chen, L., & Zhou, Z. X. (2005). Variations of main quality components of tea genetic resources [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] preserved in the China National Germplasm Tea Repository. *Plant Foods for Human Nutrition, 60*(1), 31-35.

Chen, X., Hao, S., Wang, L., Fang, W., Wang, Y., & Li, X. (2012). Late-acting self-incompatibility in tea plant (Camellia sinensis). *Biologia, 67*(2), 347-351.

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter, 1*(4), 19-21.

Doebley, J. (1989). Isozymic evidence and the evolution of crop plants. In I*sozymes in plant biology* (pp. 165-191). Springer, Dordrecht.

Falakro, K., & Khiavi, Sh.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.

Fang, W., Cheng, H., Duan, Y., Jiang, X., & Li, X. (2012). Genetic diversity and relationship of clonal tea (Camellia sinensis) cultivars in China as revealed by SSR markers. *Plant Systematics and Evolution, 298*(2), 469-483.

Feng, L., Gao, M. J., Hou, R. Y., Hu, X. Y., Zhang, L., Wan, X. C., & Wei, S. (2014). Determination of quality constituents in the young leaves of albino tea cultivars. *Food Chemistry, 155*, 98-104.

Gai, Z., Wang, Y., Jiang, J., Xie, H., Ding, Z., Ding, S., & Wang, H. (2019). The quality evaluation of tea (Camellia sinensis) varieties based on the metabolomics. *HortScience, 54*(3), 409-415.

Gunasekare, M. T. K. (2007). Applications of molecular markers to the genetic improvement of Camellia sinensis L.(tea)–a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 82*(2), 161-169.

International Plant Genetic Resources Institute. (2000). *Descriptors for Tea (Camellia Sinensis).* Bioversity International.

Jeong, B. C., & Park, Y. G. (2013). Tea plant (Camellia sinensis) breeding in Korea. *In Global Tea Breeding* (pp. 263-288). Springer, Berlin, Heidelberg.

Kafkas, S., Ercişli, S., Doğan, Y., Ertürk, Y., Haznedar, A., & Sekban, R. (2009). Polymorphism and genetic relationships among tea genotypes from Turkey revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science, 134*(4), 428-434.

Karak, T., & Bhagat, R. M. (2010). Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: *A review. Food research international, 43*(9), 2234-2252.

Karunarathna, K. H. T., Mewan, K. M., Weerasena, O. V. D. S. J., Perera, S. A. C. N., Edirisinghe, E. N. U., & Jayasoma, A. A. (2018). Understanding the genetic relationships and breeding patterns of Sri Lankan tea cultivars with genomic and EST-SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 240, 72-80.

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

Khiavi, S. J., Hamidoghli, Y. O. U. S. E. F., Golein, B. E. H. R. O. Z., & Sabouri, A. T. E. F. E. H. (2016). Assessment of lime genetic diversity in three regions of Iran using morphological and ISSR markers. *Agricultural Communications, 4*(3), 18-29.

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

Korir, N. K., Han, J., Shangguan, L., Wang, C., Kayesh, E., Zhang, Y., & Fang, J. (2013). Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical reviews in biotechnology, 33*(2), 111-125.

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. *Botanical Bulletin of Academia Sinica,* 42. 93–100.

Li, Y., Chen, C., Li, Y., Ding, Z., Shen, J., Wang, Y., ... & Xu, M. (2016). The identification and evaluation of two different color variations of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 96*(15), 4951-4961.

Liu, B.Y., Li, Y., Y., Tang, Y.C., Wang, L.Y., Cheng, H., & Wang, P.S. (2010). Assessment of genetic diversity and relationship of tea germplasm in Yunnan as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica, 36*(3), 391-400.

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

Matsumoto, S., Kiriiwa, Y., & Yamaguchi, S. (2004). The Korean tea plant (Camellia sinensis): RFLP analysis of genetic diversity and relationship to Japanese tea. *Breeding science, 54*(3), 231-237.

Oh, C. J., Lee, S., You, H. C., Chae, J. G., & Han, S. S. (2008). Genetic diversity of wild tea (Camellia sinensis L.) in Korea. *Korean Journal of Plant Resources, 21*(1), 41-46.

Piyasundara, J. H. N., Gunasekare, M. T. K., & Wickramasinghe, I. P. (2008). Identification of discriminating morphological descriptors for characterization of tea (Camellia sinensis L.) germplasm in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research. 20*: 193-199

Rajanna, L., Ramakrishnan, M., & Simon, L. (2011). Evaluation of morphological diversity in south Indian tea clones using statistical methods. *Maejo International Journal of Science and Technology, 5*(1), 1-12.

Roy, S. C., & Chakraborty, B. N. (2009). Genetic diversity and relationships among tea (Camellia sinensis) cultivars as revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. *Indian journal of Biotechnology, 8*(4), pp.370-376.

Wachira, FN, Waugh, R., Powell, W., & Hackett, CA (1995). Detection of genetic diversity in tea (Camellia sinensis) using RAPD markers. *Genome , 38* (2), 201-210.

Wambulwa, M.C.; Meegahakumbura, M.K.; Kamunya, S.; Muchugi, A.; Möller, M.; Liu, J.; Xu, J.-C.; Li, D.-Z.; Gao, L.-M. (2017). Multiple origins and a narrow genepool characterise the African tea germplasm: concordant patterns revealed by nuclear and plastid DNA markers. *Scientific reports, 7*(1), 1-9.

Wambulwa, M. C., Meegahakumbura, M. K., Kamunya, S., Muchugi, A., Möller, M., Liu, J., ... & Gao, L. M. (2016). Insights into the genetic relationships and breeding patterns of the African tea germplasm based on nSSR markers and cpDNA sequences. *Frontiers in plant Science*, 7, 1-12

Wight, W. (1959). Nomenclature and classification of the tea plant. Nature, 183(4677), 1726-1728.

Wright, W. (1962). Tea classification revised. *Current Science Bangalore, 31*, 298-299.

Yang, H., Wei, C.L., Liu, H.W., Wu, J.L., Li, Z.G., Zhang, L., Jian, J.B., Li, Y.Y., Tai, Y.L., Zhang, J. and Zhang, Z.Z., (2016). Genetic divergence between Camellia sinensis and its wild relatives revealed via genome-wide SNPs from RAD sequencing. *PLoS One, 11*(3), e0151424.

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

Young-Goo, P., Kaundun, S. S., & Zhyvoloup, A. (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*(2), 159-165.