



دانشگاه گیلان، دانشکده باغبانی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و ششم، شماره چهارم، ۱۳۹۸

۱۴۷-۱۳۱

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

DOI: 10.22069/jopp.2019.15655.2405

کاربرد نشانگرهای ریخت‌شناختی و ISSR جهت شناسایی برخی ژنوتیپ‌های چای

*شاهین جهانگیرزاده خیایوی^۱، کوروش فلکرو^۱، صنم صفایی چایکار^۱، سمر رمزی^۱ و احسان کهنه^۱

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۴

چکیده

سابقه و هدف: چای (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) یکی از مهم‌ترین محصولات منطقه شمال ایران می‌باشد. امروزه بسیاری از بوته‌های چای به دلایل مختلف در معرض از بین رفتن قرار دارند، بنابراین داشتن اطلاعات درباره ژنتیک آن برای طراحی برنامه‌های اصلاحی جهت دستیابی به گیاهان مناسب و با اهداف خاص کمک شایانی است. بنابراین در این پژوهش، تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چای در مناطق عمده کشت این محصول در شمال ایران با مقایسه با هشت کلون وارداتی شناسایی شد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ۴۲ درختچه چای با استفاده از دو گروه نشانگر ریخت‌شناسی و ISSR مورد بررسی تنوع ژنتیکی قرار گرفتند. بررسی ریخت‌شناسی توسط توصیف‌نامه ثبت‌شده برای چای انجام گرفت و ۲۱ صفت بررسی شد. پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و کاملاً توسعه‌یافته، DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد و از ۱۰ عدد نشانگر ISSR برای بررسی روابط ژنتیکی ۴۲ ژنوتیپ چای استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده، توسط ضریب فاصله اقلیدسی برای نشانگرهای ریخت‌شناسی و ضریب تشابه ساده برای ISSR استفاده شد و تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA طراحی شد. تجزیه PCA توسط نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل ۲۱ ویژگی ریخت‌شناسی در ژنوتیپ‌ها و کلون‌های چای نشان دادند که تنوع ریخت‌شناختی مابین نمونه‌های چای مورد بررسی محدود است و دامنه تشابه باریکی برای آن‌ها محاسبه شد. 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 ریخت‌شناسی نشان داد که پنج مولفه اصلی اول ۵۴/۲۱ درصد، از واریانس کل را نشان می‌دهند. کاربرد ۱۰ آغازگر ISSR تولید ۹۲ باند نمود که ۷۲ باند حالت چندشکلی نشان دادند (۷۸/۲۶ درصد). آزمون PIC دامنه ۰/۴۳ تا ۰/۵۰ را نشان داد. نتایج آزمون کوفتیک نشان داد که ضریب تشابه SM و الگوریتم UPGMA برای تجزیه خوشه‌ای مناسب‌ترین است. بر اساس داده‌های ISSR دامنه تشابه در محدوده ۰/۲۸ الی ۰/۹۳ به‌دست آمد. در تجزیه خوشه‌ای 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. آزمون PCA نیز نشان داد که پنج مولفه اصلی اول ۷۲/۹۸ درصد تفاوت‌ها ایجاد می‌نمایند.

* مسئول مکاتبه: shjahangirzadeh@gmail.com

نتیجه‌گیری: در ژنوتیپ‌های چای انتخاب‌شده در سطوح ریخت‌شناختی و مولکولی، تغییرات قابل‌توجهی مشاهده شد. بررسی ریخت‌شناختی نشان داد 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 مورد مطالعه دیده نمی‌شود. در ارتباط با نشانگر ISSR نیز درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی قابل‌توجه حاصل از آغازگرهای به‌کار رفته در این پژوهش بیانگر توانمندی این نشانگرها در شناسایی تنوع در بین ژنوتیپ‌های چای است. از این نتایج می‌توان 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 به‌گونه‌ای نبود که قادر باشد ژنوتیپ‌های مناطق مختلف را از هم منفک نماید. به‌نظر می‌رسد شاید با افزایش تعداد آغازگرهای مورد استفاده و استفاده از سایر نشانگرها همانند SSR، SNP و غیره بتوان به این تفکیک دست یافت. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌های چای ایران به‌دلیل آن‌که اکثراً به‌صورت جنسی تکثیر شده‌اند دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آغازگر، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، محتوای اطلاعات چند شکلی، *Camelia*

مقدمه

برای حفظ ذخایر توارثی می‌توان به جمع‌آوری و ذخیره ژنوتیپ‌های مختلف به‌صورت غده، بذر و غیره در بانک ژن اقدام نمود. محدودیت‌های موجود در هزینه و فضا کافی جهت ذخیره‌سازی حجم عظیم مواد گیاهی، ما را بر آن می‌دارد تا از جمع‌آوری ارقام مشابه پرهیز کنیم. مناسب‌ترین راه‌حل برای شناسایی و تشخیص قرابت‌های ژنتیکی ارقام و حذف مواد گیاهی مشابه، استفاده از نشانگرها می‌باشد (۸). به‌ویژه نشانگرهای مولکولی که ابزارهایی توانمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بوده و در توضیح روابط ژنتیکی بین گونه‌ای و درون‌گونه‌ای و در مدیریت منابع ژنتیکی گیاهی نقش مؤثری را ایفا می‌کنند (۳۰ و ۳۱).

با توجه به موارد فوق و از آنجایی که تکثیر چای در کشور در گذشته از طریق کاشت بذر بوده، بنابراین ژنوتیپ‌های زیادی از چای در کشور وجود دارند که در طی دهه‌های گذشته با تلاش پژوهشگران چای کشور تعدادی از این ژنوتیپ‌های طبیعی چای جمع‌آوری شده در کلکسیون‌های پژوهشگر چای کشور نگهداری می‌شوند. اگرچه این کلکسیون‌ها تنوع ژنتیکی موجود چای داخلی و خارجی را دربر نمی‌گیرد ولی به‌عنوان گام اولیه و اصلی در نگهداری، شناسایی و ارزیابی گیاه چای از اهمیت بالایی

تنوع اساس کارهای اصلاح نباتات و زیست‌فناوری و ماده خام ضروری برای آن است. در اصلاح نباتات کلاسیک اگر بنیان‌ها ضعیف باشند، اختلافات ژنتیکی نسل‌های در حال تفرق جمعیت اصلاح‌شده، به‌تدریج کم می‌شود در نتیجه فاصله ژنتیکی بین نتاج والدین کاهش می‌یابد و هتروزیس کافی حاصل نمی‌شود. در صورت عدم وجود تنوع ژنتیکی جدید، اختلافات ژنتیکی بین ارقام اصلاح‌شده جدید کم شده و شناسایی افراد با استفاده از تکنیک‌های موجود مشکل می‌شود (۹). بنابراین حفظ ذخایر ژنتیکی و امکان انتخاب مواد گیاهی متنوع، موفقیت اصلاح‌گران گیاهی را تضمین می‌کند. لازمه بقا و نگهداری ذخایر ژنتیکی و در نهایت بهره‌گیری از این منابع، ابتدا درک صحیحی از تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها، ارقام و ارتباطات جمعیتی می‌باشد که پیش‌نیاز آن جمع‌آوری مختصر اطلاعات در ارتباط با طبیعت و شجره‌نامه اختلافات ژنتیکی والدین می‌باشد که با توجه به این اطلاعات و در نتیجه ورود والدین متعدد و متنوع در تلاقی‌ها، شانس به‌دست آمدن حداکثر هتروزیس افزایش یافته و طیف وسیعی از تنوع در نسل‌های در حال تفرق وجود خواهد داشت (۲۰ و ۳۳).

طراحی برنامه‌های اصلاحی اقدام به بررسی تنوع ژرمپلاسم چای منطقه یوننان کشور چین با استفاده از نشانگر ISSR نمودند و گزارش آنها بیان داشت که دامنه تشابه در بین نمونه‌های این منطقه در محدوده ۴۵ تا ۸۲ درصد با متوسط ۵۱ درصد متغیر می‌باشد که این نتایج بیان از تنوع ژنتیکی بالایی در این ژرمپلاسم است. براساس تجزیه خوشه‌ای نیز نمونه‌های مورد بررسی در سه گروه قرار گرفتند که این گروه‌بندی با الگوی جغرافیایی نمونه‌برداری همخوانی نداشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای آنها توسط آزمون PCA تأیید گردید. کافکاس و همکاران (۱۹) در بررسی چندشکل و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چای در کشور ترکیه با استفاده از نشانگر AFLP ۶۹/۸ درصد چندشکلی در بین باندها به دست آوردند. میزان PIC نشانگرهای به کار برده به طور متوسط ۰/۷۹ محاسبه شد و میزان تشابه توسط این نشانگر در محدوده ۰/۶۸ تا ۰/۹۲ با متوسط ۰/۷۶ گزارش کردند.

در این بررسی دو نشانگر ریخت‌شناسی و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انتخابی چای در ایران با هدف طراحی برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفتند تا از این طرق به دانش موجود در این رابطه افزوده و کمکی برای حفظ و نگهداری از ژرمپلاسم موجود باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش تعداد ۴۲ نمونه گیاه چای از مناطق غرب چایکاری (فشالم؛ ۱۲ نمونه) و مرکزی چایکاری (لاهیجان؛ ۱۰ نمونه) شرق چایکاری (نشتارود؛ ۱۲ نمونه) و هشت نمونه از کلون‌های وارداتی از سریلانکا به عنوان جمعیت وارداتی مورد آزمایش قرار گرفتند. جدول ۱ نمونه‌های به کار رفته، کد ثبت شده در پژوهشکده چای، محل نمونه‌گیری و کدبندی آنها را نشان می‌دهد.

برخوردار هستند. شناسایی دقیق ذخایر ژنتیکی کشور و به دنبال آن ارزیابی این ژنوتیپ‌ها به عنوان اولین قدم پژوهش‌های ژنتیکی و اصلاح نبات مطرح می‌باشد. همچنین تصور می‌شود که تعدادی از ارقام با اسامی اشتباه در کلکسیون‌ها نگهداری شده و یا به اشتباه اتیکت‌گذاری شده‌اند.

نشانگرهای ملکولی جهت شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌ها در گیاهان متعددی به کار رفته‌اند (۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۲۱). در گیاه چای نیز از این نشانگرها به طور وسیعی برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است (۱، ۲، ۱۱، ۱۴، ۱۹، ۲۲، ۲۳، ۲۶، ۲۹ و ۳۶).

جهانگیرزاده و همکاران (۱۸) با استفاده از صفات ریخت‌شناسی مرتبط با برگ گیاه چای به بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه در منطقه مرکزی چایکاری اقدام نمودند و نتیجه گرفتند که توزیع نمونه‌ها در بررسی خوشه‌ای با توزیع جغرافیایی همخوانی ندارد و از سوی دیگر تنوع ریخت‌شناسی بالایی نیز در بین گیاهان به دست نیامد. جهانگیرزاده و همکاران (۱۳) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده چای غرب مازندران با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی دامنه تشابه مابین نمونه‌ها را از ۰/۲۰ تا ۰/۶۰ گزارش نمودند. بر اساس این نتایج به دست آمده از خوشه‌بندی نمونه‌ها گزارش کردند که گیاه چای در منطقه شرق چایکاری دارای تفاوت ژنتیکی پایینی می‌باشد. یائو و همکاران (۳۶) تنوع ژنتیکی بین ارقام تحت کشت سه کشور مختلف (چین، ژاپن و کنیا) را توسط نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار دادند و اعلام نمودند که حداقل و حداکثر میزان تشابه بین نمونه‌های این کشورها به ترتیب حدود ۰/۱۶ تا ۰/۵۴ می‌باشد. شاخص‌های تنوع ژنتیکی نی و شانون گزارش شده توسط آنها نیز ۰/۲۲ و ۰/۳۵ بود. با توجه به شاخص G_{ST} (۰/۲۰) محاسبه شده میزان تنوع درون‌جمعیتی بالایی توسط این پژوهشگران گزارش شده است. بن‌بینگ و همکاران (۳) جهت

جدول ۱- نمونه‌های چای به کار رفته در بررسی.

Table 1. Tea samples used in analysis.

نام علمی Scientific name	محل جمع‌آوری Location	کد ثبتی پژوهشکده TRC No.	کد نمونه Plant code	نام علمی Scientific name	محل جمع‌آوری Location	کد ثبتی پژوهشکده TRC No.	کد نمونه Plant code
<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	703	G22	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	269	G1
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	121	G23	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	276	G2
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	58	G24	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	449	G3
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	258	G25	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	278	G4
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	43	G26	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	261	G5
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	23	G27	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	285	G6
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	116	G28	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	272	G7
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	265	G29	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	74	G8
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	178	G30	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	250	G9
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	71	G31	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	بذری	G10
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	262	G32	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	205	G11
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	64	G33	<i>C. sinensis</i>	فشالم Fashalam	280	G12
<i>C. sinensis</i>	نشتارود Nashtarood	62	G34	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	468	G13
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	G2.5	G35	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	440	G14
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	DN	G36	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	444	G15
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	3015	G37	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	269	G16
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	DG7.1	G38	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	276	G17
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	DG7	G39	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	449	G18
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	DG39	G40	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	278	G19
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	3020	G41	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	261	G20
<i>C. sinensis</i>	سريلانكا Sri Lanka	KEN	G42	<i>C. sinensis</i>	فجر لاهیجان Fajr Lahijan	285	G21

بررسی ابتدا توسط نرم‌افزار Ntsys و ضریب YBAR استانداردسازی شده و سپس توسط همین نرم‌افزار ماتریس تشابه بر اساس ضریب فاصله اقلیدسی محاسبه گردید. جهت طراحی خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه از الگوریتم UPGMA در نرم‌افزار Ntsys (۲۷) استفاده شد. صفات مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل ریخت‌شناختی: برای بررسی نوع ژنتیکی بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی تعداد ۲۱ صفت کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت عدم تأثیر سال این عمل در دو سال متوالی و در هر سال با سه تکرار در هر سری نمونه‌گیری انجام گرفت. صفات مورد بررسی بر اساس توصیف‌نامه معرفی شده توسط مؤسسه بین‌المللی مخازن ژنتیکی گیاهان (IPGRI) انتخاب شده بودند (۱۰). داده‌های حاصل جهت

جدول ۲- صفات ریخت‌شناسی مورد بررسی.

Table 2. Investigated morphological characters.

صفات Characters	ردیف Row	صفات Characters	ردیف Row
طول به عرض برگ بالغ Length/ Width of mature leaf	12	طول میان گره (mm) Internode length	1
طول برگ بالغ (mm) Length of mature leaf	13	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رشد) Pigmentation in young leaves (In growth season)	2
عرض برگ بالغ (mm) Width of mature leaf	14	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رکود) Pigmentation in young leaves (In dormant season)	3
زاویه برگ Leaf angle	15	رنگ برگ نابالغ Immature leaf colour	4
رگه‌بندی Leaf venation	16	رنگ برگ بالغ Mature leaf colour	5
طرز قرارگیری برگ روی گیاه Leaf pose (angle)	17	شکل برگ Leaf shape	6
واکسی بودن برگ Leaf waxiness	18	سطح بالایی برگ Leaf upper surface	7
رنگی بودن برگچه Petiole color	19	شکل انتهای (نوک برگ) Leaf apex shape	8
طول دم‌برگ برگ بالغ (mm) Length of mature leaf petiole	20	عادت رشد انتهای برگ (نوک برگ) Leaf apex habit	9
رنگ شاخه جوان Young shoot colour	21	شکل پایه برگ Leaf base shape	10
		حاشیه برگ Leaf margin	11

تجزیه آماری: محصولات تکثیرشده به نسبت ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری و ۲ میکرولیتر ژل رد^۱ (Biotium, USA) در ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه تفکیک گردیدند و زیر نور UV توسط دستگاه ژل داگ بیومترا (Biometra) از ژل حاصل عکس برداری شد. باندهای چندشکل غیرمبهم و دارای وضوح بالا در ژل آگارز آغازگرها بر اساس وجود و عدم وجود به صورت صفرو یک نمره‌دهی 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 ...) می‌باشد و همچنین باندهای مونومورف در این نمره‌دهی قرار نگرفتند. محتوای اطلاعات چندشکلی^۲ (PIC) بر اساس رابطه $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$ که برای نشانگرهای غالب توصیه شده است، با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه شد. در این رابطه f_i فراوانی قطعه نشانگر i ام هنگام وجود و $(1-f_i)$ فراوانی قطعه نشانگر i ام در حالت عدم وجود باند است (۲۸). بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آن‌ها به نرم‌افزار Ntsys ماتریس ضریب تشابه SM تشکیل گردید و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها با الگوریتم UPGMA صورت گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز توسط برنامه SPSS انجام گرفت. از همین داده‌ها برای محاسبه فراوانی‌های آلی (na)، تعداد آل مؤثر (ne)، شاخص شانون (I)، تنوع درون‌جمعیتی (Hs) تنوع کل (Ht) و نسبت تنوع بین‌جمعیتی به تنوع کل (Gst) به وسیله نرم‌افزار Popgene استفاده شد.

استخراج DNA و تجزیه مولکولی: جهت استخراج DNA از روش دلاپورتا و همکاران (۶) با اندکی تغییر استفاده گردید. جهت تعیین کمیت DNA استخراج‌شده از روش اسپکتوفتومتر و دستگاه نانودراپ استفاده شد و برای تعیین کیفیت DNA استخراج‌شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد و ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد.

تعداد ۲۱ عدد آغازگر ISSR برای این بررسی بر روی نمونه‌ها و جهت بهینه‌سازی و انتخاب بهترین آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت ۱۰ عدد از آن‌ها که بهترین، قوی‌ترین و تکرارپذیرترین تکثیر را داشتند، جهت ادامه بررسی برگزیده شدند. توالی آغازگرهای ISSR به‌کار رفته در جدول ۳ آورده شده است. جهت اجرای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ترکیب مواد در داخل هر واکنش شامل DNA الگو ۵۰ ng، بافر PCR (۱۰X) به میزان ۱/۲۵ μl، کلرید منیزیم ۲ mM، از هر dNTP به میزان ۰/۲ mM، آنزیم Taq پلیمرز به میزان ۱ واحد و ۰/۷۵ μM از آغازگر بود که در نهایت توسط آب مقطر به حجم ۱۲/۵ μl رسانده شد. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرها نیز به صورت 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 شرایط به این صورت تنظیم گردید: 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 سانتی‌گراد 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 گردید.

1- Gel red

2- Polymorphic Information Content (PIC)

جدول ۳- توالی آغازگرهای به کار رفته در بررسی و اطلاعات آماری آنها.

Table 3. Primer sequences used in experiments.

محتوای اطلاعات چندشکلی	درصد چندشکلی	تعداد قطعات چندشکلی	تعداد کل قطعات	توالی آغازگر	شمار آغازگر
Polymorphic Information Content (PIC)	Polymorphic percent	No. of polymorphic fragment	Total No. of fragments	Primer sequence	Primer No.
0.49	85.71	6	7	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	P2
0.48	100.00	8	8	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	P3
0.47	87.50	7	8	CTCTCTCTCTCTCTRG	P4
0.46	83.33	10	12	CAGCAGCAGCAGCAGCAGT	P5
0.47	100.00	8	8	GGAGAGGAGAGGAGAGGAGA	P6
0.50	54.55	6	11	TGTGTGTGTGTGTGTGG	P8
0.43	85.71	6	7	CTCTCTCTCTCTCTRA	P11
0.49	63.64	7	11	TCTCTCTCTCTCTCC	P13
0.49	77.78	7	9	ACACACACACACACACYC	P15
0.43	63.64	7	11	ACACACACACACACACYG	P16
0.48	78.26	72	92	-	جمع Sum
-	-	7.2	9.20	-	میانگین Average

تفاوت ریخت‌شناسی محدودی گزارش شده است (۱۳، ۱۸ و ۲۴).

جهانگیرزاده و همکاران (۱۸) در بررسی تنوع گیاه چای در منطقه لاهیجان به‌عنوان مرکز چایکاری در ایران دامنه تفاوت بین نمونه‌ها را بر اساس ضریب اقلیدسی بسیار محدودتر از دامنه محاسبه شده در بررسی حاضر بیان نمودند آن‌ها بیش‌ترین و کم‌ترین میزان تفاوت را به ترتیب ۱/۷۴ و ۰/۱۹ محاسبه کردند که دلیل عمده آن می‌تواند به محدود بودن منطقه نمونه‌برداری و همچنین تعداد کم‌تر صفات بررسی شده در بررسی آن‌ها باشد. جهانگیرزاده و همکاران (۱۶) در بررسی تنوع ریخت‌شناسی لایم‌های ایران در منطقه جنوب که از یک جنس و گونه می‌باشند و تکثیر آن‌ها نیز عموماً بذری می‌باشد میزان تغییرات ملایمی را گزارش نمودند. با توجه به این نتایج و نتایج به‌دست آمده در بررسی حاضر می‌توان بیان نمود میزان دامنه تفاوت به‌دست آمده در مجموعه مورد بررسی قابل‌پذیرش می‌باشد. دلایل متنوعی برای

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل ریخت‌شناختی: شناسایی صفات ریخت‌شناسی بر اساس توصیف‌نامه توصیه شده مؤسسه IPGRI (۱۰) با کاربرد ۲۱ صفت کمی و کیفی در برخی ژنوتیپ‌های چای جمع‌آوری شده در پژوهشکده چای صورت گرفت. تجزیه مقایسه‌ای روی ۴۲ نمونه گیاه چای تنوع کمی را نشان داد. با توجه به گزارش چن و همکاران (۴) استفاده از ویژگی‌های مربوط به برگ و ساقه به دلیل داشتن میزان اختلاف معنی‌دار برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی کافی می‌باشد. همچنین آن‌ها گزارش کردند صفات مربوط به میوه به دلیل نداشتن اختلاف معنی‌دار برای بررسی مناسب نمی‌باشد، بنابراین در بررسی حاضر وارد نشده‌اند.

ماتریس تشابه دوگانه بین نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله اقلیدسی محاسبه شد که این جدول (جدول آورده نشده است) میزان تفاوت کمی را نشان داد در مطالعات پیشین روی ژرم‌پلاسم چای دامنه

کاهش اثر محیط در دو سال متفاوت در یک زمان (معادل با چین اول برداشت چای) صورت گرفت و از هر سری برداری سه تکرار وجود داشت اما باز هم محیط می‌تواند اثر خود را بر جای بگذارد.

گروه ششم تشکیل شده که حدود ۸۸ درصد نمونه‌های مورد بررسی را در بر می‌گرفت در سطح تفاوت ۶/۰۰ خود به سه زیرگروه قابل تقسیم بود. زیرگروه اول (F1) در بین این سه زیر گروه دارای کم‌ترین تعداد اعضا بود (سه عضو؛ G12، G23 و G39) اما دو زیرگروه دیگر دارای تعداد اعضای بیش‌تری بودند. زیرگروه دوم (F2) دارای ۱۲ عضو (۳۲/۵ درصد اعضای گروه F) و زیرگروه سوم (F3) دارای ۲۲ عضو (۵۹/۵ درصد اعضای گروه F) بود. عدم توزیع نمونه‌ها با توجه به مناطق جغرافیایی در تجزیه خوشه‌ای مشاهده می‌گردد که نتایج مشابهی توسط بن‌بینگ و همکاران (۳) که این مورد با منشأ یکسان بوته‌های گیاه چای (*C. sinensis*) بر اساس منابع پیشین (۴) هم‌خوانی دارد. این نوع الگوریتم خوشه‌بندی در مطالعات قبلی مورد تأیید قرار گرفته است (۲۴) و این گونه گروه‌بندی به‌طور کلی با دانش موجود در مورد ریخت‌شناسی و سیستماتیک گونه‌های *Camellia* سازگار است (۲، ۲۴، ۲۵ و ۳۵). بر اساس گزارش‌های پیشین و نتایج این بررسی می‌توان بیان نمود که بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی در ژرم‌پلاسم ایران امکان شناسایی نمونه‌ها با استفاده از این نشانگرها وجود دارد هر چند جهت تشخیص با دقت بالاتر نیاز به کاربرد ابزارهای دقیق‌تر مانند نشانگرهای مولکولی وجود دارد. مشخصات ریخت‌شناسی گروه‌ها در جدول ۴ ارائه شده است.

محدود بودن میزان تفاوت مشاهده شده قابل ذکر است که مهم‌ترین دلیل به وارد شدن گیاه چای در گذشته باز می‌گردد به طوری که منشأ تمام گیاهان چای موجود در ژرم‌پلاسم گیاه چای ایران نتیجه تکثیر بذری حاصل از گرده‌افشانی آزاد سه توده اولیه می‌باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای در کشور ترکیه که مانند کشور ایران گیاه چای وارداتی می‌باشد با استفاده از نشانگر AFLP نیز دامنه تشابه بالایی گزارش شده است (۱۹). از سوی دیگر به دلیل آن‌که در کشور ایران تکثیر گیاه چای در گذشته به صورت بذری بوده است و دانه‌هایی 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 میانگرمه طول‌تر، اندازه برگ درشت‌تر توسط انسان انتخاب شده‌اند و همچنین با توجه به محدود بودن تنوع ژنتیکی گیاهان وارد شده عموماً کاهش تنوع ژنتیکی مشاهده می‌گردد که این موارد به‌عنوان کاهش هتروزیگوتی (H) شناخته می‌گردد (۷).

بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی و ضریب فاصله اقلیدسی و الگوریتم UPGMA، نمونه‌ها به‌نحوی که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد در سطح تفاوت ۶/۶ نمونه‌ها به شش گروه قابل تفکیک بودند که پنج گروه اول (A، B، C، D و E) هر کدام دارای یک عضو بودند. گروه ششم تشکیل شده (گروه F) در واقع گروه اصلی قابل شناسایی بود. جدا شدن پنج گروه A، B، C، D و E از سایر نمونه‌ها را می‌توان به این حالت توجیه نمود که به دلیل تلاقی آزاد و شرایط جغرافیایی و محیطی برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی می‌تواند تغییر نمایند. هر چند نمونه‌برداری برای

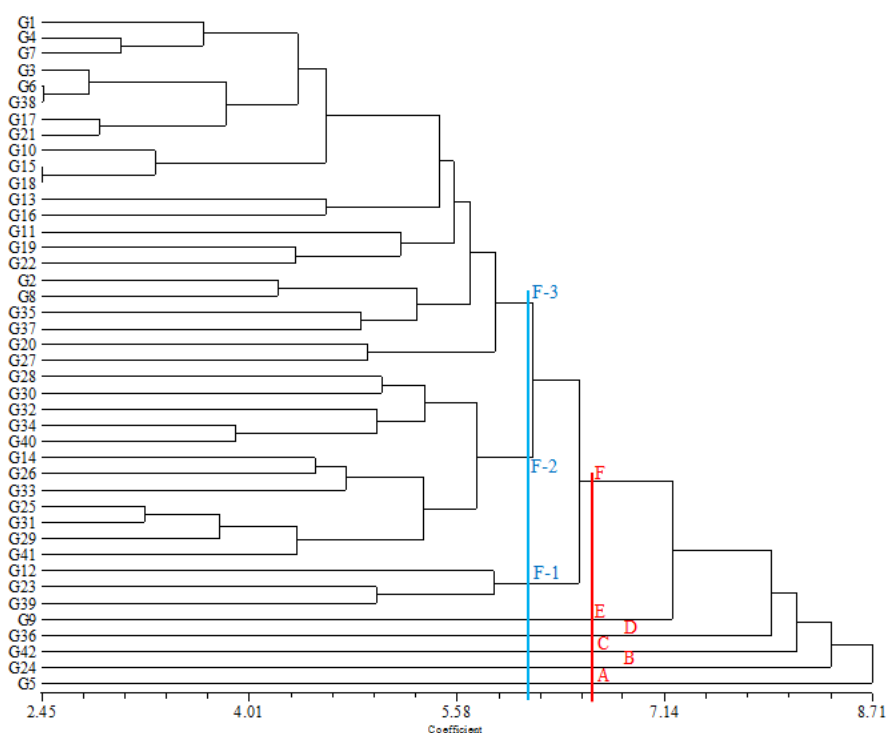
جدول ۴- نتایج صفات مورفولوژیک غالب (معیار ارزیابی بیش از ۵۰ درصد در هر دو گروه) در ژنوتیپ‌های چای.
Table 4. Results of the dominant morphological traits (criteria for the evaluation of more than 50% of both group members) in tea genotypes.

گروه F		نتایج Results				صفت Traits	ردیف Row
گروه F3 Subgroup F3	گروه F2 Subgroup F2	گروه F1 Subgroup F1	گروه E Group E	گروه D Group D	گروه C Group C	گروه B Group B	گروه A Group A
31.70	41.32	39.08	28.86	34.08	32.55	28.39	39.30
2.00	1.67	1.74	2.47	1.53	2.01	3.34	1.85
65.23	72.99	80.98	73.28	66.47	84.12	57.15	45.63
32.54	43.73	46.53	29.64	43.55	41.87	17.09	24.67
5.57	6.65	5.83	7.05	3.14	3.58	5.50	23.24
نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent
نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent	نمی‌شود Absent
سبزر روشن Light green	زرد Yellow	سبزر روشن Light green	سبزر تیره Dark green	سبزر تیره Dark green	سبزر روشن Light green	سبزر روشن Light green	سبزر روشن Light green
سبزر Green	سبزر کمرنگ Light green	سبزر Green	سبزر Green	سبزر Green	سبزر Green	سبزر کمرنگ Light green	سبزر Green
تخم‌برخی Ovate	تخم‌برخی Ovate	تخم‌برخی Ovate	تخم‌برخی Ovate	تخم‌برخی Ovate	تخم‌برخی Ovate	تخم‌برخی Ovate	بیضوی Elliptic
صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	مسطح یا لبه‌ای برگ Leaf upper surface
نوک تیز Acute	نوک تیز Acute	نوک تیز Acute	نوک تیز Acute	نوک تیز Acute	نوک تیز Acute	نوک تیز Acute	شکل انتهای برگ (نوک برگ) Leaf apex shape
طول میان‌گره (mm) Internode length	طول به عرض برگ بالغ Length/Width of mature leaf	طول برگ بالغ (mm) Length of mature leaf	عرض برگ بالغ (mm) Width of mature leaf	طول دمبرگ برگ بالغ (mm) Length of mature leaf petiole	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رشد) Pigmentation in young leaves (In growth season)	رنگی شدن در برگ‌های جوان (در فصل رکود) Pigmentation in young leaves (In dormant season)	رنگ برگ نابالغ Immature leaf colour
رنگ برگ بالغ Mature leaf colour	شکل برگ Leaf shape	سطح بالایی برگ Leaf upper surface	شکل انتهای برگ (نوک برگ) Leaf apex shape				

ادامه جدول ۴-
Continue Table 4.

نتایج Results		نتایج Results						صفت Traits	ردیف Row
گروه F Group F		گروه E Group E	گروه D Group D	گروه C Group C	گروه B Group B	گروه A Group A			
F3 Subgroup F3	زبر گروه F3 Subgroup F3	F1 Subgroup F1	F2 Subgroup F2	F3 Subgroup F3	F4 Subgroup F4	F5 Subgroup F5			
صاف Straight	صاف Straight	صاف Straight	صاف Straight	صاف Straight	صاف Straight	خم‌شده به پایین (منحنی) Down turned (recurved)	خم‌شده به پایین (منحنی) Down turned (recurved)	عادت رشد انتهای برگ Leaf apex habit	
نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	نوک‌دار (باریک) Attenuate (acute)	شکل پایه برگ Leaf base shape	
مقعر Serrulate	نامشخص UNKNOWN	کنگره دار Denticulate	مقعر Serrulate	دندانه دار دوگانه Biserrate	مقعر Serrulate	موجدار Wavy	موجدار Wavy	حاشیه برگ Leaf margin	
زاویه بسته Acute	زاویه بسته Acute	زاویه بسته Acute	زاویه بسته Acute	زاویه باز Obtuse	زاویه بسته Acute	زاویه بسته Acute	زاویه بسته Acute	زاویه برگ Leaf angle	
نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	نامشخص Indistinct	رگه بندی Leaf venation	
نیبه سرپا Semi-erect	نیبه سرپا Semi-erect	نیبه سرپا Semi-erect	افقی Horizontal	افقی Horizontal	افقی Horizontal	نیبه سرپا Semi-erect	نیبه سرپا Semi-erect	طرز قرارگیری برگ روی گیاه Leaf pose	
نبودن Absent	نبودن Absent	بودن Present	بودن Present	نبودن Absent	نبودن Absent	نبودن Absent	نبودن Absent	واکسی بودن برگ Leaf waxiness	
سبز Green	زرد-سبز Yellow-green	سبز-بنفش Green-Purple	سبز Green	سبز Green	سبز Green	سبز-بنفش Green-Purple	سبز-بنفش Green-Purple	رنگی بودن برگچه Petiole color	
سبزرنگ Light Green	قرمز Green	قرمز Red	سبزرنگ Light Green	قرمز Red	قرمز Red	سبز Green	سبز Green	رنگ شاخه جوان Young shoot colour	

* No trait was 50% or higher.



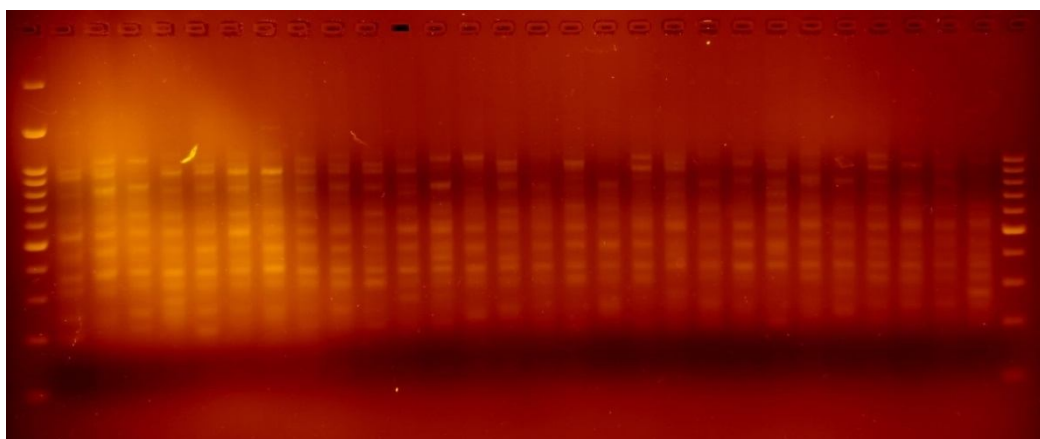
شکل ۱- نمودار ۴۲ نمونه چای مورد بررسی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی به روش UPGMA.
Fig. 1. Dendrogram of 42 tea samples using morphological markers based on UPGMA.

تکثیر و تکرارپذیر بودن برای بررسی DNA ۴۲ نمونه چای جمع‌آوری شده از مناطق غرب چایکاری و مرکزی چایکاری، شرق چایکاری و هشت نمونه از کلون‌های وارداتی از سریلانکا به‌عنوان جمعیت وارداتی مورد استفاده قرار گرفتند. اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۳ آورده شده است. از کل ۱۰ آغازگر به‌کار رفته ۹۲ باندهای ویژگی‌های مطلوب برای بررسی شناسایی شدند که ۷۲ باندهای چندشکل نشان دادند (۷۸/۲۶ درصد باندهای چندشکل بودند). با توجه به نتایج سایر بررسی‌های مشابه بر روی گیاه چای (۱۱، ۲۹ و ۳۲) این میزان درصد محاسبه شده، قابل قبول است. به‌طوری‌که توماس و همکاران (۳۲) در بررسی تنوع گیاه چای حاصل از تنوع سوماکلونال درصد چند شکلی حدود ۵۳ درصد گزارش نمودند و در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام چای توسط روی و

برای بررسی الگوی تغییرات ویژگی‌ها اندازه‌گیری شده و برای پیدا کردن ویژگی‌های تعیین‌کننده جهت تشخیص تفاوت‌ها، آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از مشاهدات ریخت‌شناسی انجام شد. نتایج آزمون PCA در خصوص مؤلفه‌های ریخت‌شناسی نشان داد که پنج جزء اول شامل ۵۴/۲۱ درصد از کل تفاوت‌ها در بین نمونه‌ها می‌باشند. شاخصه اول با میزان ۱۴/۹۷ درصد، شاخصه دوم ۱۱/۷۰ درصد و شاخصه سوم ۱۱/۳۴ درصد تفاوت را ایجاد می‌کردند. همان‌طور که مشاهده می‌گردد تفاوت بین شاخصه‌های اول تا سوم چندان بالا نمی‌باشد که بنابراین می‌توان بیان نمود این صفات در بین نمونه‌های مورد بررسی قدرت تشخیص بالایی ندارند. **تجزیه و تحلیل مولکولی:** ده عدد آغازگر ISSR بعد از بررسی تعداد ۲۱ آغازگر که بر روی سه نمونه چای که در این بررسی وجود نداشتند بر اساس قدرت

جهت مشخص نمودن پتانسیل آغازگرهای به‌کار رفته در بررسی حاضر میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرها محاسبه گردید که حداکثر میزان PIC برای آغازگر P8 به‌میزان ۰/۵۰ و حداقل آن برای آغازگرهای P11 و P16 به‌میزان ۰/۴۳ به‌دست آمد. محتوای اطلاعات چندشکلی کل نیز ۰/۴۸ محاسبه گردید. نکته قابل‌ذکر در رابطه با میزان محتوای اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای هم‌بارز مانند ISSR این است که حداکثر میزان PIC ۰/۵۰ می‌باشد و هر چه میزان PIC محاسبه شده به این میزان نزدیک‌تر باشد نشان از قدرت بالاتر نشانگر به‌کار برده در تفکیک و شناسایی تفاوت‌های نمونه‌های می‌باشد (۲۸). با توجه به آن‌که محتوای اطلاعات چندشکلی مابین صفر تا ۰/۵ باید باشد و هرچه مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی محاسبه شده به ۰/۵ نزدیک‌تر باشد بیانگر قدرت تفکیک بهتر نمونه است می‌توان بیان نمود که نشانگرهای به‌کار رفته دارای توانایی بسیار مناسبی برای تفکیک نمونه‌های چای داشتند. جهانگیرزاده و فلک‌رو (۱۱) میزان PIC را برای کاربرد نشانگر ISSR در گیاه چای در منطقه لاهیجان در محدوده ۰/۳۴ الی ۰/۵۰ با متوسط ۰/۴۵ گزارش کرده‌اند. جهانگیرزاده و همکاران (۱۶) در بررسی تنوع ژنتیکی لایم‌های ایران در منطقه جنوب که از یک جنس و گونه می‌باشند و تکثیر آن‌ها نیز عموماً بذری می‌باشد 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 می‌باشد. همان‌طور که از جدول ۳ مشخص است تمام آغازگرها دارای میزان PIC بالا می‌باشند که نشان از قدرت بالای آن‌ها در تفکیک و شناسایی تفاوت‌ها می‌باشد. شکل ۲ تعدادی از نمونه‌های تکثیر شده توسط نشانگر ISSR13 را نشان می‌دهد.

چاکرابورتی (۲۹) این میزان ۸۸/۵۴ درصد گزارش شده است. با توجه به قرارگیری درصد چندشکلی حاصله در این دامنه می‌توان بیان نمود این میزان چندشکلی در رابطه با ژنوتیپ‌های چای تحت کشت در ایران قابل‌قبول می‌باشد. یائو و همکاران (۳۶) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای سه کشور چین، ژاپن و کره در صد چندشکلی به‌شدت بالایی گزارش نمودند (۹۹/۷ درصد) که این مورد با توجه به گستره مناطق نمونه‌گیری نه تنها ردکننده درصد چندشکلی حاصل از این بررسی نمی‌باشد زیرا زمانی که به نتایج حاصل از هر کشور به تنهایی مراجعه می‌گردد درصدهای چندشکلی کاهش یافته و به دامنه به‌دست آمده در بررسی حاضر نزدیک می‌گردد به‌طوری‌که برای کشور چین که چهار منطقه چایکاری مورد نمونه‌برداری قرار گرفته است دامنه درصد چندشکلی از ۵۴/۲ تا ۸۸/۲ قرار دارد و با توجه به آن‌که گیاهان چای ایرانی نیز منشأ چینی دارند مشاهده می‌گردد که درصد چندشکلی به‌دست آمده در این بررسی به شدت به حداکثر به‌دست آمده در کشور چین نزدیک می‌باشد. متوسط تعداد باند برای هر آغازگر ۸/۵۷ و متوسط تعداد باند چندشکل برای هر آغازگر ۷/۱۴ باند بود. آغازگر P5 با تولید ۱۲ باند و آغازگر P2 با تولید ۷ باند بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد باند تولیدی کل را داشتند. آغازگرهای P5 و P1 با تعداد باندهای ۱۰ و ۴ عدد (به‌ترتیب) بیش‌ترین تعداد باند چندشکل را داشتند. در دو آغازگر P3 و P6 نیز ۱۰۰ درصد باندهای تولیدشده دارای حالت چندشکل بودند. دامنه تغییرات درصد چندشکلی از ۵۰ درصد تا ۱۰۰ بود که در مطالعه توماس و همکاران (۳۲) نیز دامنه مشابهی گزار شده است. قطعات تکثیرشده از نظر اندازه در دامنه ۱۰۰bp تا ۲۰۰۰bp بودند ولی دامنه قطعات قابل بررسی در محدوده ۲۰۰bp تا ۱۵۰۰bp بودند در مطالعه بن بینگ و همکاران (۳) نیز دامنه قطعات تکثیر توسط نشانگر ISSR نیز همین دامنه بوده است.



شکل ۲- تعدادی از نمونه‌های تکثیرشده توسط نشانگر ISSR13

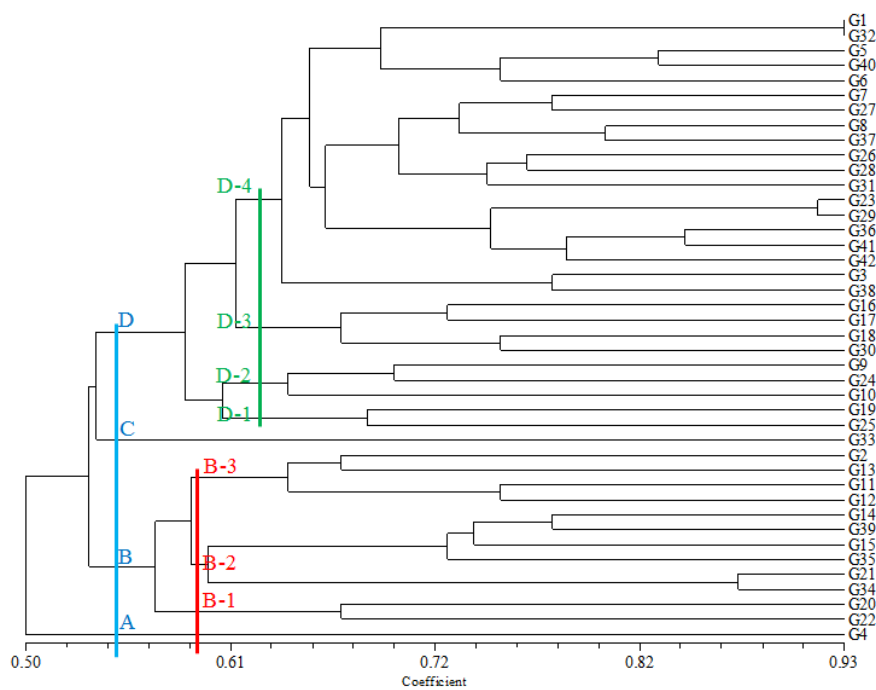
Fig. 2. Some amplified fragment by used of ISSR13.

یائو و همکاران (۳۶) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای سه کشور چین، ژاپن و کره دامنه تشابه را در محدود ۰/۵۴ تا ۰/۱۶ به دست آوردند که این میزان از مقدار محاسبه شده در پژوهش پیشرو کم تر می باشد که دلیل آن به گستردگی دامنه مورد بررسی در مطالعه آنها باز می گردد. بالا بودن میزان تشابه به دست آمده (۰/۹۳) با مطالعات کافکاس و همکاران (۱۹) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه چای در کشور ترکیه با استفاده از نشانگر AFLP همخوانی دارد. آنها حداکثر میزان تشابه را ۹۲ درصد محاسبه نمودند که با توجه به وارد شدن گیاه چای به این دو کشور (ایران و ترکیه) این مورد قابل پذیرش می باشد که میزان تشابه بالایی بین نمونه‌ها با توجه به تکثیر بذری این گیاه در گذشته به دست آید. بن یینگ و همکاران (۳) نیز با کاربرد نشانگرهای ISSR در بررسی گیاه چای در منطقه یونان کشور چین میزان تشابه را در همین محدود (متوسط تشابه ۰/۵۱) به دست آوردند که با توجه به آن که گیاه چای کشت شده در ایران دارای منشأ از کشور چین می باشد این موضوع نشان از رابطه بالای نمونه‌های کشت شده در ایران دارد.

جهت مشخص نمودن بهترین ضریب برای محاسبه ماتریس تشابه دو به دو و تجزیه خوشه‌ای ضریب کوفتیک برای سه ضریب دایس، جاکارد و تشابه ساده محاسبه گردید و ضریب تشابه ساده دارای بالاترین میزان ضریب کوفتیک بود (۰/۷۸). این ضریب نشان می دهد چه میزان از اطلاعات ماتریس تشابه محاسبه شده به خوشه‌ای طراحی شده منتقل شده اند. بر این اساس ضریب تشابه ساده برای محاسبه ماتریس تشابه و الگوریتم UPGMA برای طراحی کلاستر مورد استفاده قرار گرفتند. میزان تشابه نمونه‌ها با استفاده از ضریب تشابه ساده صورت پذیرفت و حداکثر تشابه و حداقل تشابه به دست آمده به ترتیب ۰/۹۳ و ۰/۲۸ بود (به ترتیب) و متوسط میزان تشابه ۰/۶۰ محاسبه گردید. حداکثر میزان تشابه بین دو نمونه G1 (ژنوتیپ ۲۶۹) و G32 (ژنوتیپ ۲۶۲) و حداقل این میزان بین دو نمونه G4 (ژنوتیپ ۲۷۸) و G13 (ژنوتیپ ۴۶۸) به دست آمد. این میزان تشابه با توجه به نتایج بخش ریخت‌شناسی قابل قبول می باشد و این دو نشانگر یکدیگر را تأیید می نمایند که می توان از این موضوع برداشت نمود که دو روش ریخت‌شناسی و آغازگر ISSR برای شناسایی و تفکیک درون جنس *Camellia* مناسب می باشد.

بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR، توسط ضریب تشابه ساده و الگوریتم UPGMA نمونه‌ها مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند. در کلاستر به دست آمده در

سطح تشابه حدود ۵۵ درصد نمونه‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. شکل ۳ نمودار حاصل از داده‌های ISSR و نحوه قرارگیری نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

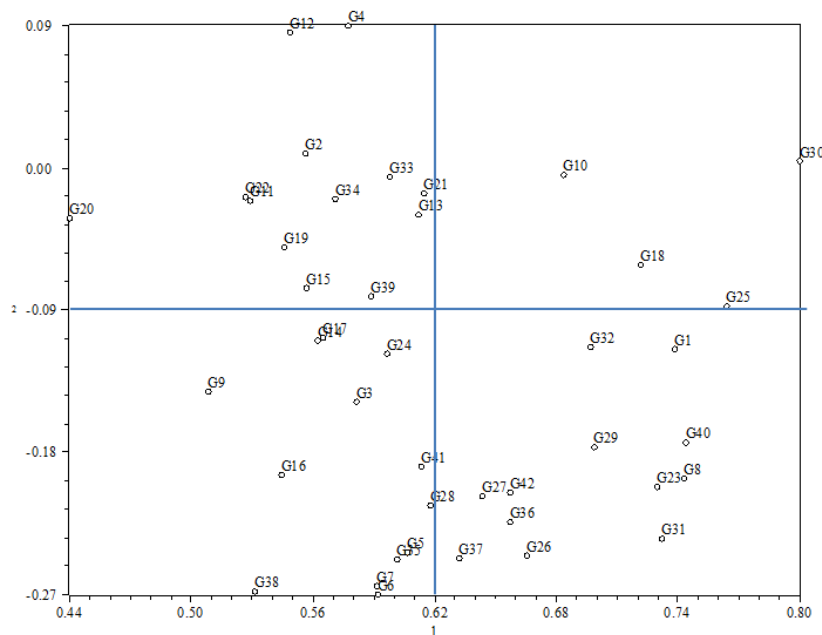


شکل ۳- نمودار ۴۲ نمونه چای با استفاده از نشانگرهای ISSR به روش UPGMA.

Fig. 3. Dendrogram of 42 tea samples using ISSR markers based on UPGMA.

تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها توسط نشانگر ISSR عدم پیروی گروه‌بندی‌ها از یک الگوی خاص جغرافیایی بود که در تجزیه ریخت‌شناسی نیز این حالت مشاهده شد. در تجزیه D-plot (شکل ۴) مشخص گردید که نمونه‌ها از الگوی خاصی جغرافیایی پیروی نمی‌کنند که این موضوع تأییدی مجدد بر تجزیه کلاستر حاصل از داده‌های ISSR می‌باشد که گروه‌بندی نمونه‌ها از الگوی جغرافیایی پیروی نکرد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مشخص گردید که پنج شاخصه اول ۷۲/۹۸ درصد تفاوت‌ها را ایجاد می‌نمودند. شاخصه اول با میزان ۵۳/۹۳ درصد بالاترین تأثیر را داشت و در ادامه شاخصه دوم ۸/۰۲ درصد و شاخصه سوم ۴/۵۲ درصد تفاوت را ایجاد می‌کردند. این نتایج، نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشانگر ISSR را تأیید می‌نماید.

بر اساس داده‌های مولکولی در تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها در سطح تشابه ۰/۵۵ به چهار گروه تقسیم شدند که دو گروه اول (A) و گروه سوم (C) هر کدام دارای یک عضو بودند. گروه دوم (B) دارای ۱۲ عضو بود که در سطح تشابه ۶۰ درصد به سه زیرگروه تقسیم می‌گردید (B1، B2 و B3). گروه اصلی که در این تجزیه کلاستر قابل شناسایی بود گروه چهارم (D) با تعداد ۲۸ عضو (۶۶/۶۶ درصد کل نمونه‌های مورد بررسی) بود که این گروه نیز در سطح تشابه ۰/۶۳ به چهار زیرگروه قابل تقسیم بود. سه زیرگروه اول از نظر تعداد اعضا محدود بودند (D1=۲ عضو، D2=۳ عضو و D3=۴ عضو) اما زیرگروه چهارم (D4) بیش‌تر اعضای این گروه را در بر داشت (۶۷/۸۷ درصد اعضا گروه چهارم). نکته بسیار مهم حاصل از



شکل ۴- نمودار D-plot حاصل بر اساس نشانگرهای ISSR از ۴۲ نمونه چای.

Fig. 4. D-plot that generated based ISSR marker data of 42 of tea samples.

نمی‌دهد. البته برای بیان این موضوع به‌طور دقیق و با دقت بالاتر نیاز به بررسی تعداد نمونه‌های بیشتر، بررسی جمعیتی مناطق مختلف و همچنین نشانگرهای بیشتر و با دقت بالاتر مانند SSR و AFLP می‌باشد. انتظار بر این است که نتایج این پژوهش، پژوهشگران را در طراحی برنامه‌های اصلاحی برای اهداف خاص مانند معرفی ارقام جدید دارای عملکرد بالا و کنترل تنش‌های زنده و غیره‌زنده در تخمین و مشخص نمودن تلاقی‌های مناسب‌تر یاری رساند.

نشانگرهای ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی در منابع ژرمپلاسم چای بسیار موثر بوده است (۳، ۲۲ و ۲۹). این نشانگر مولکولی به تشخیص رابطه ژنتیکی بین افراد دارای رابطه نزدیک حساس است (۳۴). نتایج حاصل از کاربرد نشانگر ISSR در بررسی میزان تنوع بین ژنوتیپ‌های چای بیان می‌دارد که اختلافات زیادی بین تک‌نمونه‌های چای کشت‌شده در مناطق چای‌کاری وجود ندارد و اگر تفاوت جزئی نیز مشاهده می‌گردد این تفاوت با پراکنش جغرافیایی ارتباطی نشان

منابع

1. Ahmadishad, M.A., Kazemitabar, S.K., Babaeian Jelodar, N.A., Gholami, M. and Kazemi Poshtmasari, H. 2009. An Assessment of genetic diversity in cultivated tea (*Camellia sinensis* L.) clones in Iran using RAPD markers, J. Crop Breed. 1: 4. 65-76. (In Persian)
2. Balasaravanan, T., Pius, P.K., Kumar, R.R., Muraleedharan, N. and Shasany, A.K. 2003 Genetic diversity among south Indian tea germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) using AFLP markers. Plant Sci. 165: 2. 365-372.
3. Ben-Ying, L.I.U., You-Yong, L.I., Yi-Chun, T.A.N.G., Li-Yuan, W.A.N.G., Cheng, H. and Ping-Sheng, W.A.N.G., 2010. Assessment of genetic diversity and relationship of tea germplasm in Yunnan as revealed by ISSR markers. Acta Agro. Sinic. 36: 3. 391-400.

4. Chen, J., Wang, P., Xia, Y., Xu, M. and 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. *Gen. Res. Crop Evol.* 52: 1. 41-52.
5. Chen, L., Gao, Q.K., Chen, D.M. and Xu, C.J. 2005. The use of RAPD markers for detecting genetic diversity, relationship and molecular identification of Chinese elite tea genetic resources [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] preserved in a tea germplasm repository. *Biodiver. Conserv.* 14: 6. 1433-1444.
6. Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant. Mol. Boil. Rep.* 1: 4. 19-21.
7. Doebley, J. 1989. Isozymic evidence and the evolution of crop plants. In: Soltis D.E. and Soltis P.S. (eds), *Isozymes in Plant Biology*, Dioscorides, Portland, OR, Pp: 165-191.
8. Graham, J., McNicol, R.J. and McNicol, J.W. 1996. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theor. Appl. Gen.* 93: 402-406.
9. Hedric, P.W. 1998. *Genetic of population*. Arizona State University. 553p.
10. IPGRI. 2000. *Descriptors for tea*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, Available at: <http://www.cgiar.org/ipgri/>
11. Jahangirzadeh Khiavi, Sh. and Falakro. K. 2017. Investigation of Genetic Diversity between Tea Shrubs Based on ISSR Markers, The first National Conference of Ecology, Diversity and Plant Conservation, 2017.02.15, Tehran, Iran. (In Persian)
12. Jahangirzadeh Khiavi, Sh. and Ashourpour, M. 2017. Characterization of the Genetic Relationships among some of Iranian Apple Genotypes Using RAPD Markers, *J. Agri. Comm.* 5: 2. 1-7.
13. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Azadi Gonabd, R., Falakro, K. and Nasrolahzadeh, S. 2018. Assessment of genetic diversity among some selected tea genotypes from west of Mazandaran using morphological markers, 1st national congress of horticulture and crop production, 2018, jan, 25, Gonbad Kavous university, Gonbad Kavous, Iran. (In Persian)
14. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Falakro. K., Chaichi Siahkali, H. and Keshavarzi, Sh. 2016. Study of Diversity between Tea Genotypes in Lahijan Region, The third international and sixth national conference of medical herbs and stable agriculture. 2016.12.01. Hamedan. Iran. (In Persian)
15. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Hamid Oghli, Y., Golein, B. and Sabouri, S. 2016. Study of genetic diversity of some Iranian acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes using AFLP marker, *Plant. Prod. Res. J.* 23: 3. 81-96. (In Persian)
16. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Hamid oghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. 2016. Assessment of Genetic Diversity in Some Limes in Three Regions of Iran, Using Morphological and ISSR Markers, *J. Agri. Comm.* 4: 3. 18-29.
17. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Hamid oghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. 2015. Evaluation of genetic diversity in Acid Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes using AFLP Markers, *Aust. J. Crop Sci.* 9: 10. 996-1002.
18. Jahangirzadeh Khiavi, Sh., Pishdad, A., Mohaghegh Montazeri, M. and Mozafari, S. 2017. Assessment of Genetic Variation among Some Tea Genotypes from Lahijan by using Morphological Markers, 1st international conference and 10th national horticulture science congress of Iran. 4-7 September, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (In Persian)
19. Kafkas, S., Ercisxli, S., Dogan, Y., Erturk, Y., Haznedar, A. and Sekban, R. 2009. Polymorphism and genetic relationships among tea genotypes from turkey revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134: 428-434.

20. Karkousis, A., Barr, A.R., Chalmers, K.J., Ablett, G.A., Holton, T.A., Henry, R.J., Lim, P. and Langridge, P. 2003. Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian Barley germplasm. *Aust. J. Agric. Res.* 54: 1197-1210.
21. Khadivi-Khub, A., Jahangirzadeh, Sh., Zamani, Z., Ahadi, E. and Aliyoun Nazari, S. 2014. Nuclear and chloroplast DNA variety and phylogeny of Iranian apples (*Malus domestica*). *Plant System. Evol.* 1: 300: 8. 1803-17.
22. Liu, B.Y., Wang, L.Y., Li, Y.Y., He, W., Zhou, J. and Wang, P.S. 2009. Genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) germplasms as revealed by ISSR markers. *Ind. J. Agric. Sci.* 79: 9. 715-721.
23. Ma, J.Q., Yao, M.Z., Ma, C.L., Wang, X.C. and Jin, J.Q. 2014. Construction of a SSR-based genetic map and identification of QTLs for catechins content in tea plant (*Camellia sinensis*). *Plos. One.* 9: 3. e93131.
24. Rajanna, L., Ramakrishnan, M. and Simon, L. 2011. Evaluation of morphological diversity in south Indian tea clones using statistical methods. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 5: 1. 1-12.
25. Ramakrishnan, M., Rajanna, L., Narayanaswamy, P. and Simon, L. 2009. Assessment of genetic relationship and hybrid evaluation studies in tea (*Camellia* sp.) by RAPD. *Int. J. Plant Breed.* 3: 144-148.
26. Rani, A., Singh, K., Ahuja, P.S. and Kumar, S. 2012. Molecular regulation of catechins biosynthesis in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Gene.* 495: 205-210.
27. Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate analysis system, Exeter software. Setauket. New York.
28. Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J., Coll, R., Van-Eijk, M.J.T. and De-Loose, M. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2 AFLP characterizations. *Molec. Breed.* 6: 593-602.
29. Roy, S.C. and Chakraborty, B.N. 2009. Genetic diversity and relationships among tea (*Camellia sinensis*) cultivars as revealed by RAPD and ISSR based fingerprinting. *Ind. J. Biotech.* 8: 4. 370-376.
30. Song, Z.P., Xu, X., Wang, B., Chen, J.K. and Lu, B.R. 2003. Genetic diversity in the northernmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1492-1499.
31. Teixeira da Silva, J.A. 2005. Molecular markers for phylogeny, breeding and ecology in agriculture. In: Thangadurai, D., Pullaiah, T., Tripathy, L. (Eds) *Genetic Resources and Biotechnology (Vol. III)*, Regency Publications, New Delhi, India, Pp: 221-256.
32. Thomas, J., Vijayan, D., Joshi, S.D., Lopez, S.J. and Kumar, R.R., 2006. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats. *J. Biotech.* 123: 2. 149-154.
33. Tu, M., Lu, B.R., Zhu, Y. and Wang, Y. 2007. Abundant within-varietal genetic diversity in rice germplasm from Yunnan Province of China revealed by SSR fingerprints. *Biochem. Genet.* 45: 789-801.
34. Wolfe, A.D. 1998. Contributions of the polymerase chain reaction to plant systematics. *DNA Sequencing*, Pp: 43-86.
35. Wright, W. 1962. Tea classification revised. *Curr. Sci. Bangalore*, 31: 298-299.
36. Yao, M.Z., Chen, L. and 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 prog. *Plant Breed.* 127: 166-172.

