Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Evaluation of genetic diversity of some tea genotypes attributed to Darjeeling in Iran using ISSR markers

Shahin Jahangirzadeh Khiavi[1], Reza Azadi[*2]

1. Assistant Prof., Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran. E-mail: shjahangirzadeh@gmail.com
2. Corresponding Author, Assistant Prof., Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran. E-mail: azadi_g@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 01.15.2023
Revised: 02.07.2023
Accepted: 04.25.2023

Keywords:
Camelia,
Cluster Analysis,
Genetic diversity,
Polymorphic Information Content (PIC),
Primer

ABSTRACT

Background and Objectives: Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) is the most consumed beverage in the world after water and an important commercial plant with economic value in northern Iran. Over the years, various tea plants have been cultivated in Iran's tea gardens by seed method, which has led to a high diversity in them. Since most gardeners have propagated the plant sexually, tea gardens vary in quality. Therefore, determining the genetic diversity and relatedness of plants has an important role to support breeding and breeding programs.

Materials and Methods: In this study, 28 tea plants attributed to Darjeeling region along with eight Iranian samples and eight samples imported from Sri Lanka were investigated for genetic diversity using ISSR markers. After sampling from young and fully developed leaves, their genomic DNA was extracted and 16 ISSR markers were used to investigate the genetic relationships of 44 tea samples. The obtained data were analyzed by the simple similarity coefficient for the ISSR markers and the cluster was designed based on the UPGMA algorithm. Population structure analysis was also done by POPGENE program.

Results: The use of 16 ISSR primers produced 158 bands, of which 116 bands showed polymorphism, and based on this, the percentage of polymorphism was calculated as 73.42%. The PIC test showed a range of 0.45 to 0.50 and this indicator was 0.49 for all markers. The results of Cophentic test showed that SM similarity coefficient and UPGMA algorithm are the most suitable for cluster analysis. Based on the obtained data, the range of similarity was found in the range of 0.376 to 0.880 with an average of 0.626. In the cluster analysis, the samples were divided into two groups at the similarity level of 0.56, and the first group is the largest group, which can be divided into two subgroups. In the population structure analysis, the indicators of Observed number of alleles, Effective number of alleles, Nei's gene diversity and Shannon's Information index in populations and total population were calculated as 1.928, 1.641, 0.364 and 0.532, respectively. The total diversity, average intrapopulation diversity, level of population subdivision were also obtained as 0.380, 0.330 and 0.130 respectively. The maximum similarity was between the samples attributed to Darjeeling and selected Iranian samples.

Conclusion: Based on the obtained data, it was determined that there are significant changes among the investigated samples based on the ISSR

markers. The percentage of polymorphism and polymorphism information content of the used markers indicated that these markers have a high ability to identify diversity among tea genotypes. Also, the results of this study stated that tea genotypes in Iran have high genetic diversity because they are mostly sexually propagated. This level of variation found between samples suggests that tea from different companies or regions is of better quality, not entirely due to genotype, but rather the ecology in which the tea is grown in terms of climate and soil characteristics, as well as processing technology. At the same time, this genetic difference can be used in breeding studies.

Cite this article: Jahangirzadeh Khiavi, Shahin, Azadi, Reza. 2024. Evaluation of genetic diversity of some tea genotypes attributed to Darjeeling in Iran using ISSR markers. *Journal of Plant Production Research*, 31 (2), 47-63.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20980.3001
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های چای منسوب به دارجلینگ در ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[۱]، رضا آزادی[*۲]

۱. استادیار، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.
رایانامه: shjahangirzadeh@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.
رایانامه: azadi_g@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۵
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۵

واژه‌های کلیدی:
آغازگر،
تجزیه خوشه‌ای،
تنوع ژنتیکی،
محتوای اطلاعات چندشکلی،
Camelia

چکیده

سابقه و هدف: چای (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) بعد از آب پرمصرف‌ترین نوشیدنی در سطح جهان بوده و یک گیاه تجاری مهم با ارزش اقتصادی در شمال ایران است. در طول سال‌ها گیاهان چای مختلفی در باغ‌های چای ایران به روش بذری کشت شده‌اند که منجر به ایجاد تنوع بالایی در آن‌ها شده است. از آن‌جایی‌که بیش‌تر باغداران از طریق جنسی این گیاه را تکثیر کرده‌اند، باغ‌های چای از نظر کیفیت متفاوت هستند. بنابراین، تعیین تنوع ژنتیکی و ارتباط گیاهان برای حمایت از برنامه‌های اصلاح و کشت نقش مهمی دارد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ درختچه چای منسوب به منطقه دارجلینگ به همراه هشت نمونه ایرانی و هشت نمونه وارداتی از کشور سریلانکا با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان و کاملاً توسعه‌یافته، DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد و از ۱۶ عدد نشانگر ISSR برای بررسی روابط ژنتیکی ٤٤ نمونه چای استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده، توسط ضریب تشابه ساده برای نشانگر ISSR آنالیز شدند و کلاستر بر اساس الگوریتم UPGMA طراحی شد. آنالیز ساختار جمعیتی نیز توسط برنامه POPGENE صورت پذیرفت.

یافته‌ها: استفاده از ۱۶ آغازگر ISSR منجر تولید ۱۵۸ باند شد که ۱۱۶ باند حالت چندشکلی نشان دادند و بر این اساس درصد چندشکلی ۷۳/٤۲ درصد محاسبه شد. آزمون PIC دامنه ۰/٤۵ تا ۰/۵۰ را نشان داد و این شاخصه برای کل نشانگرها ۰/٤۹ بود. نتایج آزمون کوفنتیک نشان داد که ضریب تشابه SM و الگوریتم UPGMA برای تجزیه کلاستر مناسب‌ترین است. بر اساس داده‌های به‌دست آمده دامنه تشابه در محدوده ۰/۳۷۶ تا ۰/۸۸۰ با متوسط ۰/٦۲٦

به‌دست آمد. در تجزیه کلاستر نمونه‌ها در سطح تشابه ۰/۵٦ به دو گروه تقسیم شدند که گروه اول بزرگ‌ترین گروه تشکیل شده که خود به دو زیر گروه قابل تفکیک است. در آنالیز ساختار جمعیتی شاخص‌های متوسط تعداد نوار مشاهده شده، متوسط تعداد نوار موثر، تنوع ژنتیکی نی و تنوع ژنتیکی شانون کل به‌ترتیب ۱/۹۲۸، ۱/٦٤۱، ۰/۳٦٤ و ۰/۵۳۲ محاسبه شد. تنوع کل، میانگین تنوع درون جمعیت و سطح تنوع بین جمعیت نیز به‌ترتیب ۰/۳۸۰، ۰/۳۳۰ و ۰/۱۳۰ به‌دست آمد. حداکثر تشابه نیز بین نمونه‌های منسوب به دارجلینگ و نمونه‌های گزینش شده ایرانی بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس داده‌های حاصل مشخص گردید که در بین نمونه‌های مورد بررسی بر اساس نشانگر ISSR تغییرات قابل‌توجهی مشاهده می‌شود. درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرهای بکار رفته بیان نمودند که این نشانگرها دارای توانمندی بالایی در شناسایی تنوع در بین ژنوتیپ‌های چای می‌باشند. هم‌چنین نتایج این بررسی بیان نمود که ژنوتیپ‌های چای موجود در ایران به‌دلیل آن‌که اکثراً به صورت جنسی تکثیر شده‌اند تنوع ژنتیکی بالایی دارند. این سطح از تنوع که مابین نمونه‌ها به‌دست آمد بیان می‌دارد که چای شرکت‌ها یا مناطق مختلف که از کیفیت بهتری برخوردار است، کاملاً به دلیل ژنوتیپ نیست، بلکه مناطق اکولوژیکی که چای در آن رشد می‌کند در ویژگی‌های آب و هوا و خاک و هم‌چنین فناوری فرآوری مؤثر است. در عین‌حال می‌توان از این تفاوت ژنتیکی در مطالعات اصلاحی استفاده کرد.

استناد: جهانگیرزاده خیاوی، شاهین، آزادی، رضا (۱۴۰۳). ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های چای منسوب به دارجلینگ در ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۱ (۲)، ۶۳-۴۷.
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20980.3001

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

کشور ایران به دلیل موقعیت جغرافیایی، ساختار خاک و تنوع آب و هوایی، دارای منابع گیاهی غنی است. این ویژگی‌ها باعث شده است ایران یکی از کشورهای پیشرو در جهان از نظر تنوع گیاهی باشد زیرا گونه‌های گیاهی زیادی دارد که به‌طور طبیعی رشد می‌کنند یا مرکز ژن بسیاری از آن‌ها است. ایران دارای اکولوژی متنوعی است که امکان کشت بسیاری از محصولات باغی با نیاز آب و هوایی معتدل، نیمه‌گرمسیری و گرمسیری در آن فراهم است. چای (*Camellia sinensis* L.) گیاهی است که از برگ و جوانه آن برای تولید نوشیدنی استفاده می‌شود. این گونه متعلق به خانواده Theaceae است که در آب و هوای مرطوب رشد می‌کند (۱، ۲، ۳). اگرچه منشأ آن از جنوب و جنوب‌شرقی آسیا است، اما در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در سراسر جهان نیز رشد می‌کند (٤). این گیاهان درختانی کوچک کم‌تر از ۲ متر و همیشه سبز هستند چای در ٤٥ کشور جهان در مساحت تقریبی ۵ میلیون و ٥٦١ هزار هکتار در جهان تولید می‌شود (۵). مهم‌ترین ویژگی گیاهان چای که در ایران کشت می‌شوند این است که باقی‌مانده سموم دفع آفات (که برای مبارزه با حشرات و قارچ‌ها استفاده می‌شود) به دلیل عدم کنترل شیمیایی و مواد افزودنی در کشت آن‌ها وجود ندارد. از سوی دیگر، چای ایران به ویژه برای مناطق تپه‌ای مناسب است و تقریباً به‌جز در ترکیه و ایران در هیچ کشور دیگری در زمستان برف در این نوع زمین‌های کشت چای وجود ندارد. این عوامل رشد باکتری‌ها را در گیاهان چای محدود می‌کند و امکان کشاورزی ارگانیک پایدار را فراهم می‌کند.

در کشورهای تولیدکننده چای، طبقه‌بندی گیاهان اصلاحی بر اساس تکنیک‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بسیار مهم است. در ایران، بیش‌تر باغ‌های چای از کاشت بذر ایجاد شده‌اند و اولین مطالعات انتخاب کلونال بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در دهه‌های اخیر صورت گرفته است. روش‌های سنتی شناسایی کلونال برای تعیین روابط ژنتیکی چای مانند سایر محصولات دگرگشن ناکافی هستند زیرا صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی تحت‌تأثیر شرایط محیطی و تغییرات تکاملی در مناطق ژنومی قرار دارند. با این‌حال، تکنیک‌های مولکولی، به‌ویژه آن‌هایی که مبتنی بر نشانگرهای DNA هستند، ظرفیت تفکیک فیلوژنتیکی را برای تعیین تنوع ژنتیکی برای اصلاح گیاهان فراهم می‌کنند. بسیاری از این تکنیک‌ها برای اصلاح و بهنژادی چای وجود دارد. در میان سیستم‌های نشانگر DNA مبتنی بر PCR، هزینه و زمان زیاد ریزماهواره‌ها و AFLP، و تکرارپذیری پایین RAPD از معایب عمده هستند (٦). با این‌حال، روش ISSR-PCR بر بیش‌تر این معایب غلبه می‌کند (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). روش ISSR یک روش بسیار ساده و سریع برای تعیین تنوع ژنتیکی است (۸، ۱۰، ۱۳، ١٤). نشانگرهای ISSR به‌طور گسترده‌ای برای بررسی روابط ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌های جنس کاملیا در ایران، هند، چین و تایوان، مانند سایر گیاهان استفاده شده است (۸، ۱۰، ۱۲، ۱۵، ١٦، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰).

با وجود آن‌که امروزه کشت و نگهداری ارقام کلونی به دلیل یکنواختی برگ سبز استحصالی و مدیریت راحت‌تر باغ‌های چای توصیه می‌گردد، با این‌حال، از آن‌جایی‌که تغییراتی در بین کلون‌های چای به دلیل تولیدمثل جنسی آن‌ها وجود دارد، باغ‌ها شامل مخلوطی از گیاهان چای با کیفیت و عملکرد متفاوت می‌باشند (۲۱) و بنابراین نیاز به مطالعات مربوط به ارتباط ژنتیکی این بوته‌ها به‌صورت کامل احساس می‌گردد. در مطالعه حاضر، نشانگرهای ISSR برای الف: تعیین تنوع ژنتیکی نمونه‌های چای منسوب به دارجلینگ برای ارائه اطلاعات ژنتیکی پایه برای اصلاح چای در ایران، ب: تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام چای معرفی شده ایرانی و نمونه‌های منسوب به دارجلینگ استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش تعداد ٤٤ نمونه گیاه چای شامل نمونه‌های بذری منسوب به منطقه دارجلینگ (۲۸ عدد) به همراه دو رقم چای کاشف و لاهیج و شش کلون گزینش شده به‌عنوان نمونه‌های چای ایرانی و هشت نمونه از کلون‌های وارداتی از سریلانکا به‌عنوان جمعیت وارداتی مورد آزمایش قرار گرفتند. جدول ۱ نمونه‌های به‌کار رفته، کد ثبت شده در پژوهشکده چای، محل نمونه‌گیری و کدبندی آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۱- نمونه‌های چای به‌کار 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
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR7	G23	*Camellia sinensis*	ایران Iran	280	G1
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR8	G24	*Camellia sinensis*	ایران Iran	256	G2
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR9	G25	*Camellia sinensis*	ایران Iran	468	G3
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR10	G26	*Camellia sinensis*	ایران Iran	440	G4
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR11	G27	*Camellia sinensis*	ایران Iran	لاهیج Lahij	G5
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR12	G28	*Camellia sinensis*	ایران Iran	کاشف Kashef	G6
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR13	G29	*Camellia sinensis*	ایران Iran	455	G7
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR14	G30	*Camellia sinensis*	ایران Iran	548	G8
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR15	G31	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	DN	G9
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR16	G32	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	3015	G10
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR17	G33	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	DG7.1	G11
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR18	G34	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	DG7	G12
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR19	G35	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	DG39	G13
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR20	G36	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	3020	G14
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR21	G37	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	KEN	G15
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR22	G38	*Camellia sinensis*	سریلانکا Sri Lanka	B275	G16
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR23	G39	*Camellia* sp.	دارجلینگ Darjeeling	DR1	G17
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR24	G40	*Camellia* sp.	دارجلینگ Darjeeling	DR2	G18
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR25	G41	*Camellia* sp.	دارجلینگ Darjeeling	DR3	G19
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR26	G42	*Camellia* sp.	دارجلینگ Darjeeling	DR4	G20
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR27	G43		دارجلینگ Darjeeling	DR5	G21
Camellia sinensis	دارجلینگ Darjeeling	DR28	G44	*Camellia* sp.	دارجلینگ Darjeeling	DR6	G22

استخراج DNA و آنالیز مولکولی: جهت استخراج DNA از روش دلاپورتا (۲۲) با اندکی تغییر استفاده گردید. جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده از روش اسپکتوفتومتر و دستگاه نانودراپ استفاده گشت و برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد و ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد.

تعداد ۳۰ عدد آغازگر ISSR برای این بررسی بر روی نمونه‌ها و جهت بهینه‌سازی و انتخاب بهترین آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت ۱۶ عدد از آن‌ها که بهترین، قوی‌ترین و تکرارپذیرترین تکثیر را داشتند، جهت ادامه بررسی برگزیده شدند. توالی آغازگرهای ISSR به‌کار رفته در جدول ۲ آورده شده است. جهت اجرای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ترکیب مواد در داخل هر واکنش شامل DNA الگو ۵۰ng، بافر PCR (۱۰X) به میزان ۱/۲۵µl، کلرید منیزیم ۲mM، از هر dNTP به میزان ۰/۲mM، آنزیم Taq پلی‌مراز به میزان یک واحد و ۰/۷۵µM از آغازگر بود که در نهایت توسط آب مقطر به حجم ۱۲/۵µl رسانده شد. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای آغازگرها نیز به صورت زیر تنظیم شد: ابتدا محلول واکنش به‌مدت ٤ دقیقه در دمای ۹٤ 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: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و سی ثانیه بود و در نهایت برای تکثیر و گسترش نهایی محلول واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هفت دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler استفاده گردید.

محصولات تکثیر شده به نسبت ۵ 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 به‌مدت ۱۲۰ دقیقه تفکیک گردیدند و زیر نور UV توسط دستگاه ژل داک بیومترا (Biometra) از ژل حاصل عکس‌برداری شد.

تجزیه آماری: باندهای چند شکل غیرمبهم و دارای وضوح بالا در ژل آگارز آغازگرها بر اساس وجود و عدم وجود به‌صورت صفر و 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 ...) است و هم‌چنین باندهای یک شکل در این نمره‌دهی قرار نگرفتند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)[2] 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 iام هنگام وجود و $(1-f_i)$ فراوانی قطعه نشانگر iام در حالت عدم وجود باند است (۲۳). 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. از همین داده‌ها برای محاسبه فراوانی‌های آللی (na)، تعداد آلل مؤثر (ne)، شاخص شانون (I)، تنوع درون‌جمعیتی (Hs) تنوع کل (Ht) و نسبت تنوع بین جمعیتی به تنوع کل (Gst) به‌وسیله نرم‌افزار Popgene استفاده شد.

1- Gel red
2- Polymorphic Information Content (PIC)

جدول ۲- توالی آغازگرهای به‌کار رفته در بررسی و اطلاعات آماری آن‌ها.

Table 2. Primer sequences used in experiments.

شمار آغازگر Primer No.	توالی آغازگر Primer sequence	تعداد کل قطعات Total No. of fragments	تعداد قطعات چندشکلی No. of polymorphic fragment	درصد چندشکلی Polymorphic percent	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic Information Content (PIC)
ISSR1	ACACACACACACACACC	8	4	50.00	0.50
ISSR2	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	7	6	85.71	0.49
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGAGYC*	8	8	100.00	0.49
ISSR4	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	8	7	87.50	0.47
ISSR5	CAGCAGCAGCAGCAGCAGT	12	10	83.33	0.49
ISSR6	GGAGAGGAGAGGAGAGGAGA	8	8	100.00	0.45
ISSR7	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	9	7	77.78	0.50
ISSR8	TGTGTGTGTGTGTGTGG	11	6	54.55	0.49
ISSR9	CAACAACAACAACAACAAG	17	11	64.71	0.46
ISSR10	GAGAGAGAGAGAGAGAC	9	9	100.00	0.50
ISSR11	CTCTCTCTCTCTCTCTRA**	7	5	71.43	0.46
ISSR12	GATAGATAGATAGATA	10	7	70.00	0.46
ISSR13	TCTCTCTCTCTCTCTCC	11	7	63.64	0.47
ISSR14	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	13	9	69.23	0.45
ISSR15	ACACACACACACACACYC	9	7	77.78	0.47
ISSR16	ACACACACACACACACYG	11	5	45.45	0.48
جمع Sum.	-	158	116	73.42	0.49
میانگین Av.	-	9.88	7.25		

*Y: (C, T)
**R: (A, G)

نتایج و بحث

نتایج تکثیر ISSR: امروزه انجام تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی برای داشتن اطلاعاتی در مورد تغییراتی که ممکن است در مورد استفاده پایدار و وضعیت آینده منابع ژنتیکی گیاهی رخ دهد، برای ارزیابی روند تکاملی یک جمعیت و حفاظت از گونه‌ها مهم است (۲٤). بسیاری از تکنیک‌های نشانگر مولکولی DNA مبتنی بر فناوری PCR در توصیف منابع ژن گیاهی توسعه یافته‌اند.

شناخته‌شده‌ترین تکنیک‌های نشانگر DNA که توسط بسیاری از پژوهش‌گران مورد استفاده قرار می‌گیرد عبارت‌اند از ISSR، RAPD، AFLP و SRAP. تکنیک نشانگر مولکولی ISSR، که اغلب در زمینه‌های تنوع ژنتیکی، برچسب‌گذاری ژن، مطالعات فیلوژنتیک، نقشه‌برداری ژنوم و زیست‌شناسی تکاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد، یکی از ارجح‌ترین روش‌ها به‌ویژه به‌دلیل سهولت کاربرد و تکرارپذیری آن است (۲۵، ۲٦، ۲۷). علاوه‌بر این، این واقعیت که نشانگرهای ISSR نسبت به سایر نشانگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی کارآمدتر هستند و توانایی آن‌ها در تولید نوارهای چندشکلی بیش‌تر، کاربرد این نشانگرها را افزایش می‌دهد (۲۸). پژوهش‌ها نشان داد

که انواعی که با نشانگرهای RAPD قابل تفکیک نیستند، با نشانگرهای ISSR قابل جداسازی هستند (۲۹). این یافته نشان می‌دهد که سرعت تکامل ISSRها ممکن است سریع‌تر از RAPD در نمونه‌های چای مورد مطالعه باشد. بنابراین، تکنیک نشانگر ISSR برای استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی انواع چای نزدیک به هم مناسب است. مطالعات مختلف هم‌چنین نشان داده است که نشانگرهای ISSR سطوح بالاتری از چندشکلی را در مقایسه با نشانگرهای RAPD نشان می‌دهند (۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳).

در این مطالعه، از هشت کلون انتخابی ایرانی ، هشت کلون چای وارداتی از سریلانکا، و ۲۸ نمونه برون منسوب به دارجلینگ استفاده کردیم. DNA ژنومی از تمامی نمونه‌ها استخراج شد. به دلیل کیفیت متفاوت نمونه‌ها در شرایط مختلف، غلظت‌های مختلفی از DNA استخراج شده (از ۱۲۸ تا ۳۱۵ نانوگرم در میکرولیتر) را به‌دست آوردیم. برای تعیین شباهت ژنتیکی ٤٤ نمونه انتخاب شده موجود در کلکسیون چای پژوهشکده چای مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، ۳۰ آغازگر ISSR را آزمایش کردیم. از این میان، ١٦ آغازگر با توجه به آغازگرهایی که بیش‌ترین باندهای چندشکلی را دادند و قطعات PCR قابل امتیاز گیری را تولید کردند، انتخاب شدند. از نظر اندازه در دامنه ۱۰۰bp تا ۲۰۰۰bp بودند ولی دامنه قطعات قابل بررسی در محدوده ۲۰۰bp تا ۱۵۰۰bp بودند در مطالعه بن ییینگ و همکاران (۱۵) نیز دامنه قطعات تکثیر توسط نشانگر ISSR نیز همین دامنه بوده است. اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است. باندهای چندشکل غیرمبهم و دارای وضوح بالا در ژل آگارز آغازگرها بر اساس وجود و عدم وجود به‌صورت صفر و یک نمره‌دهی شدند. باندهای نامشخص و دارای وضوح کم که نشانه عدم تکثر مطلوب به دلایل متفاوت (مانند عدم اتصال صحیح آغازگر، یا رقابت جایگاه‌های اتصال آغازگر و ...) است و هم‌چنین باندهای یک شکل در این نمره‌دهی قرار نگرفتند.

در این مطالعه تعداد کل نوارهای به‌وضوح قابل‌مشاهده ۱۵۸ بود که ١١٦ مورد از آن‌ها چندشکل بودند. تعداد باندهای چندشکلی ISSR بین ٤ تا ١١ متغیر بود که حداقل و حداکثر تعداد باندها به‌ترتیب توسط آغازگرهای P1 و P9 به‌دست آمد. آغازگر P16 با میزان ٤٥/٤٥ کم‌ترین چندشکلی را نشان داد، در حالی‌که آغازگرهای P3، P6 و P10 با میزان ۱۰۰ درصد بیش‌ترین چندشکلی را نشان دادند. در صد چندشکلی کل ٧٣/٤٢ بود که با مطالعات خیاوی و همکاران (۱۸) نزدیکی بالایی داشت آن‌ها در بررسی تنوع بوته‌های چای ایرانی با نشانگر ISSR این عدد را ٧٨/٢٦ درصد محاسبه نموده‌اند. با مقایسه نتیجه به‌دست آمده و نتایج بررسی‌های پیشین بر روی گیاه چای (۱۲، ۱۸، ۱۹، ٣٤) این میزان درصد محاسبه شده، قابل‌قبول است.

یکی از شاخصه‌هایی که برای تعیین توانایی و پتانسیل آغازگرها برای مشخص نمودن تفاوت‌های ژنتیکی مابین نمونه‌های مورد بررسی استفاده می‌شود شاخصه میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) است که در این بررسی نیز موزد توجه قرار گرفت و مطالعه شد که حداکثر میزان PIC برای آغازگرهای P1، P7 و P10 به میزان ۰/۵۰ و حداقل آن برای آغازگرهای P6 و P14 به میزان ۰/٤٥ به‌دست آمد. محتوای اطلاعات چندشکلی کل نیز ۰/٤٩ محاسبه گردید. نکته قابل ذکر در رابطه با میزان محتوای اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای هم بارز مانند ISSR این است که حداکثر میزان PIC ۰/۵۰ است و هرچه میزان PIC محاسبه شده به این میزان نزدیک‌تر باشد نشان از قدرت بالاتر نشانگر به‌کار برده در

تفکیک و شناسایی تفاوت‌های نمونه‌های است (۱۸). 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 همکاران (۱۸) این میزان را در بررسی تنوع بوته‌های چای با استفاده از نشانگرهای ISSR در دامنه ۰/٤۳ تا ۰/۵۰ با میزان PIC کل را ۰/٤۸ گزارش کرده‌اند. جهانگیرزاده و فلک‌رو (۳٤) میزان PIC را برای کاربرد نشانگر ISSR در گیاه چای در منطقه لاهیجان در محدوده ۰/۳٤ تا ۰/۵۰ با متوسط ۰/٤۵ گزارش کرده‌اند. هردوی این منابع اعلام داشته‌اند که این محدوده از میزان PIC نشان‌دهنده توانایی بالای این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاه مورد بررسی است. همان‌طور که از جدول ۲ مشخص است تمام آغازگرها دارای میزان PIC بالا می‌باشند که نشان از قدرت بالای آن‌ها در تفکیک و شناسایی تفاوت‌ها است.

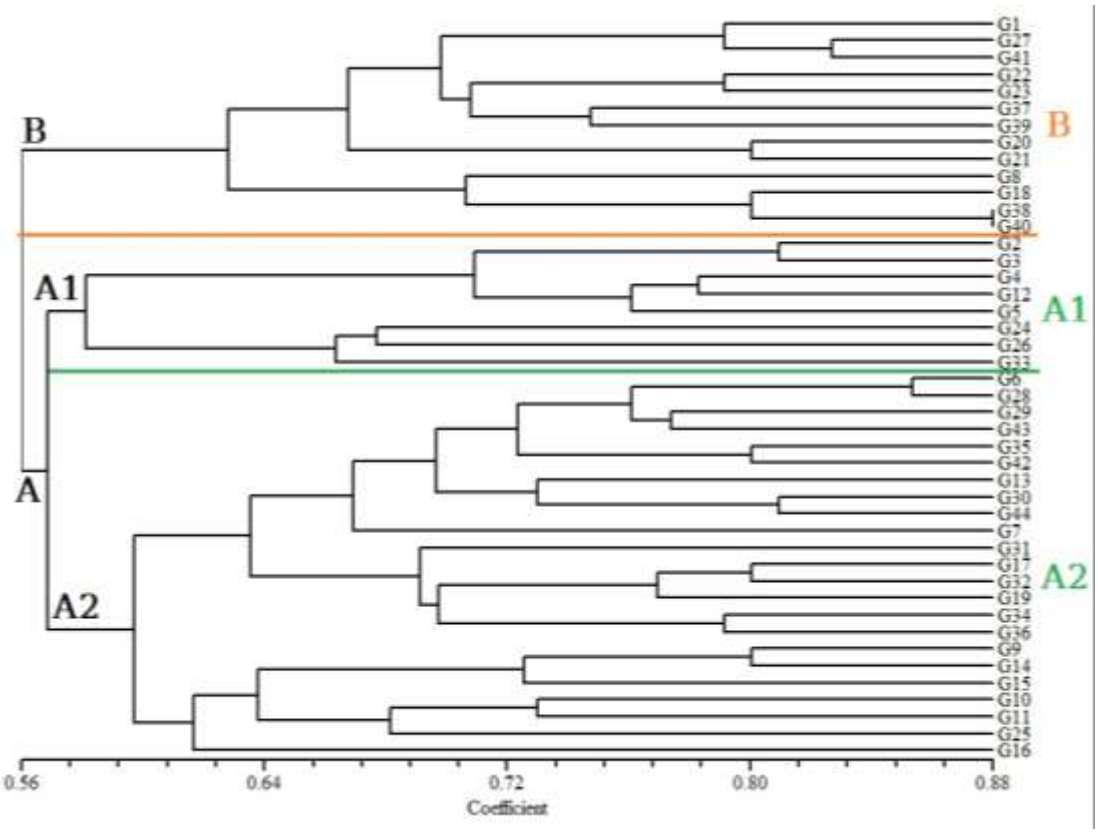
ماتریس تشابه ژنتیکی و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای: نتایج انگشت‌نگاری DNA چهل و چهار نمونه چای در شکل ۱ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی با ضریب تشابه ساده (SM) و روش UPGMA انجام شد. ماتریس ضریب شباهت (داده‌ها ارائه نشده) نشان داد که بیش‌ترین شباهت بین دو ژنوتیپ منسوب به دارجلینگ (DR22 و DR24) با حدود ۰/۸۸۰ و کم‌ترین شاخص شباهت بین کلون گزینش شده کلکسیون پژوهشکده چای با کد ۲۸۰ و کلون وارداتی ۳۰۲۰ با حدود ۰/۳۷٦ تعیین شد. متوسط میزان تشابه نیز ۰/٦۲٦ به‌دست آمد.

در مطالعات صورت گرفته بر روی بوته‌های چای در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف دامنه تشابه بین نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه خیاوی و همکاران (۱۸) در دامنه ۰/۲۸ تا ۰/۹۳، در مطالعه فلک‌رو و خیاوی (۱۸) با نشانگر RAPD و ISSR به‌ترتیب ۰/۳۷ تا ۰/٦۸ و ۰/۵۹ تا ۰/۹٦، در مطالعه فلک‌رو و همکاران (۳۵) با نشانگر RAPD در دامنه ۰/٤۸٤ تا ۰/۸٦۷ و در مطالعه فلک‌رو و همکاران (۳٦) از ۰/٤۳ تا ۰/۹٤ با میزان متوسط ۰/٦۵ گزارش شده است. همان‌طور که از اعداد گزارش شده در این مطالعات و نتایج این پژوهش مشخص است دامنه تشابه به‌دست آمده برای گیاه چای در ایران قابل‌قبول است.

نمودار خوشه‌ای تمام ٤٤ نمونه را به دو گروه اصلی (A و B) جدا کرد (شکل ۳). مشخص شد که گروه B دارای ۱۳ نمونه است و ۳۱ نمونه باقی‌مانده گروه A را تشکیل می‌دهند که عمدتاً به دو زیرگروه A1 و A2 تقسیم می‌شوند. گروه B که دارای ۱۳ عضو است تنها دو نمونه G1 و G8 از نمونه‌های ایرانی را در کنار نمونه‌های دارجلینگ دارد. گروه A که به دو زیرگروه قابل تقسیم است تمام نمونه‌های سریلانکایی و شش نمونه باقی‌مانده ایرانی را به‌صورت پخش شده در دو زیرگروه خود دارد. زیرگروه A1 شامل هشت نمونه، چهار نمونه متعلق به نمونه‌های ایرانی و یک نمونه متعلق به نمونه‌های سریلانکایی و باقی سه نمونه بعدی متعلق به نمونه‌های دارجلینگ است. زیرگروه A2 شامل ۲۳ نمونه است که این زیرگروه A2 گروه اصلی را با نمونه‌های مختلف شامل ۲۳ نمونه تشکیل می‌دهد. هفت کلون وارداتی از سریلانکا به همراه دو کلون گزینش شده ایرانی (رقم کاشف و کلون کد ٤۵۵) در کنار ١٤ نمونه منتسب به دارجلینگ قرار دارند. بر اساس داده‌های پیشین بوته‌های سریلانکایی عموماً منشأ هندی دارند که نمونه‌های دارجلینگ نیز بر اساس زادگاه هندی هستند که این امر نشان از

رابطه بین این دو گروه است که در تجزیه خوشه‌ای نیز این موضوع مشخص گردیده است.

با نگاهی به انواع چای به‌طورکلی، مشاهده می‌شود که گسترش ژنتیکی پدیدار شده است. استدلال می‌شود که این گسترش به‌دلیل گرده‌افشانی آزاد و خود ناسازگاری این گیاه است. ارجح بودن مکرر کاربرد آغازگرهای ISSR در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاه *C. sinensis* به‌طورکلی توسط سایر پژوهش‌گران، از مطالعه ما حمایت می‌کند. اولین بوته‌های چای که به ایران آمد از منطقه لاهیجان که نمونه‌های ایرانی از این منطقه انتخاب شده‌اند گرفته شده است. سالیان متمادی است که از بذر گیاهانی که از این بذرها رشد می‌کنند، در ایجاد باغ چای جدید استفاده می‌شود. از این نظر، از آن‌جایی‌که این جمعیت سال‌ها در درون خود گرده‌افشانی و بارورشده است، ژنوتیپ‌ها و واریته‌های تشکیل‌شده از بذرها شباهت زیادی نشان داده‌اند. با این‌حال، مواردی که از نظر ژنتیکی با هم تفاوت دارند باید از نظر مورفولوژیکی بررسی شوند.



شکل ۱- دندروگرام گروه‌بندی چهل و چهار ژنوتیپ چای مورد بررسی بر اساس نتایج حاصل از نشانگر ISSR به روش UPGMA.

Fig. 1. Dendrogram of the grouping of forty-four studied tea genotypes based on the results of the ISSR marker using the UPGMA method.

بررسی ساختار جمعیتی بر اساس داده‌های نشانگر ISSR: با توجه به مناطق نمونه‌گیری می‌توان نمونه‌ها را در سه زیرجمعیت متفاوت، نمونه‌های ایرانی با هشت عضو، نمونه‌های وارداتی از سریلانکا هشت عدد و نمونه‌های تحت عنوان دارجلینگ ۲۸ عدد قرار داد.

جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون زیرجمعیت‌ها؛ شاخص‌های میانگین، تعداد نوارهای مشاهده شده و میانگین تعداد نوار مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون درون هر زیرجمعیت محاسبه شد (جدول ۳).

بیش‌ترین میانگین تعداد نوار مشاهده شده (na) در جمعیت منسوب به دارجلینگ (۱/۹۰٤) و کم‌ترین آن در زیرجمعیت کلون‌های وارداتی سریلانکایی (۱/۷٦۸) محاسبه شد. هم‌چنین کم‌ترین میانگین تعداد نوار مؤثر (ne) مربوط به جمعیت کلون‌های وارداتی سریلانکایی (۱/٥٤٤) و بیش‌ترین آن مربوط به جمعیت منسوب به دارجلینگ (۱/٦٤۱) بود. کم‌ترین میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) در میان جمعیت کلون‌های وارداتی سریلانکایی (۰/۳۰۸) و بیش‌ترین در جمعیت منسوب به دارجلینگ (۰/۳٦٤) بود. بیش‌ترین میزان شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) درون جمعیت منسوب به دارجلینگ (۰/٥۳۲) و کم‌ترین آن مربوط به جمعیت کلون‌های وارداتی سریلانکایی (۰/٤٥۰) است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد میزان شاخص‌های محاسبه شده به یکدیگر بسیار نزدیک است که دلیل آن به انشعاب تمام بوته‌های چای از یک منبع و تعداد محدودی گیاه باز می‌گردد. میانگین تعداد نوار مشاهده شده (na) کل، میانگین تعداد نوار مؤثر (ne)، میزان شاخص تنوع ژنتیکی نی (h) کل و میزان شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) کل به‌ترتیب ۱/۹۲۸، ۱/٦۷۷، ۰/۳۸۱ و ۰/٥٥٤ محاسبه گردید. به‌دلیل آن‌که شاخص شانون محاسبه شده در محدوده ۰/۹ تا ۰/۷ (۰/۹>I>۰/۷) نبود، می‌توان بیان کرد که مابین زیرجمعیت‌ها تنوع محدودی وجود دارد. شاخص تنوع ژنتیکی نی در حالت کلی نیز با نشان دادن ۰/۳۸۱ بیان می‌دارد که تنوع متوسطی مابین نمونه دیده می‌شود.

جدول ۳- اندازه نمونه، متوسط تعداد نوار مشاهده شده، متوسط تعداد نوار مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص تنوع ژنتیکی شانون در جمعیت‌ها و کل جمعیت بر اساس نشانگر ISSR.

Table 3. Sample Size, Observed number of alleles, Effective number of alleles, Nei's gene diversity and Shannon's Information index in populations and total population based on ISSR markers.

جمعیت Population	اندازه نمونه Sample Size	متوسط تعداد نوار مشاهده شده Observed number of alleles (na)	متوسط تعداد نوار موثر Effective number of alleles (ne)	شاخص تنوع ژنتیکی نی Nei's gene diversity (h)	شاخص تنوع ژنتیکی شانون Shannon's Information index (I)
ایران Iran	8	1.824	1.555	0.318	0.468
سریلانکا Sri Lanka	8	1.768	1.544	0.3.8	0.450
دارجلینگ Darjeeling	28	1.904	1.641	0.364	0.532
کل Total	44	1.928	1.641	0.364	0.532

در ادامه آنالیز جمعیتی نمونه‌های مورد بررسی، شاخص‌های تنوع کل جمعیت، تنوع درون زیرجمعیت‌ها، تنوع بین زیرجمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ٤).

جدول ٤- شاخص‌های تنوع کل، میانگین تنوع درون جمعیت، سطح تنوع بین جمعیت بر اساس نشانگر ISSR.

Table 4. Indices of Total diversity, average intrapopulation diversity, level of population subdivision based on ISSR markers.

	اندازه نمونه Sample Size	تنوع کل Total diversity (ht)	میانگین تنوع درون جمعیت average intrapopulation diversity (hs)	سطح تنوع بین جمعیت level of population subdivision (Gst)
میانگین Mean	44	0.380	0.330	0.130
انحراف از معیار St. Dev	-	0.019	0.017	-

پائول و همکاران (۳۲) در مقایسه میزان تنوع و روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های گیاهان چای هند و کنیا به‌وسیله نشانگر AFLP، میزان تنوع درون جمعیت‌ها و بین جمعیت‌های چای هند و کنیا را به‌طور متوسط ۰/۷۹ و ۰/۲۱ (به‌ترتیب) بیان نمودند. کایوندیون و همکاران (۳۷) توسط نشانگر RAPD-PCR اقدام به ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۷ اکسیشن برتر چای از کره، ژاپن و تایوان کردند و نتیجه نشان داد که ۷۱ درصد تنوع درون گروه‌ها و ۲۹ درصد آن بین گروه‌ها بود. لای و همکاران (۳۸) به بررسی روابط ژنتیکی سه نوع چای شامل ارقام چای چینی اصلاح‌شده در تایوان، چای آسامی و چای بومی تایوان با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR پرداختند. نتیجه نشان داد که تنوع ژنتیکی جمعیت چای وحشی بومی تایوان، بالاترین مقدار از سه جمعیت مورد مطالعه را دارا بود. بلاساروانان و همکاران (۳۹) با بررسی تنوع ژنتیکی چای‌های جنوب هند توسط نشانگر AFLP، نمونه‌ها را در سه گروه کاملاً مشخص آسامی، چینی و مخلوط (حد میانه) قرار دادند گروه چینی بالاترین شاخص تنوع (۰/٦۱) و فرم آسام حداقل تنوع (۲۸ درصد) را نشان داد، این موضوع بیان می‌دارد با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان تفاوت بین جمعیت‌های چای را تشخیص داد. در بررسی آن‌ها بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین گروه آسام و گروه حد واسط (۰/۹٦) و حداقل فاصله بین آسام و چینی (۰/۸۵) محاسبه و گزارش شده است. روی و چاکرابورتی (۱۹) انگشت‌نگاری ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ چای را توسط ۷ نشانگر ISSR و ۱۲ نشانگر RAPD انجام دادند. میزان تنوع ژنتیکی کل (HT)، تنوع درون جمعیت (HS) و تنوع بین جمعیت (GST)، ۰/۳۸، ۰/۲۷ و ۰/۲۵ بود (به‌ترتیب). تانی‌گوچی و همکاران (٤۰) در مطالعه‌ای ۷۸۸ اکسیشن ژرم‌پلاسم چای را با استفاده از ۲۳ نشانگر SSR آنالیز کردند. این آنالیز ژرم‌پلاسم را به دو گروه، ژاپنی و غیرژاپنی تقسیم کرد. که بعداً به واریته sinensis و assamica تقسیم شدند. تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم نوع چینی، تایوان، هند و سریلانکا بالاتر از دیگر کشورها و پایین‌تر از ژاپنی بود. از بررسی میزان تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های چای بر اساس روش ISSR با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (جدول ۵) مشخص گردید که تشابه ژنتیکی بالایی مابین ژنوتیپ‌های چای موجود در ایران وجود دارد به‌طوری که حداکثر میزان تشابه بین جمعیت‌ها، بین جمعیت ایران و دارجلینگ (۰/۹۲۰) و حداقل آن نیز بین منطقه ایران و سریلانکا (۰/۸۵۸) محاسبه شد که دلیل این حالت می‌تواند به فاصله جغرافیایی مابین مناطق جمع‌آوری نمونه‌ها مرتبط باشد. نتایج مشابهی نیز در تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها مشاهده شده است.

همان‌طور که از داده‌های به‌دست آمده از بررسی‌های پیشین مشخص است دامنه تفاوت وسیعی مابین جمعیت‌ها نسبت به بررسی پیش‌رو دیده می‌شود که این موضوع به زادگاه و سابقه کشت گیاه چای در منطقه تحت بررسی باز می‌گردد که این موضوع با میزان تشابه بالای محاسبه شده مابین جمعیت‌های بوته چای تحت کشت در ایران با توجه به پیشینه محدود کشت چای و هم‌چنین تعداد اجداد محدود وارداتی اولیه بوته چای که تمام بوته‌های موجود، از آن تعداد محدود منشأ گرفته‌اند، کاملاً قابل‌قبول است.

جدول ۵- میزان تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های چای با استفاده از فاصله ژنتیکی نی بر اساس داده‌های نشانگر ISSR.

Table 5. The degree of similarity and genetic distance of tea populations using the genetic distance of nei based on ISSR marker data.

جمعیت Population	ایران Iran	سریلانکا Sri Lanka	دارجلینگ Darjeeling
ایران Iran	***	0.858	0.920
سریلانکا Sri Lanka	0.153	***	0.891
دارجلینگ Darjeeling	0.082	0.114	***

نتیجه‌گیری

این مطالعه با تعداد ٤٤ نمونه گیاه چای شامل نمونه‌های بذری منسوب به منطقه دارجلینگ (۲۸ عدد) به همراه دو رقم چای کاشف و لاهیج و شش کلون گزینش شده به‌عنوان نمونه‌های چای ایرانی و هشت نمونه از کلون‌های وارداتی از سریلانکا به‌عنوان جمعیت وارداتی انجام شد. در این مطالعه، در مجموع از ۳۰ آغازگر ISSR مختلف استفاده شد که ١٦ مورد از آن‌ها برای بررسی نمونه‌ها انتخاب شدند. مشخص شده است که عموماً ژنوتیپ‌های چای تکثیرشده از طریق بذر از نظر ژنتیکی حدوداً به میزان ٦٢ درصد مشابه هستند و در مجموع حدود ۳۸ درصد تفاوت در جمعیت چای برای نشان دادن تفاوت شناسایی شد که این تفاوت به‌دلیل گستردگی ژنتیکی رخ می‌دهد. در بازار، این تصور که چای شرکت‌ها یا مناطق مختلف از کیفیت بهتری برخوردار است، کاملاً به‌دلیل ژنوتیپ نیست، بلکه اکولوژیکی که چای در آن رشد می‌کند در ویژگی‌های آب و هوا و خاک و هم‌چنین فناوری فرآوری مؤثر است. در عین‌حال می‌توان از این تفاوت ژنتیکی در مطالعات اصلاحی استفاده کرد.

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 غیرزنده در تخمین و مشخص نمودن تلاقی‌های مناسب‌تر یاری رساند.

سپاسگزاری

مقاله پیوست، قسمتی از نتایج پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۹۵۰۵۷۱-۰۳۷-۳۳-۲۱-۲ است که در پژوهشکده چای (لاهیجان) از سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ انجام پذیرفته است و اعتبار اجرای آن توسط این پژوهشکده تامین شده است.

منابع

1. Benzie, I. F., & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (2), 633-636.
2. Ferruzzi, M. G. (2010). The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & behavior*, 100 (1), 33-41.
3. Panda, H. (2011). The Complete Book on Cultivation and Manufacture of Tea. Asia Pacific Business Press, New Delhi.
4. De Costa, W. A., Mohotti, A. J., & Wijeratne, M. A. (2007). Ecophysiology of tea. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19, 299-332.
5. Yogurtcu, B., & Aygun, A. (2021). Characterization of tea (*Camellia sinensis* L.) genotypes grown in Turkey by ISSR markers. *Applied Ecology & Environmental Research*, 19 (5), **10.15666/aeer/1905_41034114.**
6. Bublyk, O., Andreev, I., Kalendar, R., Spiridonova, K., & Kunakh, V. (2013). Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of Iris pumila genetic diversity. *Biologia*, 68 (4), 613-620.
7. Anderson, N. O., Younis, A., & Sun, Y. (2010). Intersimple sequence repeats distinguish genetic differences in Easter lily 'Nellie White'clonal ramets within and among bulb growers over years. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135 (5), 445-455.
8. Vo, T. D. (2007). Assessing genetic diversity in Vietnam tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] using morphology, inter-simple sequence repeat (ISSR) and microsatellite (SSR) markers. Dissertation, Georg-August University. **http://dx.doi.org/10.53846/goediss-1693.**
9. Kalpana, D., Choi, S. H., Choi, T. K., Senthil, K., & Lee, Y. S. (2012). Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting. *Scientia Horticulturae*, 134, 79-87.
10. Kumar Mondal, T. (2002). Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica*, 128 (3), 307-315.
11. Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, 13 (5), 1143-1155.
12. Thomas, J., Vijayan, D., Joshi, S. D., Lopez, S. J., & Kumar, R. R. (2006). Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats. *Journal of Biotechnology*, 123 (2), 149-154.
13. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2), 176-183.
14. Chen, D., Yi, X., Yang, H., Zhou, H., Yu, Y., Tian, Y., & Lu, X. (2015). Genetic diversity evaluation of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) using inter-simple sequence repeat (ISSR). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62, 823-828.
15. Ben-Ying, L. I. U., You-Yong, L. I., Yi-Chun, T. A. N. G., Li-Yuan, W. A. N. G., Cheng, H., & Ping-Sheng, W. A. N. G. (2010). Assessment of genetic diversity and relationship of tea germplasm in Yunnan as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (3), 391-400.
16. Chen, L., Zhou, Z. X., & Yang, Y. J. (2007). Genetic improvement and breeding of tea plant (*Camellia sinensis*) in China: from individual selection to hybridization and molecular breeding. *Euphytica*, 154, 239-248.
17. Falakro, K., & Jahangirzadeh Khiavi, S. (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.
18. Jahangirzadeh Khiavi, S., Falakro, K., Safaei Chaei Kar, S., Ramzi, S., & Kahneh, E. (2020). Usage of morphological and ISSR markers for investigation of Tea genotypes.

Journal of Plant Production Research, 26 (4), 131-147. [In Persian]

19. 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), 370-376.
20. 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.
21. Beris, F. S., Sandalli, C., Canakci, S., Demirbag, Z., & Belduz, A. O. (2005). Phylogenetic analysis of tea clones (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Biologia-Section Botany*, 60, 457-461.
22. Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1, 19-21.
23. Roldan-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., Van Eijk, M. J. T., & De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (Lolium) varieties. 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding*, 6, 593-602.
24. Yun-Qing, H., Xiao-Bo, L., Xiao-Ling, W. (2019). Genetic diversity of the endangered *Acer pentaphyllum* Diels by ISSR analysis. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 56 (1), 161-166.
25. Kafkas, S., Ozkan, H., Ak, B., Acar, I., Atli, H., & Koyuncu, S. (2006). Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131 (4), **10.21273/jashs.131. 4.522.**
26. Najafzadeh, R., Arzani, K., Bouzari, N., & Saei, A. (2014). Genetic diversity assessment and identification of new sour cherry genotypes using intersimple sequence repeat markers. *International Journal of Biodiversity*, 1-8. **http://dx.doi.org/10.1155/2014/308398.**
27. Kumar, J., & Agrawal, V. (2019). Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, Trichosanthes dioica employing ISSR, SCoT and SRAP markers. *Heliyon*, 5 (3), e01346.
28. Noroozi, S., Baghızadeh, A., & Javaran, M. J. (2009). The genetic diversity of Iranian pistachio *Pistacia vera* L. cultivars revealed by ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation*, 2 (2), 50-56.
29. Indu, R., Kaushik, R. A., Deepak, R., Maloo, S. R., & Manish, C. (2020). Molecular characterization of chrysanthemum by using RAPD and ISSR markers. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9 (1), 1423-1429.
30. Esselman, E. J., Jianqiang, L., Crawford, D. J., Windus, J. L., & Wolfe, A. D. (1999). Clonal diversity in the rare Calamagrostis porteri ssp. insperata (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 8 (3), 443-451.
31. Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and applied genetics, 94, 597-602.
32. Paul, S., Wachira, F. N., Powell, W., & Waugh, R. (1997). Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 255-263.
33. Yang, W., de Oliveira, A. C., Godwin, I., Schertz, K., & Bennetzen, J. L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Science*, 36 (6), 1669-1676.
34. Jahangirzadeh Khiavi, S., & Falakro, K. (2017). Investigation of Genetic Diversity between Tea Shrubs Based on ISSR Markers. In Proceedings of First

National Conference of Ecology, Diversity and Plant Conservation. Tehran, Iran. [In Persian]

35. Falakro, K., Khiavi, S. J., & Chaeikar, S. S. (2020). Study of Genetic Diversity between Some Tea Genotypes from Foman-Iran. *Bioagrica*, 1 (1), 1-10.
36. Falakro, K., Jahangirzadeh Khiavi, S., Gholami, M., & Pour Azizan, S. (2022). RAPD markers, instruments for determining the genetic relationships of tea plant in Iran. *Journal of Plant Research*, 35 (1), 42-54.
37. 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, 7-16.
38. 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.
39. 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.
40. Taniguchi, F., Kimura, K., Saba, T., Ogino, A., Yamaguchi, S., & Tanaka, J. (2014). Worldwide core collections of tea (*Camellia sinensis*) based on SSR markers. *Tree genetics & genomes*, 10, 1555-1565.