



ISSN: 2676-7309



Lorestan University

Evaluation of Genetic Diversity in Tea (*Camellia sinensis* L.) Germplasm from Northern Iran Using AFLP Markers

Sheida Golmohammadi¹ | Davod Bakhsi¹ | Shahin Jahangirzadeh Khiavi^{2*}

1- Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran

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

*Corresponding author ✉: sh.jahangirzadeh@areeo.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: April 21, 2025;

Received in revised form: June 12, 2025;

Accepted: June 23, 2025;

Available online: June 30, 2025

Keywords:

Genetic diversity,
North Iran,
Tea plant,
Molecular marker,
AFLP

ABSTRACT

Tea (*Camellia sinensis* L.) is consumed worldwide. In many cultures, tea has attained ceremonial significance as both a social and medicinal beverage. The tea plant is one of the most important products in the northern region of Iran, and plays an essential role in the region's economy. Although tea is of great importance in Iran's economy, little is known about the patterns of genetic variation among diverse tea genotypes grown in Iran. A total of 30 tea genotypes present at the Tea Research Center germplasms of Horticultural Sciences Research Institute (HSRI) in the south of Caspian Sea region of Iran were collected. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers and PAGE electrophoresis were applied for molecular characterization. The AFLP analysis with six primer combinations generated 187 fragments of which 147 were polymorphic, corresponding to 78.61% polymorphism. Resolving powers of the AFLP primers ranged from 12.27 to 16.78, yielding a total of 89.99; the polymorphic information content (PIC) ranged from 0.46 to 0.50, with an average of 0.48. Genetic similarity values ranged from 0.29 to 0.85, with an average of 0.61. The dendrogram, generated using the Simple Matching (SM) similarity coefficient and the UPGMA clustering method, demonstrated that all tea genotypes could be distinctly separated into two clusters. These results offer valuable guidance for tea breeding programs, particularly in the selection of suitable parental genotypes.



Cite this article: Golmohammadi, S., Bakhsi, D. and Jahangirzadeh Khiavi, S. (2025). Evaluation of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) germplasm from northern Iran using AFLP markers. *Plant Genetic Research*, 12(1): 75-90.

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2025.2062308.1001>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

Introduction

Tea (*Camellia sinensis* L.) is the most popular beverage worldwide after water and it holds a significance ceremonial both as a social and medicinal drink. It is one of the most economically important agricultural products in northern Iran, playing a fundamental role in the region's economy. Despite its high economic significance, limited information is available on genetic diversity patterns among tea genotypes cultivated in Iran. Genetic variation in Iran's tea plants, shaped by historical seed propagation, highlights the need for genetic characterization. Understanding this diversity is crucial for effective breeding and conservation programs. DNA-based molecular techniques offer significant advantages over traditional morphological methods, as they are unaffected by environmental factors and provide more accurate insights into genetic relationships. Among PCR-based markers, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) is a highly reproducible multi-locus molecular marker widely used across plant species. The high level of polymorphism and superior resolving power are the principal strengths of AFLP, rendering it particularly effective for analyzing closely related genotypes. This study aimed to assess genetic relationships and diversity patterns among Iranian tea germplasm, providing valuable insights for future breeding programs.

Materials and Methods

Thirty tea genotypes from the Tea Research Institute germplasm collection at the Horticultural Sciences Research Institute of Iran, including 20 Iranian genotypes from central and western tea-growing regions, three genotypes from Georgia, and seven imported clones from Sri Lanka were assessed. Total genomic DNA (gDNA) was extracted using the Dellaporta method with minor modifications. gDNA quality and quantity was assessed using spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. AFLP analysis followed the protocol of Vos et al. (1995) with slight adaptations. Genomic DNA was digested with *EcoRI* and *MseI* restriction enzymes, followed by ligation of corresponding adapters. Pre-selective amplification used primers with one selective nucleotide. Six selective primer combinations (E-CGA*M-AGA, E-CGA*M-ACT, E-CGA*M-AAG, E-CGC*M-AAG, E-CAG*M-ACT, and E-CAG*M-AAG) were chosen based on their ability to produce the highest number of clear bands for comprehensive analysis. Selective amplification products were resolved on 6% polyacrylamide gels and visualized with silver nitrate staining. Bands were scored as present (1) or absent (0) for fragments ranging from 50 to 2000 bp. Statistical analyses were performed using NTSYS-pc software, including similarity coefficient calculations, cluster analysis via the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), and cophenetic correlation coefficients.

Results and Discussion

All six primer combinations generated 187 fragments, of which 147 were polymorphic (78.61% polymorphism). The number of amplified fragments per combination ranged from 24 to 37 with averaging of 31.17 bands. Resolving power (Rp) values ranged from 12.27 to 16.78, with a cumulative total of 89.99. Polymorphic Information Content (PIC) values varied from 0.46 to 0.50, averaging 0.48, indicating strong discriminatory power for genetic differences among samples. Genetic similarity coefficients, calculated using the Simple Matching (SM) method, ranged from 0.29 to 0.85, with a mean of 0.61. The UPGMA-based dendrogram clearly divided the tea samples into two major clusters, with a cophenetic correlation coefficient of 0.85. The first cluster primarily comprised genotypes from western tea-growing regions, while the second included samples from all geographical areas. The lack of strict correspondence between clustering and geographical origins may stem from historical cultivation practices in Iran and underlying genetic relationships among

Iranian tea plants. The observed high genetic diversity aligns with prior studies using other molecular markers and reflects tea's heterozygous nature, driven by self-incompatibility and extensive cross-pollination. AFLP markers successfully differentiated even closely related genotypes, highlighting their effectiveness in assessing genetic diversity within tea germplasm. Moreover, the detection of sub-clusters within major groups suggests potential admixture resulting from introductions. For instance, Georgian accessions clustered with central Iranian genotypes, possibly suggesting shared ancestry from Soviet-era exchanges. Compared to global studies, such as those in Turkish or Indian tea, the polymorphism rate here (78.61%) is comparable, affirming AFLP's robustness. PIC averages above 0.4 confirm informativeness, superior to single-locus markers for breeding applications. These patterns indicate potential for marker-assisted selection in traits like yield, pest resistance, and quality, crucial for Iran's tea industry facing biotic stresses.

Conclusion

The present study represents the first use of AFLP markers to evaluate genetic diversity among Iranian tea genotypes. AFLP technique effectively detected polymorphisms and uncovered genetic relationships, allowing clear differentiation among closely related accessions. The findings provide breeders with essential information for selecting diverse genotypes with desirable traits to initiate crossing and selection programs. Overall, the results establish a foundation for future efforts to broaden the genetic base of Iranian tea germplasm and to advance more efficient breeding strategies.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank anonymous reviewers for their valuable suggestions in manuscript revision.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم چای (*Camellia sinensis* L.) شمال ایران با استفاده از نشانگرهای AFLP

شیدا گل محمدی^۱ | داود بخشی^۱ | شاهین جهانگیرزاده خیایوی^{۲*}

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

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

چکیده

اطلاعات مقاله

مصرف چای (*Camellia sinensis* L.) در اکثر کشورهای جهان رایج است. چای در بسیاری از نقاط، به عنوان یک نوشیدنی اجتماعی و دارویی، جایگاه تشریفاتی یافته است. گیاه چای یکی از مهم‌ترین محصولات در مناطق شمالی ایران به‌شمار می‌رود و نقش اساسی در اقتصاد این نواحی ایفا می‌کند. با وجود اهمیت اقتصادی بالای چای در ایران، اطلاعات اندکی در مورد الگوی تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های مختلف چای کشت شده در کشور موجود است. در این مطالعه، مجموعاً ۳۰ ژنوتیپ چای از ژرم پلاسم پژوهشکده چای مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی واقع در جنوب منطقه دریای خزر ایران جمع‌آوری شد. از نشانگرهای چندشکلی طولی قطعات تکثیر شده (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) و الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (Polyacrylamide gel electrophoresis) برای شناسایی‌های مولکولی استفاده شد. تجزیه و تحلیل AFLP با شش ترکیب آغازگر، منجر به تولید ۱۸۷ قطعه شد که ۱۴۷ قطعه از آن‌ها چندشکل بودند و ۷۸/۶۱ درصد چندشکلی را نشان دادند. قدرت تفکیک آغازگرهای AFLP بین ۱۲/۲۷ تا ۱۶/۷۸ متغیر بود و در مجموع به ۸۹/۹۹ رسید. محتوای اطلاعات چندشکلی (Polymorphism Information Content) نیز بین ۰/۴۶ تا ۰/۵۰ با میانگین ۰/۴۸ متغیر بود. مقادیر تشابه ژنتیکی بین ۰/۲۹ تا ۰/۸۵ با میانگین ۰/۶۱ برآورد شد. دندروگرام حاصل از ضریب تشابه تطابق ساده (Simple matching) و روش گروه جفتی بی‌وزن با میانگین حسابی (UPGMA: Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌های چای به وضوح به دو گروه مجزا تقسیم شدند. نتایج این پژوهش، اطلاعات ارزشمندی را برای برنامه به‌نژادی ارقام چای به منظور انتخاب والدین فراهم خواهد کرد.

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

تنوع ژنتیکی،

شمال ایران،

گیاه چای،

نشانگر مولکولی،

AFLP

مقدمه

درجه بالایی از انعطاف‌پذیری را نشان می‌دهند، شناسایی گروه‌های تاکسونومیک مجزا دشوار بوده است (Wickremasinghe, 1979). علاوه بر این، گروه‌های شناسایی شده ممکن است بازتاب دهنده تشابه‌های ژنتیکی واقعی نباشند. در تلاش برای غلبه بر این مشکلات، از تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای پایش تغییرپذیری ژنتیکی استفاده شده است (Wachira et al., 1995).

در میان نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)، نشانگر چندشکلی طولی قطعات تکثیر شده (AFLP) یک سیستم نشانگر چند جایگاهی بسیار قابل تکثیر است که توسط ووس و همکاران (Vos et al., 1995) توسعه داده شده است. این روش نسبت به روش‌های مانند RAPD و ISSR دارای مزایای متعددی است و به‌طور گسترده برای طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است. سطوح بالای چندشکلی و ظرفیت تفکیک بالا، مزایای اصلی نشانگرهای AFLP هستند که برای ژنوتیپ‌های نزدیک به هم استفاده می‌شوند. برای بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس DNA، نشانگرهای مختلفی در گیاه چای در سراسر دنیا توسط پژوهشگران به‌کار رفته‌اند (Matsumoto et al., 2002; Roy and Chakraborty, 2009; Raina et al., 2012; Kafkas et al., 2009; Ma et al., 2014; Chaeikar et al., 2020; Falakro and Khiavi, 2020). پیش از این، تنها نشانگرهای RAPD، ISSR و SRAP برای شناسایی ژنوتیپ‌های چای ایران مورد استفاده قرار گرفته بودند (Khiavi et al., 2020a,b; Chaeikar et al., 2020; Dargah et al., 2023; Khiavi et al., 2022). از نشانگرهای AFLP در گیاهان متنوعی با اهداف متفاوت استفاده شده است (Zirak et al., 2018; Barajehfard et al., 2016; Khiavi et al., 2015). گزارش‌های اولیه در مورد چای (Devarumath et al., 2002) Wachira et al., 2001) برتری نشانگرهای AFLP را نسبت به RAPD تأیید کردند. میزان چندشکلی تشخیص داده شده در هر واکنش در AFLP به دلیل تعداد لوکوس‌های نمونه‌برداری شده در یک آزمایش واحد، بسیار بیشتر از میزان تشخیص داده شده توسط RFLP یا RAPD است. نشانگر AFLP به‌عنوان یک نشانگر عمومی، قدرتمند، قابل اعتماد، پایدار و سریع با کاربرد بالقوه در نقشه‌برداری ژنوم و قدرت تشخیص بالا، می‌تواند به‌خوبی برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه

چای پس از آب، محبوب‌ترین نوشیدنی در جهان است و فواید بی‌شماری برای سلامتی دارد. قدمت مصرف چای به حدود ۵۰۰۰ سال می‌رسد (Wheeler and Wheeler, 2004; Yang and Hong, 2013). گیاه چای (*Camellia sinensis*) O. Kuntze ((L.) (2n= 2x= 30) که برگ‌های آن برای تولید انواع گوناگون دمنوش چای مورد استفاده قرار می‌گیرد، معمولاً شامل یک گونه (*C. sinensis*)، از جمله دو یا سه واریته گیاه‌شناسی *C. sinensis* var. *assamica*، *C. sinensis* var. *pubilimba* (Chen et al., 2000) و گاهی اوقات *C. sinensis* var. *kucha* (Chang, 1984) می‌باشد.

گیاه چای گونه‌ای بومی در جنوب غربی چین بوده و اکنون در سراسر جهان کشت می‌شود (Taniguchi et al., 2014). ترکیب تنوع ژنتیکی، عوامل محیطی و روش‌های مختلف فرآوری چای، تنوع عظیمی از محصولات چای با طعم‌های گوناگون، نظیر تلخ، گس و شیرین، ایجاد کرده است تا پاسخگوی تقاضای مصرف‌کنندگان در سراسر جهان باشد. طعم‌های غنی و عملکردهای متنوع ارتقاءدهنده سلامتی چای، عمدتاً به حدود ۷۰۰ ترکیب فعال زیستی نسبت داده می‌شود (Namita et al., 2012).

از آنجایی که گیاهان چای در ایران به‌علت تکثیر بذری در گذشته، از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند (Khiavi et al., 2020a,b)، شناسایی آن‌ها هم از نظر ژنتیکی و هم از نظر بیوشیمیایی اهمیت بسزایی دارد. به‌طور کلی، اولین گام در چنین مواردی، بررسی ژنومی گیاهان است تا گیاهان مشابه از نظر ژنتیکی، به ویژه در برنامه‌های به‌نژادی مبتنی بر دورگ‌گیری، در پژوهش گنجانده نشوند. موفقیت هر برنامه به‌نژادی یا حفاظت ژنتیکی، به درک میزان و توزیع تنوع ژنتیکی موجود در مخزن ژنی بستگی دارد. به‌طور سنتی، ترکیبی از صفات مورفولوژیکی و زراعی برای سنجش تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال، چای یک گیاه هتروژن (*heterogenous*) با بسیاری از صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی همپوشان است (Purseglove 1968; Wickremasinghe, 1979; Banerjee, 1988). علاوه بر این از آنجایی که بیشتر ویژگی‌های رویشی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار دارند و تغییرات پیوسته و

انواع چینی در نمودار PCO پراکنده تر بودند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی وسیع تر است. کلون‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه مشابه، تنوع ژنتیکی کلی کمتری نشان دادند. تجزیه و تحلیل AFLP تمامی ژنوتیپ‌های آزمایش شده از هند و کنیا را از یکدیگر متمایز کرد، حتی آن‌هایی که بر اساس صفات مورفولوژیکی و فنوتایپی قابل تشخیص نیستند.

میشرا و همکاران (Mishra et al., 2009) در پژوهشی با عنوان تجزیه و تحلیل مولکولی کلون‌های چای (*Camellia sinensis*) با استفاده از نشانگرهای AFLP گزارش دادند که تجزیه و تحلیل ۲۹ کلون چای با نشانگر AFLP درجه بالایی از چندشکلی را در ژنوم کلون‌های مختلف نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای، دندروگرامی را نشان داد که با گروه‌بندی کلونی در مطالعه‌های قبلی بر اساس صفات مورفولوژیکی مطابقت دارد. در مجموع ۶۷۷ باند تکثیر شد که ۴۶۹ باند از آن‌ها در مجموعه ۲۹ کلون چای چندشکل بودند. میزان خویشاوندی ژنتیکی بین کلون‌ها با استفاده از هر دو ترکیب آغازگر $3+/2+$ و $4+/3+$ ، ۷۰ درصد برآورد شد. شاخص تشابه با استفاده از ترکیب آغازگر $3+/2+$ در جمعیت نوع چینی بین ۰/۷۱۱ تا ۰/۸۱۵، در جمعیت نوع کامبوج بین ۰/۷۱۱ تا ۰/۸۰۰ و در جمعیت نوع آسام بین ۰/۷۱۶ تا ۰/۷۷۸ متغیر بود. رقم بالای تشابه (۰/۶۹۷-۰/۸۶۹) نشان می‌دهد که کلون‌های چای دارای مخزن ژنی محدودی در جنس *Camellia* هستند.

با توجه به مطالب ذکر شده، مطالعه حاضر با هدف تعیین روابط ژنتیکی بین ۳۰ ژنوتیپ چای ایرانی موجود در کلکسیون‌های چای پژوهشکده چای مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی با استفاده از نشانگر AFLP انجام شد. نتایج این پژوهش، اطلاعات ارزشمندی را برای انتخاب والدین در برنامه‌های پیشرفته به نژادی چای فراهم می‌آورد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در مطالعه حاضر، بیست ژنوتیپ چای متعلق به مناطق مرکزی و غربی کشت چای ایران، سه ژنوتیپ منتسب به گرجستان و هفت کلون وارداتی از سریلانکا مورد بررسی قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های ایرانی پیش‌تر به دلیل ویژگی‌های برترشان نسبت به سایرین انتخاب شده بودند. این ژنوتیپ‌ها به روش تکثیر رویشی تکثیر شده و سپس در کلکسیون پژوهشکده چای مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی ایران کشت

چای مورد استفاده قرار گیرد و در گذشته مطالعه‌هایی با این نشانگر در گیاه چای انجام شده است (Raina et al., 2012; Kafkas et al., 2009; Paul et al., 1997).

کافکاس و همکاران (Kafkas et al., 2009) در ترکیه از این نشانگرها برای بررسی چندشکلی و روابط ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های چای استفاده کردند و گزارش دادند که استفاده از شش ترکیب آغازگر منجر به تولید ۸۳۵ قطعه شد که ۵۶۷ قطعه از آن‌ها چندشکل بودند و ۶۹/۸ درصد چندشکلی را نشان می‌دادند. قدرت تفکیک آغازگرهای AFLP بین ۶۲/۶ تا ۸۱/۹ متغیر بود. در پژوهش یادشده محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بین ۰/۷۶ تا ۰/۸۳ با میانگین ۰/۷۹ متغیر بود. مقادیر تشابه ژنتیکی بین ۰/۶۸ تا ۰/۹۲ با میانگین ۰/۷۶ برآورد شد. دندروگرام حاصل از روش UPGMA و تجزیه و تحلیل مختصات اصلی (PCoA) در نتایج مذکور نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌های چای به وضوح به چهار گروه مجزا تقسیم می‌شوند. نتایج این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی را برای برنامه به‌نژادی ارقام چای در کشور ترکیه به‌منظور انتخاب والدین فراهم کرد.

پائول و همکاران (Paul et al., 1997) تنوع و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های چای هندی و کنیایی (*C. sinensis* (L.) O. Kuntze) را با استفاده از نشانگرهای AFLP مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که نشانگرهای AFLP با موفقیت برای تشخیص تنوع و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های چای هندی و کنیایی به کار گرفته شدند. آن‌ها گزارش دادند که بیشتر تنوع در درون جمعیت‌ها مشاهده شد، به طوری که ۷۹ درصد از تغییرات درون جمعیت‌ها و ۲۱ درصد بین جمعیت‌های چای هندی و کنیایی با استفاده از شاخص تنوع شانون بود. دندروگرام ترسیم شده بر اساس اشتراک باند، سه جمعیت چای را به‌طور مشخص به نوع چینی (*sinensis*)، نوع آسام (*assamica*) و نوع کامبوجی (*C. assamica* ssp. *lassiocalyx*) به گونه‌ای جدا کرد که با طبقه‌بندی فعلی چای، شجره‌نامه شناخته شده برخی از ژنوتیپ‌ها و منشأ جغرافیایی آن‌ها سازگار بود. تجزیه و تحلیل مختصات اصلی (PCO) ژنوتیپ‌های آسام را هم از هند و هم از کنیا گروه‌بندی کرد که این امر از این پیشنهاد حمایت می‌کند که کلون‌های کنیایی از مجموعه‌های جمع‌آوری شده در این منطقه مشتق شده‌اند.

هر dNTP به میزان $200\mu\text{M}$ و یک واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مرز در حجم $25\mu\text{l}$ بود. بعد از تکثیر انتخابی، محصول آن مجدداً به نسبت ۵:۱ رقیق گردید. جهت انتخاب بهترین ترکیب‌های ممکن تعداد شش نمونه تصادفی از بین نمونه‌ها انتخاب و توسط نه ترکیب آغازگری مختلف که دارای دو نوکلئوتید انتخابی علاوه بر تک نوکلئوتید مرحله پیش تکثیر در انتهای ۳ بودند مورد تکثیر انتخابی قرار گرفتند. از آنجایی که شش ترکیب E-CGA/M-AGT, E-CGA/M-AGA, E-CAG/M-ACT, E-CAG/M-AAG, E-CGC/M-AAG, CGA/M-AAG بیشترین تعداد باندهای دارای وضوح مناسب را تولید نمودند؛ بنابراین برای ادامه بررسی از آن‌ها استفاده شد. ترکیب مواد در مرحله تکثیر انتخابی شامل محصول تکثیر اولیه رقیق شده $6\mu\text{l}$ ، از هر آغازگر 0.5mM ، بافر PCR ($\times 10$) حاوی MgCl_2 به میزان $2.5\mu\text{l}$ ، از هر dNTP به میزان $200\mu\text{M}$ و یک واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مرز در حجم $25\mu\text{l}$ بود. تکثیر انتخابی در شرایط دمایی 94°C به مدت ۳ دقیقه، ده چرخه با برنامه 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 65°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۶۰ ثانیه که در مرحله اتصال آغازگرها در هر چرخه دما یک درجه کاهش می‌یابد تا به دمای 65°C برسد، در ادامه ۲۵ تکرار برنامه 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 56°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت 72°C به مدت پنج دقیقه صورت گرفت. محصول این تکثیر انتخابی برای بررسی در ژل پلی‌اکریل آمید واسرشت‌ساز ۶ درصد تفکیک و با روش نیرتات نقره رنگ‌آمیزی شد. امتیازدهی باندها به صورت صفر برای عدم حضور و یک برای حضور نوار باندی در دامنه bp-1000-50 انجام گرفت. جدول ۲ اطلاعات ترکیب‌های آغازگری بکار رفته را بیان می‌دارد.

شده‌اند. مواد گیاهی مورد استفاده و برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

استخراج DNA و مراحل AFLP: برگ‌های جوان و کاملاً باز شده انتخاب و در دمای 80°C -درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده برای مطالعه نگهداری شدند. DNA کل (هسته‌ای و اندامکی) با استفاده از روش دلپورتا (Dellaporta et al., 1983) با تغییرات جزئی استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. DNA استخراج شده برای واکنش‌های AFLP تا غلظت 25 نانوگرم در میلی‌لیتر رقیق شد.

جزئیات روش AFLP، توالی‌های آداپتور و آغازگر، شرایط PCR برای تکثیرهای پیش‌انتخابی و انتخابی و تعیین آغازگرهای انتخابی مطابق با روش ووس و همکاران (Vos et al., 1995) با تغییرات جزئی (Khiavi et al., 2015) انجام شد. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی استخراج شده به مدت 180 دقیقه در دمای 37°C با کاربرد آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *MseI* برش خوردند. سپس سازگار سازهای *EcoRI* و *MseI* به مدت دو ساعت در دمای 37°C و یک ساعت در دمای 20°C به انتهای DNA برش یافته متصل شدند. در مرحله بعد نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به نسبت ۵:۱ رقیق شدند و با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* واجد یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳ مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی در این مرحله شامل 94°C به مدت ۳ دقیقه، تکرار برنامه 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 60°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۶۰ ثانیه به تعداد ۳۰ چرخه و در نهایت 72°C به مدت پنج دقیقه بود. ترکیب مواد شامل: محصول هضم و اتصال رقیق شده $6\mu\text{l}$ ، از هر آغازگر 0.5mM ، بافر PCR (10X) حاوی MgCl_2 به میزان $2.5\mu\text{l}$ ، از

جدول ۱- ژنوتیپ‌های چای و منشأ آن‌ها در تجزیه و تحلیل AFLP

Table 1. Tea genotypes and their origin characterized by AFLP analysis

ژنوتیپ	منبع و کد	ژنوتیپ	منبع و کد	ژنوتیپ	منبع و کد
Genotype	Origin and code	Genotype	Origin and code	Genotype	Origin and code
100	F1	101 larg leaf	G2	250	W2
444	F2	102	G3	252	W3
455	F3	DN	S1	276	W4
2021	F4	KEN	S2	2771	W5
791	F5	62.5	S3	449	W6
468	F6	62.6	S4	2781	W7
2023	F7	3017	S5	270	W8
416	F8	B275	S6	281	W9
440	F9	DG39	S7	205	W10
101 smal leaf	G1	277	W1	2821	W11

F: منطقه مرکزی کشت چای ایران؛ W: منطقه غربی کشت چای ایران؛ G: ژنوتیپ‌های منتسب به گرجستان؛ S: کلون‌های وارداتی از سریلانکا
F: Central tea growing region of Iran; W: Western tea growing region of Iran; G: Genotypes attributed to Georgia; S: Imported clones

جدول ۲- توالی‌های آداپتورهای الیگونوکلئوتیدی و آغازگرهای پیش‌انتخابی و انتخابی مورد استفاده در تجزیه و تحلیل

AFLP برای شناسایی ۳۰ ژنوتیپ چای

Table 2. Sequences of oligonucleotide adapters, and preselective and selective primers used in AFLP analysis for the characterization of 30 tea genotypes

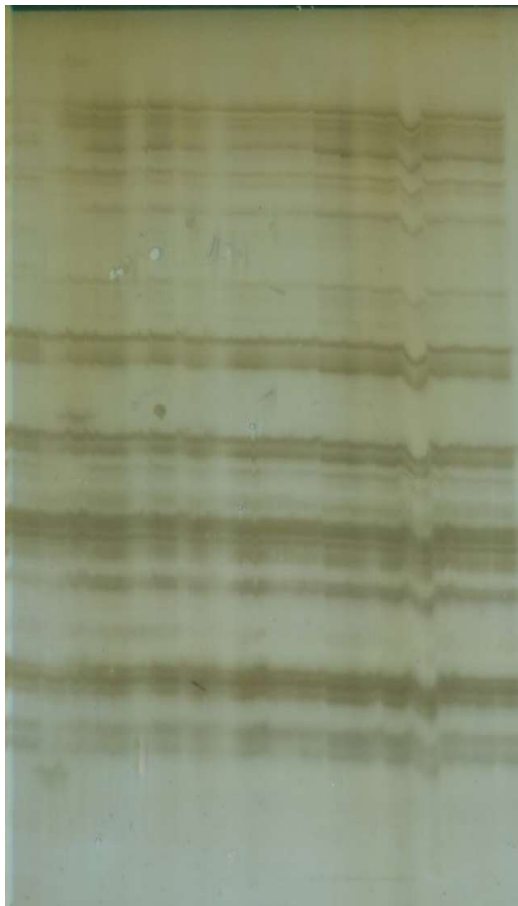
آداپتور/آغازگر Adapter/primer	کد Code	توالی Sequence 5' → 3'
آداپتورها Adaptors		
<i>EcoRI</i> آداپتور Adaptor <i>EcoRI</i>		CTCGTAGACTGCGTACC
<i>MseI</i> آداپتور Adaptor <i>MseI</i>		AATTGGTACGCAGTCTAC GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
آغازگرهای پیش تکثیر انتخابی Primers of preselective amplification		
C + <i>EcoRI</i> آغازگر <i>EcoRI</i> primer + C	EC	GACTGCGTACCAATTC+C
A + <i>MseI</i> آغازگر <i>MseI</i> primer + A	MA	GATGAGTCCTGAGTAA+A
آغازگرهای تکثیر انتخابی Primers of selctive amplification		
<i>EcoRI</i> + 3-CGC	ECGC	GACTGCGTACCAATTC+CGC
<i>EcoRI</i> + 3-CCA	ECCA	GACTGCGTACCAATTC+CCA
<i>EcoRI</i> + 3-CCG	ECCG	GACTGCGTACCAATTC+CCG
<i>EcoRI</i> + 3-CAG	ECAG	GACTGCGTACCAATTC+CAG
<i>MseI</i> + 3-AGA	MAGA	GATGAGTCCTGAGTAA+AGA
<i>MseI</i> + 3-AGT	MAGT	GATGAGTCCTGAGTAA+AGT
<i>MseI</i> + 3-AAG	MAAG	GATGAGTCCTGAGTAA+AAG

عدم وجود باند است. شباهت ژنتیکی بر اساس داده‌های AFLP با انجام مقایسه زوجی بین تمامی نمونه‌ها بر اساس ضریب تطابق ساده (SM) با استفاده از ماژول Simqual نرم‌افزار NTSYS-pc-2.11 (Rohlf, 2004) محاسبه شد. ماتریس شباهت با استفاده از آزمون تطابق ماتریس منتل با استفاده از ماژول MxComp در NTSYS-pc-2.11 (Rohlf, 2004) مقایسه شد. سپس، تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی UPGMA انجام شد. میزان بازنمایی دندروگرام با تخمین ضریب همبستگی کوفنیتیک برای دندروگرام و مقایسه آن با ماتریس شباهت با استفاده از آزمون تطابق ماتریس منتل (Mantel, 1967) ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های AFLP به صورت حضور (۱) یا عدم حضور (۰) برای هر جایگاه تکثیر شده در محدوده اندازه ۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز (bp) امتیازدهی شدند. توانایی جفت آغازگرهای پرکاربرد در تمایز بین ژنوتیپ‌ها با محاسبه قدرت تفکیک (Rp) آن‌ها با استفاده از فرمول $R_p = \sum I_b$ (Prevost and Wilkinson, 1999) ارزیابی شد؛ در این رابطه $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ ؛ p و نسبت ژنوتیپ‌هایی که حاوی آن قطعه می‌باشند، است. سطح محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول $PIC = 2f_i(1-f_i)$ (Roldain-Ruiz et al., 2000) محاسبه شد؛ در این رابطه f_i فراوانی قطعه نشانگر نام هنگام وجود و $(1-f_i)$ فراوانی قطعه نشانگر نام در حالت

نتایج و بحث

ترکیبات آغازگر AFLP: نتایج حاصل از این بررسی اندازه‌گیری شد و بر اساس کیفیت و قدرت تکثیر، شش ترکیب آغازگر E-CGA/M-، E-CGA/M-ACT، E-CGA/M-AGA، E-AAG، E-CAG/M-ACT، E-CGC/M-AAG و E-CAG/MAAG که دارای بهترین قدرت تکثیر و بیشترین تعداد باندهای تکثیر شده بودند، برای بررسی تمامی نمونه‌ها انتخاب شدند. نام ترکیبات آغازگر آزمایش شده، تعداد کل باندهای تکثیر شده، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و قدرت تفکیک (Rp) برای هر ترکیب آغازگر در جدول ۳ ارائه شده است. شش ترکیب آغازگر مورد استفاده برای شناسایی ۳۰ نمونه چای، در مجموع ۱۷۸ باند تولید کردند. تعداد باندهای تولید شده توسط هر ترکیب آغازگر از ۳۷ (E-CAG/MAAG) تا ۲۴ (E-CGA/MACT) متغیر بود (با میانگین ۳۷/۱۷ باند بود). از ۱۷۸ باند، ۱۴۷ باند چندشکل بودند که ۷۷/۶۱ درصد چندشکلی را نشان دادند. درصد باندهای چندشکل در بین ترکیبات آغازگر تفاوت قابل توجهی داشت. به عنوان مثال، بالاترین نسبت چندشکلی (۸۳/۷۸ درصد) با جفت آغازگر E-CAG/MAAG به دست آمد، در حالی که کمترین میزان با جفت آغازگر E-CAG/MACT (۷۱/۸۸ درصد) مشاهده شد. درصد چندشکلی محاسبه شده در مقایسه با سایر تحقیقات مناسب است که نشان‌دهنده انتخاب ترکیبات مناسب می‌باشد (Kafkas *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2009). شکل ۱ تصویر بخشی از نتیجه الکتروفورز ترکیب آغازگر MAGA/ECGC را نشان می‌دهد.



شکل ۱- بخشی از نتیجه الکتروفورز ترکیب آغازگر MAGA/ECGC؛ از چپ به راست نمونه‌های F3، F4، F5، F6، F7، F8، F9، G1، G2، G3، S1، S2، S3، S4، S5، S6، S7 و W1

Figure 1. Part of the electrophoresis result of the ECGC/MAGA primer combination; samples F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, G1, G2, G3, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 and W1 (From left to right).

جدول ۳- اسامی ترکیبات آغازگر مورد آزمایش، تعداد کل باندهای تکثیر، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکل برای هر ترکیب آغازگر

Table 3. Names of the primer combinations tested, the total number of amplification bands, the number of polymorphic bands, the percentage of polymorphism, and the polymorphic information content for each primer combination

ترکیب آغازگر primer combination	کد ترکیب Combination cod	باند کل Total bands (no.)	باند چندشکل Polymorphic bands (no.)	درصد چندشکلی Polymorphism (درصد)	محتوای اطلاعات چندشکل Polymorphism content (PIC) information	قدرت تفکیک (Rp) Resolving power
ECGA/MAGA	C1	36	27	75	0.48	14.20
ECGA/MACT	C2	24	20	83.33	0.46	12.27
ECGC/MAAG	C3	27	21	77.78	0.50	13.47
ECGC/MAGA	C4	31	25	80.65	0.48	16.60
ECAG/MAAG	C5	37	31	83.78	0.46	16.67
ECAG/MACT	C6	32	23	71.88	0.49	16.78
کل Total		187	147	78.61	0.48	89.99
میانگین Average		31.17	24.50			15.00

گزارش شده است (Khiavi et al., 2020a,b; Khiavi et al., 2022; Falakro Khiavi et al., 2020; Falakro et al., 2020) البته باید در نظر داشت که نرخ‌های چندشکلی مشابه یا بالاتر زمانی به دست آمدند که سایر تکنیک‌های نشانگر DNA مانند RAPD، ISSR و SRAP بر روی ژرم پلاسم‌های مختلف چای اعمال شدند. در مطالعات قبلی، ژنوتیپ‌های چای ایرانی به‌عنوان نوع چینی پذیرفته شده‌اند و پیش از این نشان داده شده بود که چای‌های نوع چینی بیشترین تنوع را دارند (Paul et al., 1997). علاوه بر این، خودسازگاری و دگرگشتی طولانی مدت باعث می‌شوند که گیاه چای بسیار هتروژن باشد و در نتیجه تنوع ژنتیکی گسترده‌ای را به‌همراه داشته باشد (Chen et al., 2005).

محدوده محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) بین ۰/۴۶ برای ترکیب C3 و ۰/۵۰ برای C5 محاسبه شد. محتوای اطلاعات چندشکل کل برای تمام قطعات تکثیر شده، ۰/۴۸ محاسبه شد. این مقدار محتوای اطلاعات چندشکل نشان‌دهنده کارایی آغازگرها در تمایز تفاوت‌های ژنتیکی بین نمونه‌ها بود (Roldain-Ruiz, 2000). محتوای اطلاعات چندشکل در نشانگرهایی مانند AFLP در محدوده بین صفر و ۰/۵ است، هرچه این عدد محاسبه شده به ۰/۵ نزدیک‌تر باشد، به این معنی است که قدرت شناسایی و تفکیک بالاتری دارد. خیاوی و همکاران (Khiavi et al., 2016) در بررسی ژنوتیپ‌های لیمو ایرانی با استفاده از نشانگرهای AFLP، محدوده PIC را از ۰/۴۰ تا ۰/۵۰ با میانگین ۰/۴۸ گزارش کردند. مقادیر قدرت تفکیک (Rp) ترکیبات آغازگر AFLP مورد استفاده برای تحقیق حاضر از ۱۲/۲۷ برای ترکیب C2 تا ۱۶/۸۷ برای ترکیب C6، با مجموع ۸۸/۹۹ و میانگین ۱۵/۰۰ متغیر بود. کافکاس و همکاران (Kafkas et al., 2009) در بررسی چندشکلی و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های چای از ترکیب که توسط نشانگرهای AFLP آشکار شد، محدوده Rp را از ۶۲/۶ تا ۸۱/۹، با مجموع ۴۳۷/۸ و میانگین ۷۳/۰ گزارش کردند. باید در نظر داشت که دلیل عدد بالای محاسبه شده توسط آن‌ها، تعداد بیشتر باندهای چندشکل است. یائو و همکاران (Yao et al., 2008) از

بر اساس نتایج حاضر می‌توان پیشنهاد کرد که تجزیه و تحلیل AFLP با موفقیت ژنوتیپ‌های چای را از یکدیگر متمایز کرده است. پیش از این نشانگرهای AFLP برای شناسایی ژرم پلاسم‌های مختلف چای مورد استفاده قرار گرفته بودند. در مطالعات کافکاس و همکاران (Kafkas et al., 2009)، برای بررسی چندشکلی و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های چای ترکیه، از شش آغازگر AFLP استفاده شد. آن‌ها درصد چندشکلی را در محدوده ۵۶/۱ تا ۸۷/۳ درصد با میانگین ۶۹/۸ درصد گزارش کردند. میسرا و همکاران (Mishra et al., 2009) تنوع ژنتیکی کلون‌های کشت شده در منطقه دارجلینگ را بررسی کردند و در مجموع ۶۷۷ باند با استفاده از ۸ جفت آغازگر (۳/۲+۳) نوکلئوتیدی) تکثیر کردند که از این تعداد ۴۶۹ باند در مجموعه‌ای از ۲۹ کلون چای چندشکل بودند؛ در حالی که از ۱۷۴ باند، ۱۲۹ باند در مجموعه‌ای دیگر از ۵۰ کلون چای با استفاده از چهار جفت آغازگر (۳/۳+۴) نوکلئوتیدی) چندشکل بودند. پائول و همکاران (Paul et al., 1997) ۳۲ ژنوتیپ چای از هند و کنیا را با استفاده از پنج جفت آغازگر AFLP مطالعه کردند که به‌طور میانگین ۷۳ باند تکثیری و ۱۵ باند چندشکل در هر ترکیب آغازگر شناسایی کردند. بالاساروانان و همکاران (Balasaravanan et al., 2003) از سه جفت آغازگر AFLP برای مطالعه ارزیابی تنوع ۴۹ رقم چای جنوب هند استفاده کردند و ۱۵۵۵ قطعه تکثیری چندشکل و بدون ابهام با میانگین ۵۱۸/۳ لوکوس چندشکل در هر جفت آغازگر به‌دست آوردند.

بررسی ما نشان می‌دهد که شش جفت آغازگر AFLP استفاده شده در انگشت‌نگاری ۳۰ نمونه چای از کلکسیون‌های چای در ایران؛ تعداد باندها و میزان چندشکلی آن‌ها مشابه و (به ترتیب) بیشتر از مواردی بود که در مطالعات قبلی مشاهده شد که این نشانه‌ای از درجه بالای چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش است. وجود تنوع بالا در ژرم پلاسم چای در ایران در مطالعات پیشین با نشانگرهای ژنتیکی متفاوت نیز

W5 (از منطقه غربی کشت چای، ایستگاه تحقیقات چای فشالم) با مقدار ۰/۲۹ یافت شد. همچنین، دو کلون چای از سریلانکا حداکثر تشابه (۸۵ درصد) را با میانگین ۰/۶۱ نشان دادند. در مطالعات قبلی بر روی نمونه‌های چای ایرانی، خیابوی و همکاران (Khiavi et al., 2020a) با استفاده از نشانگرهای SRAP، دامنه‌ای از تشابه را از ۰/۳۹۳ تا ۰/۹۳۳ با میانگین ۰/۷۱۵ گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر فلک‌رو و خیابوی (Falakro and Khiavi, 2020) از نشانگرهای RAPD و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی و روابط ژرم‌پلاسم چای ایرانی استفاده کردند و دامنه تشابه را به ترتیب ۰/۳۷ تا ۰/۶۸ با میانگین ۰/۵۹ و ۰/۵۹ تا ۰/۹۶ با میانگین ۰/۷۳ اعلام کردند. درگاه و همکاران (Dargah et al., 2023) هم در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مناطق مختلف چایکاری جنوب دریای خزر دامنه تشابه را از ۰/۲۴ تا ۰/۹۳ با متوسط ۰/۶۲ اعلام کردند. بر اساس این گزارش‌ها، دامنه تشابه محاسبه شده توسط نشانگرهای AFLP در مطالعه حاضر قابل قبول است.

۲۱ آغازگر ISSR برای شناسایی ۴۸ رقم چای از چین، کنیا و ژاپن استفاده کردند و میانگین RP را ۷/۴ اعلام کردند؛ بنابراین، از نتیجه محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و مقادیر قدرت تفکیک (Rp)، مشخص شد که ترکیبات آغازگر به کار رفته در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های داده شده، مناسب و کارآمد بودند.

روابط فیلوژنتیک بین ژنوتیپ‌ها: ضریب همبستگی (کوفتیک) بین ماتریس تشابه و خوشه‌بندی حاصله محاسبه شد. مشخص گردید که ضریب تشابه تطابق ساده (SM) و روش الگوریتمی UPGMA با ضریب کوفتیک ۰/۷۸ بهترین ضرایب و روش‌ها هستند. این میزان از ضریب کوفتیک نشان می‌دهد که ۷۸ درصد اطلاعات ماتریس تشابه در نمودار خوشه‌بندی حاصله به نمایش گذاشته شده است.

در ماتریس تشابه مشاهده شده بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده (SM)، حداقل تشابه بین نمونه‌های F8 (از منطقه مرکزی کشت چای، ایستگاه تحقیقات چای فجر) و

جدول ۴- ماتریس ضریب تشابه تطابق ساده (SM) برای ۳۰ نمونه چای مورد بررسی

Table 4. Simple matching similarity coefficients matrix among 30 tes samples studied

کد	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	G1	G2	G3	S1	S2	S3
ژنوتیپ															
Genotype code															
F1	1.00														
F2	0.61	1.00													
F3	0.65	0.72	1.00												
F4	0.64	0.32	0.39	1.00											
F5	0.56	0.57	0.55	0.52	1.00										
F6	0.62	0.62	0.80	0.50	0.54	1.00									
F7	0.62	0.66	0.78	0.45	0.64	0.76	1.00								
F8	0.45	0.55	0.62	0.52	0.45	0.50	0.53	1.00							
F9	0.68	0.78	0.79	0.43	0.52	0.73	0.78	0.57	1.00						
G1	0.52	0.59	0.60	0.59	0.47	0.65	0.60	0.50	0.59	1.00					
G2	0.64	0.64	0.65	0.55	0.57	0.66	0.66	0.43	0.65	0.76	1.00				
G3	0.45	0.69	0.62	0.51	0.64	0.58	0.59	0.69	0.64	0.57	0.57	1.00			
S1	0.64	0.66	0.68	0.49	0.56	0.67	0.62	0.62	0.73	0.50	0.64	0.64	1.00		
S2	0.55	0.64	0.68	0.45	0.56	0.63	0.75	0.56	0.68	0.73	0.73	0.56	0.57	1.00	
S3	0.53	0.57	0.64	0.55	0.68	0.61	0.60	0.58	0.59	0.50	0.60	0.82	0.66	0.55	1.00
S4	0.55	0.62	0.57	0.54	0.59	0.54	0.55	0.66	0.66	0.50	0.50	0.78	0.73	0.52	0.68
S5	0.64	0.63	0.62	0.59	0.73	0.58	0.60	0.61	0.66	0.51	0.62	0.73	0.74	0.59	0.80
S6	0.54	0.72	0.68	0.52	0.57	0.66	0.64	0.50	0.73	0.57	0.62	0.76	0.58	0.59	0.66
S7	0.52	0.72	0.68	0.45	0.57	0.70	0.66	0.53	0.73	0.66	0.73	0.71	0.68	0.65	0.63
W1	0.50	0.63	0.63	0.38	0.57	0.62	0.64	0.45	0.64	0.64	0.56	0.57	0.52	0.66	0.47
W2	0.60	0.57	0.48	0.54	0.52	0.40	0.60	0.44	0.56	0.38	0.55	0.45	0.45	0.56	0.51
W3	0.43	0.59	0.59	0.52	0.39	0.66	0.58	0.59	0.68	0.66	0.59	0.53	0.52	0.68	0.48
W4	0.48	0.63	0.57	0.55	0.52	0.52	0.48	0.61	0.55	0.71	0.57	0.65	0.62	0.62	0.57
W5	0.71	0.52	0.48	0.62	0.66	0.56	0.64	0.29	0.51	0.55	0.69	0.50	0.47	0.58	0.52
W6	0.66	0.46	0.50	0.59	0.43	0.55	0.57	0.51	0.53	0.48	0.63	0.52	0.56	0.59	0.55
W7	0.72	0.51	0.57	0.57	0.50	0.64	0.59	0.52	0.55	0.59	0.68	0.59	0.55	0.57	0.67
W8	0.70	0.56	0.50	0.61	0.59	0.43	0.59	0.48	0.60	0.45	0.60	0.40	0.52	0.57	0.44
W9	0.62	0.72	0.59	0.52	0.62	0.62	0.64	0.43	0.66	0.64	0.80	0.71	0.61	0.62	0.70
W10	0.69	0.48	0.52	0.58	0.58	0.62	0.67	0.45	0.59	0.52	0.62	0.50	0.55	0.62	0.57
W11	0.60	0.64	0.67	0.52	0.68	0.59	0.69	0.64	0.67	0.47	0.67	0.66	0.70	0.53	0.69

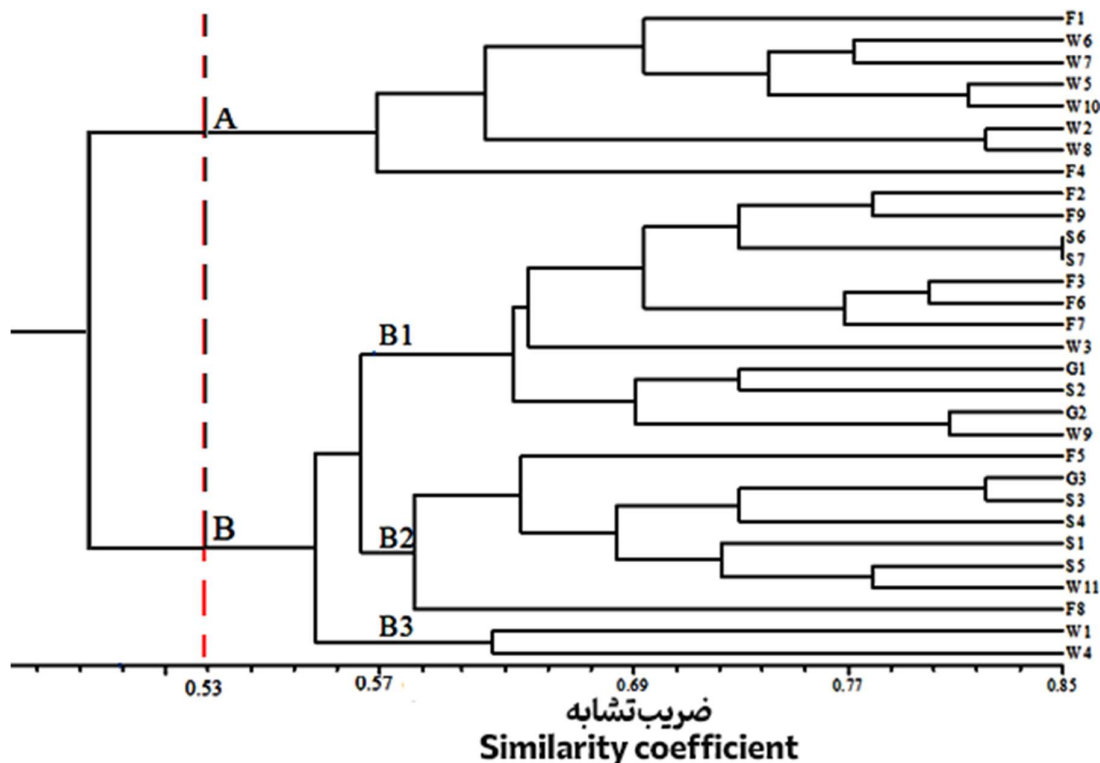
ادامه جدول ۴-

Table 4. (continued)

کد ژنوتیپ Genotype code	S4	S5	S6	S7	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11
S4	1.00														
S5	0.68	1.00													
S6	0.69	0.66	1.00												
S7	0.67	0.64	0.85	1.00											
W1	0.61	0.38	0.52	0.57	1.00										
W2	0.51	0.47	0.57	0.53	0.59	1.00									
W3	0.49	0.53	0.69	0.75	0.56	0.52	1.00								
W4	0.68	0.58	0.56	0.56	0.64	0.44	0.62	1.00							
W5	0.48	0.57	0.61	0.65	0.46	0.66	0.44	0.36	1.00						
W6	0.48	0.51	0.57	0.57	0.52	0.72	0.52	0.40	0.70	1.00					
W7	0.48	0.60	0.55	0.57	0.46	0.55	0.41	0.41	0.69	0.77	1.00				
W8	0.47	0.50	0.55	0.50	0.50	0.82	0.49	0.45	0.64	0.65	0.53	1.00			
W9	0.53	0.71	0.73	0.69	0.55	0.56	0.52	0.48	0.66	0.66	0.73	0.53	1.00		
W10	0.50	0.64	0.60	0.59	0.41	0.62	0.46	0.33	0.81	0.79	0.77	0.66	0.63	1.00	
W11	0.54	0.78	0.57	0.56	0.47	0.48	0.50	0.51	0.50	0.51	0.63	0.52	0.71	0.54	1.00

را تشکیل دادند. این زیرگروه با پوشش ۴۰ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی، بزرگترین زیرگروه تشکیل شده بود. دو نمونه G1 و G2 با نام‌های "۱۰۱ برگ کوچک" و "۱۰۱ برگ بزرگ"، از جمله نمونه‌های متناسب به گرجستان هستند و میزان تشابه آن‌ها بر اساس ماتریس تشابه ۰/۷۶ است که بالاتر از میانگین تشابه می‌باشد. این موضوع نشان‌دهنده ارتباط بالای بین این دو نمونه است که در مطالعات خیاوی و همکاران (Khiavi *et al.*, 2020b) با استفاده از نشانگرهای ISSR نیز تأیید شده است. در مرحله دوم، در سطح تشابه حدود ۰/۵۷، زیرگروه دوم (B2) با هشت عضو (W11, F8, W1, S5, S4, S3, G3 و F5) تشکیل شد. این زیرگروه نیز از تمام مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری شد، اما در این زیرگروه، مشابه گروه اصلی اول (A)، گروهی از نمونه‌ها (نمونه‌های متعلق به کلون‌های سریلانکایی) وضعیت غالب را نشان می‌دهند، به طوری که ۵۰ درصد از اعضای این گروه توسط این نمونه‌ها تشکیل شده است. تنها عضوی که به دلیل منشأ گزارش شده آن در کنار کلون‌های سریلانکایی قرار می‌گیرد، نمونه G3 یا نمونه "۱۰۲"، از گرجستان است که به دلیل تاریخچه مورفولوژیکی خود (Khiavi *et al.*, 2020b)، به کلون‌های سریلانکایی شباهت دارد. در زیرگروه سوم (B3)، تنها دو نمونه باقیمانده، یعنی W1 و W4، از جمله نمونه‌های انتخاب شده از منطقه غربی کشت چای ایران هستند.

در تجزیه و تحلیل خوشه‌ای حاصل (شکل ۱)، نمونه‌های مورد بررسی را می‌توان در سطح تشابه ۰/۵۳ به دو گروه مجزا تقسیم کرد. گروه اول (A) شامل هشت عضو بود که F1 و F4 از نمونه‌های منطقه مرکزی کشت چای و بقیه نمونه‌ها (W2, W5, W6, W7, W8 و W10) متعلق به نمونه‌های منطقه غربی کشت چای ایران بودند. همان‌طور که در این گروه مشاهده می‌شود، بیش از ۸۰ درصد نمونه‌ها متعلق به منطقه غربی هستند که می‌تواند دلیلی برای اختصاصی بودن این گروه به آن منطقه باشد. دو نمونه باقی‌مانده از منطقه مرکزی نیز، به دلیل تشابه و وجود منشأ اولیه مشترک، در این گروه قرار گرفتند. اما برای تبیین این موضوع، باید گروه دوم (B) نیز بررسی شود. گروه دوم (B) در سطح تشابه ۵۳ درصد تشکیل شد و دارای ۲۲ عضو بود که ۷۳/۳۳ درصد از کل نمونه‌ها را شامل می‌شد. در این گروه، از تمام مناطق نمونه‌برداری، یعنی منطقه مرکزی و غربی کشت چای ایران، ژنوتیپ‌های متناسب به گرجستان و کلون‌های سریلانکایی، گنجانده شده‌اند. به دلیل تعداد بالای نمونه‌ها در این گروه، برای تحلیل پراکندگی نمونه‌ها در این گروه اصلی، آن به سه زیرگروه در سطح تشابه ۰/۵۷ تقسیم شد. ابتدا دوازده نمونه (W9, G1, S2, G2, F3, F6, F7, W3, S6, S7, F9 و F2) از تمام مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری شده و این زیرگروه



شکل ۱- دندروگرام ۳۰ نمونه چای با استفاده از نشانگرهای AFLP بر اساس روش UPGMA
Figure 1. Dendrogram of 30 tea samples using AFLP markers based on UPGMA

همان‌طور که در منابع ذکر شده است، کشت چای در ایران ابتدا در منطقه لاهیجان با کاشت سه پایه اصلی آغاز شد و سپس با تکثیر بذر به سایر مناطق (شرق و غرب) گسترش یافت. این امر باعث شد که ما نوعی رابطه ژنتیکی بین تمام گیاهان چای ایرانی داشته باشیم.

در برنامه‌های به‌نژادی ارقام چای، تخمین روابط ژنتیکی می‌تواند برای شناسایی والدین جهت تلاقی و کاهش تعداد ژنوتیپ‌های مورد نیاز برای حفظ تنوع ژنتیکی کافی، مفید باشد. مطالعات بیشتری برای افزایش تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم‌های چای ایرانی با معرفی ژنوتیپ‌های جدید از مناطق متنوع ایران، به‌ویژه از سایر ژرم‌پلاسم‌های سراسر

جهان، مورد نیاز است که طیف گسترده‌ای از تنوع ژنتیکی را در برنامه‌های به‌نژادی چای در آینده ایجاد نماید. ما برای اولین بار از نشانگر AFLP برای ارزیابی تنوع

همان‌طور که از پراکندگی نمونه‌ها در گروه‌ها و زیرگروه‌های اصلی معرفی شده مشاهده می‌شود، الگوی جغرافیایی خاصی برای پراکندگی وجود ندارد. بنابراین، این گفته که گروه اصلی اول (A) مخصوص نمونه‌های منطقه غربی کشت چای ایران است، صحیح نیست. عدم انطباق و پراکندگی نمونه‌ها با الگوی توزیع جغرافیایی در مطالعات قبلی بر روی گیاهان چای در ایران و جهان نیز مشاهده شده است. بسیاری از مطالعات در زمینه بررسی تنوع گیاهان چای در ایران نشان داده‌اند که توافقی بین توزیع جغرافیایی و گروه‌بندی‌های به دست آمده در تحلیل خوشه‌ای وجود ندارد (Khiavi *et al.*, 2020a,b; Chaeikar *et al.*, 2020; Dargah *et al.*, 2023; Khiavi *et al.*, 2022; Falakro *et al.*, 2020; Falakro and Khiavi, 2020; Falakro *et al.*, 2022). عدم انطباق پراکندگی نمونه‌ها در گروه‌ها با توزیع جغرافیایی را می‌توان با در نظر گرفتن تاریخچه کشت چای در ایران توجیه کرد.

چای نزدیک به هم را نیز از یکدیگر تفکیک کرد. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند به بهنژادگران در انتخاب متنوع‌ترین ژنوتیپ‌ها با ویژگی‌های مطلوب برای آغاز برنامه‌های تلاقی و انتخاب کمک کند.

ژنتیکی ژنوتیپ‌های چای ایرانی استفاده کردیم؛ AFLP با موفقیت چندشکلی و روابط ژنتیکی را در بین ژنوتیپ‌های چای ایرانی شناسایی کرد. دندروگرام UPGMA حاصل از باندهای AFLP حتی ژنوتیپ‌های

References

- 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 Science*, 165(2): 365–372. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00196-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00196-1)
- Banerjee, B. (1988). Dry matter production and partitioning by tea varieties under differential pruning. *Applied Agricultural Research*, 3: 326–328.
- Barajehfard, M., Siahpoosh, M.R. and Modarresi, M. (2016). QTLs Associated with stemlet and rootlet growth in the early stages of germination of wheat. *Plant Genetic Research*, 3(2): 59-68 (In Persian). <https://doi.org/10.29252/pgr.3.2.59>
- Chaeikar, S.S., Falakro, K., Rahimi, M., Khiavi, S.J. and 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.
- Chang, H.T. (1984). A revision of the tea resource plants. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 106: 1–12.
- Chen, L. and 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. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-2540-1>
- Chen, L., Yu, F.L. and Tong, Q.Q. (2000). Discussions on phylogenetic classification and evolution of sect Thea. *Journal of Tea Science*, 20: 89–94.
- Dargah, S.M., Rezaei, M.B., Jahromi, M.G., Jari, S.K. and Khiavi, Sh.J. (2023). Genetic resources diversity of tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) in the southern region of the Caspian Sea. *Plant Genetic Resources: Characterisation & Utilisation*, 21(2): 97–106. <https://doi.org/10.1017/S147926212300045X>
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4): 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Devarumath, R.M., Nandy, S., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N. and Raina, S.N. (2002). RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Reports*, 21: 166–173. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0496-2>
- Falakro, K. and 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.
- Falakro, K., Khiavi, Sh.J. and Chaeikar, S.S. (2020). Study of genetic diversity between some tea genotypes from foman-Iran. *Bioagrica*, 1(1): 1–10.
- Falakro, K., Khiavi, Sh.J., Gholami, M. and Pour Azizian, S. (2022). RAPD markers, instruments for determining the genetic relationships of tea plant in Iran. *Plant Researches Journal*, 35(2): 42–54 (In Persian)
- Kafkas, S., Ercisli, 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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134: 428–434. <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.4.428>
- Khiavi, Sh.J., Azadi Gonbad, R. and Falakro, K. (2020a). Identification of genetic diversity and relationships of some Iranian adviser genotypes using SRAP markers. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 3(1): 25–34.
- Khiavi, Sh.J., Cheraghi, K. and Azadi Gonbad, R. (2022). Morphological characteristics and ISSR markers, tools for studying the genetic diversity of tea plant in Iran. *Journal of Research in Horticultural Science*, 1(1): 57–72 (In Persian).

- Khiavi, Sh.J., Falakro, K., Chaeikar, S.S., Ramzi, S. and Kahneh, E. (2020b). Usage of morphological and ISSR markers for investigation of some Tea genotypes. *Plant Production Research Journal*, 26(4): 131–147 (In Persian).
- Khiavi, Sh.J., Hamidoghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. (2015). Evaluation of genetic diversity in acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes using AFLP markers. *Australian Journal of Crop Science*, 9(10): 996–1002.
- Khiavi, Sh.J., Hamidoghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. (2016). Studying of genetic diversity of some Iranian acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes via AFLP marker. *Journal of Plant Production Research*, 23(3): 81–96 (In Persian).
- Ma, J.Q., Yao, M.Z., Ma, C.L., Wang, X.C., Jin, J.Q., Wang, X.M. and Chen, L. (2014). Construction of a SSR-based genetic map and identification of QTLs for catechins content in tea plant (*Camellia sinensis*). 9(3): *PLoS One*, 9(3), e93131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093131>
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 175–178.
- Matsumoto, S., Kiriwa, Y. and Takeda, Y. (2002). Differentiation of Japanese green tea as revealed by RFLP analysis of phenyl-alanine ammonia-lyase DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 998–1002. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0806-z>
- Mishra, R.K., Chaudhury, S., Ahmad, A., Pradhan, M. and Siddiqi, T.O. (2009). Molecular analysis of tea clones (*Camellia sinensis*) using AFLP markers. *International Journal of Integrative Biology*, 5(2): 130–136.
- Namita, P., Mukesh, R. and Vijay, K.J. (2012). *Camellia sinensis* (green tea): a review. *Global Journal of Pharmacology*, 6: 52–59.
- Paul, S., Wachira, F.N., Powell, W. and 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. <https://doi.org/10.1007/s001220050408>
- Prevost, A. and Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
- Purseglove, J.W. (1968). *Tropical Crops: Dicotyledons*. Longmans Green, London, IND.
- Raina, S.N., Ahuja, P.S., Sharma, R.K., Das, S.C., Bhardwaj, P., Negi, R., Sharma, V., Singh, S.S., Sud, R.K., Kalia, R.K. and Pandey, V. (2012). Genetic structure and diversity of India hybrid tea. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(7): 1527–1541. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9782-6>
- Rohlf, F.J. (2004). *NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software, Setauket, New York. USA.
- 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. *Molecular Breeding*, 6: 593–602. <https://doi.org/10.1023/A:1011398124933>
- 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. *Indian Journal of Biotechnology*, 8(4): 370–376.
- Taniguchi, F., Kimura, K., Saba, T., Ogino, A., Yamaguchi, S. and Tanaka, J. (2014). Worldwide core collections of tea (*Camellia sinensis*) based on SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10: 1555–1565. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0779-0>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wachira, F.N., Tanaka, J. and Takeda, Y. (2001). Genetic variation and differentiation in tea (*Camellia sinensis*) germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76: 557–563.
- Wachira, F.N., Waugh, R., Hackett, C.A. and Powell, W. (1995). Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, 38: 201–210. <https://doi.org/10.1139/g95-025>
- Wheeler, D.S. and Wheeler, W.J. (2004). The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research*, 61: 45–65. <https://doi.org/10.1002/ddr.10341>
- Wickremasinghe, R.L. (1979). Tea. In: Mrak, E.M. and Steward, G.F., Eds., *Advances in Food Research*, pp. 229–286. Academic Press, New York, USA. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60159-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60159-7)

- Yang, C.S. and Hong, J. (2013). Prevention of chronic diseases by tea: possible mechanisms and human relevance. *Annual Review of Nutrition*, 33: 161–181. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150717>
- 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 programmes. *Plant Breeding*, 127: 166–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01448.x>
- Zirak, R., Soleimani, A., Zeinolabedini, M., Hatami Maleki, H. and Kheiri, A. (2018). Morphological and AFLP - Based Genetic Diversity Assessment of *Elaeagnus angustifolia* L.. *Plant Genetic Research*, 5(2): 41-54 (In Persian). <https://doi.org/10.29252/pgr.5.2.41>