

گروه‌بندی عناب‌های ایران بر اساس صفات کمی و نشانگرهای ISSR و RAPD

Grouping Jujubes of Iran Based on Quantitative Characteristics and ISSR and RAPD Markers

کمال غوث^۱، سعید ملک‌زاده شفارودی^۲، محمدحسن راشد محصل^۳،
محمدرضا اکبری^۴ و سیدحسن رضوی^۵

۱- کارشناس باغبانی، مدیریت جهاد کشاورزی سریشه
۲ و ۳- به ترتیب استادیار و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴ و ۵- کارشناس ارشد، سازمان جهاد کشاورزی خراسان جنوبی، بیرجند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۱

چکیده

غوث، ک.، ملک‌زاده شفارودی، س.، راشد محصل، م. ح.، اکبری، م. ر. و رضوی، س. ح. ۱۳۹۲. گروه‌بندی عناب‌های ایران بر اساس صفات کمی و نشانگرهای ISSR و RAPD. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۱۹۰-۱۷۳.

عناب (*Zizyphus jujuba* Mill.) یکی از گیاهان باغی مهم با گونه‌ها و واریته‌های متنوع در منطقه آسیای مرکزی و غربی است که در بسیاری از مناطق و استان‌های ایران پراکنش طبیعی دارد. این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و ژنومی با استفاده از صفات کمی و مارکرهای مولکولی ISSR و RAPD در کلکسیون عناب ایران، شامل نمونه‌های جمع‌آوری شده از هشت استان، در استان خراسان جنوبی انجام شد. تنوع قابل ملاحظه‌ای در میان ۲۹ اکوتیپ مورد بررسی با کمک مارکرهای یاد شده به دست آمد. از میان سیزده پرایمر ISSR استفاده شده، شش پرایمر از جمله $(AC)_8YT$ و $(GA)_8A$ انتخاب و ۸۴ مکان بانندی به دست آمد که در ۸۳٪ مورد، پلی‌مورفیسم مناسبی مشاهده شد. از میان پانزده پرایمر تصادفی RAPD استفاده شده، بیش از ۸۰٪ پلی‌مورفیسم بین مکان‌های تکثیر شده از شش پرایمر مشاهده شد. بررسی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از ژن *matK* وجود حداقل سه گونه مختلف را در میان اکوتیپ‌های کلکسیون عناب ایران اثبات کرد. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات کمی این اکوتیپ‌ها را در سه تا شش گروه اصلی دسته‌بندی کرد. به طور کلی تنوع عناب ایران در سه استان مازندران، اصفهان و خراسان جنوبی یافت شد و خراسان جنوبی تقریباً کل تنوع موجود در ایران را به عنوان یک هسته مرکزی تنوع در بر می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: عناب، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، اکوتیپ‌ها.

مقدمه

خصوصیات گیاه‌شناختی و خواص دارویی این گیاه بوده است. در خصوص انجام کارهای مولکولی و ایجاد ژرم پلاسما برای درخت عناب، در کشورهایمانند چین و هند کارهای تحقیقاتی بسیار خوبی انجام شده ولی چنین کارهایی در ایران انجام نشده است، بنابراین برای ثبت و شناسایی ارقام برتر در این گیاه باید نسبت به احداث کلکسیون که دربرگیرنده تمام اکوتیپ‌های موجود در سطح کشور با تناسب سطوح زیرکشت و مناطق پراکنش آنها باشد، اقدام شود. خاکدامن و همکاران (Khakdaman et al., 2006) اولین کلکسیون عناب را احداث و خصوصیات اکوتیپ‌های مختلف را بررسی کردند. از مواردی که در پژوهش آنها مد نظر قرار نگرفته بود، سطح زیر کشت این گونه در خراسان جنوبی بود که دارای بیشترین مقدار در کشور است ولی از کمترین تکرار در این پژوهش برخوردار بود. گروه‌بندی انجام شده در تحقیق آنها بدون در نظر گرفتن سطح زیر کشت این گونه در خراسان جنوبی بود، بنابراین لزوم انجام یک بررسی مجدد در این زمینه احساس می‌شد. برای انجام این کار، جهاد کشاورزی شهرستان سریشه در سال ۱۳۸۷ به منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی، فنولوژیکی و فیزیولوژیکی عناب نسبت به احداث یک کلکسیون عناب از هشت استان کشور، پنج اکوتیپ از خراسان جنوبی و یک اکوتیپ افغانی (با عنوان درح یک) که از گذشته‌های

عناب از گذشته‌های بسیار دور کشت می‌شده و در آثار و فسیل‌های به جا مانده قدمت آن به بیش از ۱۲ تا ۱۴ میلیون سال پیش می‌رسد. درختی است بومی چین که حدود ۷۷۰۰ سال پیش در چین کاشت می‌شده است و از طریق جاده ابریشم به سایر نقاط از جمله هندوستان، ایران، افغانستان و آسیای میانه انتقال یافته است (Ghouth, 2011) و در حقیقت درختی است که در زمین‌هایی که آب و شرایط خاک مناسب نداشته باشند، رشد می‌کند. گرچه در ایران کشت عناب در بیشتر استان‌های کشور به صورت پراکنده دیده می‌شود ولی استان خراسان جنوبی بیشترین سطح زیر کشت را دارد. درخت عناب تا ارتفاع ۲۵۰۰ متری در نواحی شمالی ایران مثل گرگان، گیلان، کاشمر (Ghouth, 2011, 2009)، بلوچستان، بندرعباس، کرمان، شیراز و اطراف سیستان و زابل می‌روید (Zargarie, 1993). از ۱۲۶۰ هکتار باغات عناب، ۱۱۶۸ هکتار در خراسان جنوبی قرار دارد که از آن ۱۷۰۲ تن محصول عناب خشک تولید می‌شود (Anonymous, 2010).

با وجود اهمیت اقتصادی عناب در تحقیقات ملی، این گیاه از توجه لازم برخوردار نبوده و نگارش مطالبی در رابطه با این ذخیره ژنتیکی کشور، حتی در حد تحقیقات داخلی نیز بسیار اندک است. اغلب مقالات و کتب منتشر شده داخل کشور در ارتباط با عناب نیز در مورد

دور در مناطق مرزی کاشت می‌شده است، اقدام کرد. این اکوتیپ‌ها از هشت استان عناب خیز کشور شامل استان‌های لرستان، مازندران، گلستان، خراسان جنوبی و رضوی، اصفهان، قم و فارس جمع‌آوری و در محل مناسب کاشته شدند. انجام بررسی‌های مولکولی به منظور شناخت ساختار ژنتیکی و بررسی‌های فنوتیپی برای گروه‌بندی اکوتیپ‌های عناب موجود در این کلکسیون از مهم‌ترین اهداف پژوهش حاضر در خراسان جنوبی بود.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۸۷ مدیریت جهاد کشاورزی سریش به منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی، فنولوژیکی و فیزیولوژیکی عناب، نسبت به احداث یک کلکسیون هشت اکوتیپ عناب از ۸ استان کشور، پنج اکوتیپ عناب خیز خراسان جنوبی و یک اکوتیپ عناب افغانی با نام درح یک که از گذشته‌های دور در مناطق مرزی کاشت می‌شده است، اقدام کرد. در این پژوهش برای گروه‌بندی این اکوتیپ‌های عناب بر اساس اطلاعات مربوط به دیسکریپتور عناب، صفات رویشی و زایشی نهال‌ها از جمله زاویه شاخه با تنه اصلی، تعداد خار در هر درخت، اندازه بزرگترین خار در شاخه‌ها، متوسط اندازه رشد شاخه یک‌ساله و دوساله، طول دم‌برگ، طول برگ، عرض برگ، طول و عرض برگ انتهایی، دفعات گلدهی، طول و عرض میوه، رنگ پوست

و گوشت میوه، تیپ هسته، ارتفاع درخت در زمان یادداشت‌برداری، سن پاجوش، شکل برگ، رنگ برگ، تنه دارای شیار یا فاقد شیار، درخت دارای پاجوش و بدون پاجوش و تعداد گل در هر درخت در بین اکوتیپ‌های مختلف در مدت دو سال مورد یادداشت‌برداری قرار گرفت. برای ثبت اطلاعات در رابطه با صفات کمی استفاده از وسایل اندازه‌گیری مانند کولیس، خط‌کش و گونیا و در رابطه با صفات کیفی، روش مشاهده‌ای مدنظر قرار گرفت. به منظور ارزیابی فیلوژنتیکی با استفاده از بارکدگذاری DNA و بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR در گیاه عناب، دو آزمایش مستقل انجام شد. آزمایش نخست با هدف ارزیابی فیلوژنتیکی در اکوتیپ‌های مختلف گیاه عناب و بهره‌گیری از روش CTAB (Zeng et al., 2002) و آزمایش دوم با هدف بررسی تنوع ژنتیکی بر اساس روش لی و همکاران (Li et al., 2009) از سیزده آغازگر معرفی شده توسط آنان استفاده شد. در پایان تجزیه داده‌های حاصل در هر دو آزمایش، بر اساس ضریب دایس و به روش UPGMA انجام شد.

نمونه‌های برگ‌گی تازه اکوتیپ‌های مذکور از کلکسیون دشت خاوران سریش تهیه و برای انجام آزمایش‌ها به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شد. در این پژوهش از ۳۲ اکوتیپ عناب استفاده شد. برگ‌ها بلافاصله به یخدان و سپس

- ۸- سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق انجام شد.
 - ۹- یک میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه و با واورنه کردن مخلوط شد.
 - ۱۰- سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۷۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد، به مدت ده دقیقه انجام شد.
 - ۱۱- محلول رویی به یک تیوپ سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری جدید انتقال یافت و ۱۰ درصد حجم، بافر CTAB به آن اضافه و جهت مخلوط شدن بهتر بهم زده شد.
 - ۱۲- استخراج کلروفرم- ایزوآمیل الکل تکرار شد.
 - ۱۳- محلول رویی به دو تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد.
 - ۱۴- نیمی از حجم، NaCl ۵ مولار به هر میکروتیوب اضافه و به خوبی مخلوط شد.
 - ۱۵- حجم مساوی از اتانول مطلق سرد به نمونه‌ها اضافه و مخلوط شد.
 - ۱۶- مخلوط در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به منظور ته‌نشین شدن DNA قرار گرفت.
 - ۱۷- مخلوط در چهار درجه سانتی‌گراد، به مدت ده دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد.
 - ۱۸- اتانول دور ریخته شده و رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد.
 - ۱۹- پس از خشک شدن در دمای اتاق، پلت در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر استریل
- به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل و استخراج DNA از برگ‌های جوان یخ‌زده انجام شد.
 - مراحل مختلف استخراج DNA برای استفاده از ماکرهای RAPD به شرح زیر بود:
 - ۱- تقریباً سه گرم از بافت برگ در نیتروژن مایع، با استفاده از هاون پودر شد.
 - ۲- پودر حاصل به یک تیوپ سانتریفیوژ استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و یک میلی‌لیتر بافر بدون CTAB به آن اضافه شد (بافر قبلاً در صفر درجه شده بود).
 - ۳- محلول حاصل چند بار به آرامی وارونه شد تا به خوبی مخلوط شود و سپس در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه قرار گرفت.
 - ۴- سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه انجام شد.
 - ۵- محلول رویی دور ریخته شد، در صورتی که مایع رویی خیلی چسبناک بود، ماده ته‌نشین شده بار دیگر توسط یک میلی‌لیتر بافر بدون CTAB شسته شد.
 - ۶- بافر استخراج CTAB به ماده ته‌نشین اضافه و به آرامی از طریق تکان دادن مخلوط شد.
 - ۷- نمونه‌ها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد در یک حمام آب، به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و در این مدت نمونه‌ها دو تا سه بار به آرامی به هم زده شدند.

- حل شد.
- ۲۰- DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.
- بتا مریکاپروتانول (BME) پس از حل شدن کامل مواد و پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) پس از مخلوط کردن سایید مواد و در هنگام استفاده باف استخراج، به منظور حذف بهتر ترکیبات فنی اضافه می‌شود، این ماده هر چه تازه‌تر باشد نتیجه بهتری جهت هضم پروتئین‌ها می‌دهد.
- مراحل مختلف استخراج DNA برای استفاده از مارکر ISSR به شرح ذیل بود:
- ۱- پودر کردن برگ‌ها با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی
 - ۲- انتقال نمونه پودر شده به تیوپ‌های ۱۵ میلی‌لیتری و افزودن یک میلی‌لیتر بافر بدون CTAB به آن (بافر قبلاً در صفر درجه سرد شده بود).
 - ۳- وارونه کردن محلول حاصل جهت مخلوط شدن بهتر و نگهداری در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه
 - ۴- سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای چهار درجه به مدت چهار دقیقه
 - ۵- حذف محلول رویی
 - ۶- افزودن بافر استخراج CTAB به ماده ته‌نشین شده
 - ۷- قرار دادن نمونه‌ها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد در یک حمام آب، به مدت ۶۰ دقیقه (هر ۲۰ دقیقه تیوپ‌ها چندین بار وارونه شدند)
- تا بافر بهتر عمل کند).
- ۸- سرد شدن نمونه‌ها در دمای اتاق
 - ۹- افزودن یک میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) به هر تیوپ.
 - ۱۰- سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۷۰۰۰ دور بر دقیقه و در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه
 - ۱۱- انتقال محلول رویی به یک تیوپ سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری جدید و افزودن ۱۰ درصد حجم، بافر CTAB به آن
 - ۱۲- تکرار مرحله استخراج کلروفرم- ایزوآمیل الکل
 - ۱۳- انتقال محلول رویی به دو تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری
 - ۱۴- افزودن نیمی از حجم، NaCl ۵ مولار به هر میکروتیوپ
 - ۱۵- افزودن حجم مساوی از اتانول مطلق سرد به نمونه‌ها. در این مرحله محلول شفاف تولید شد که امکان مشاهده کلاف DNA در آن وجود داشت.
 - قرار دادن مخلوط در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت رسوب دادن DNA
 - ۱۷- سانتریفیوژ در ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ده دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه. در این حالت DNA به صورت رسوب در ته محلول قرار داشت.
 - ۱۸- دور ریختن اتانول
 - ۱۹- شستشوی رسوب DNA با اتانول

- ۷۰ درصد جدول ۱ بود.
- ۲۰- خشک شدن پلت در دمای اتاق
- ۲۱- حل کردن پلت در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل
- ۲۲- DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.
- مواد و مقادیر مورد نیاز آن‌ها برای تهیه بافر استخراج DNA برای مارکر SSR نیز مطابق
- برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول EDTA نیم مولار، ۱۸/۶۱۲ گرم از این ماده در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. جهت بهتر حل شدن از قرص NaOH استفاده شد تا آن‌جا که pH برابر ۸ شود، در این pH، EDTA حل می‌شود. سپس حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

جدول ۱- مواد و مقادیر آن‌ها در بافر استخراج DNA برای مارکر RAPD
Table 1. Materials and their amounts in buffer for DNA extraction for RAPD markers

مقدار ماده در هر واکنش Quantity in each cycle	غلظت نهائی Final concentration	غلظت استوک Stock concentration	ماده Substance
2.0 ml	100 mM	1 M	Tris-HCl (pH=8)
5.6 ml	1.4 M	5 M	NaCl
0.8 ml	20 Mm	0.5 M	EDTA (pH=8)
0.6 g	0.3	-	CTAB
0.4 ml	0.2	-	BME
4.9	0.2	-	PVP
To 20 ml	-	-	H ₂ O

نتایج و بحث

نام اکوتیپ‌های عناب مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

گروه بندی اکوتیپ‌های عناب بر اساس صفات مورفولوژیکی

اطلاعات مربوط به طول بلندترین خار، زاویه شاخه، طول شاخه یک ساله، دفعات رشد سالیانه (دفعات گل) و تعداد خار هر درخت برای اکوتیپ‌های عناب یادداشت‌برداری شد (جدول ۳) و با روش تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها

گروه بندی شدند (شکل ۱).

بال (Bal, 1992) نیز طی ده سال مطالعه و بررسی در بخش باغبانی دانشگاه کشاورزی هند، کلید شناسایی ارقام مختلف کنار موریتانی را که از خانواده عناب است، تهیه کرد. وی شکل برگ، شاخه‌دهی، شکل خار، وضعیت قاعده برگ، رنگ برگ و طول دم‌برگ را قابل اطمینان‌ترین ویژگی برای طبقه‌بندی ارقام ذکر کرد. خاکدامن و همکاران (Khakdaman *et al.*, 2006) نیز در کار تحقیقاتی خود اطلاعات مربوط به طول

جدول ۲- نام اکوتیپ‌های عناب موجود در باغ کلکسیون سریشه
Table 2. Name of jujube ecotypes planted in the collection garden of Sarbisheh

شماره No.	Ecotype name	نام اکوتیپ	تعداد درخت Number of tree
1	Qom	قم	10
2	Khanghah in Brdaskan	خانقاه در بردسکن	10
3	Magham sari in Sari	مقام ساری در ساری	10
4	Kangan in Sarbisheh	کنگان در سریشه	10
5	Noghab in Sarbisheh	نوخاب در سریشه	10
6	Asfich in Sarbisheh	آسفیچ در سریشه	10
7	Doroh 2 in Sarbisheh	درح ۲ سریشه	10
8	Bayazieh in Isfahan	بیاضیه اصفهان	10
9	Kalkestan in Sarbisheh	کلکستان سریشه	10
10	Baznavid in Aligoodarz	بزنوید در الیگودرز	10
11	Koohpayeh in Isfahan	کوهپایه در اصفهان	10
12	Shahrza in Isfahan	شهرضا در اصفهان	10
13	Tajnood in Qayen	تجنود در قاین	10
14	Keshook in Birjnd	کشوک در بیرجند	10
15	Dorokhsh in Dramian	درخش در میان	10
16	Ardestan in Isfahan	اردستان اصفهان	10
17	Doroh 1 in Sarbisheh	درح ۱ در سریشه	10
18	Manganehie in Nehbandan	منگنه‌ای شهر نهبندان	10
19	Cheshmeh Aqsoo in Kalaleh	چشمه آغسو در شهر کلاله	10
20	Dahaneh larim in Jooybar	دهنه لاریم در شهر جویبار	10
21	Giouk in Birjand	گیوک در شهر بیرجند	10
22	Anbarestan 1 in Khoshab of Sabzevar	عنبرستان ۱ در خوشاب شهر سبزوار	10
23	Gazik in Darmian	گزیک شهر در میان	10
24	Doostiran in Kazeroon	دوستیران در کازرون	10
25	Anbarestan 2 in Khoshab of Sabzevar	عنبرستان ۲ در خوشاب شهر سبزوار	10
26	Kangan 1 in Sarbisheh	کنگان ۱ سریشه	10
27	Kangan 2 in Sarbisheh	کنگان ۲ سریشه	10
28	Noghab 2 in Sarbisheh	نوخاب ۲ در شهر سریشه	10
29	Khoonik in Birjand	خونیک شهر بیرجند	10
30	Borzaderan in Birjand	برزاداران شهر بیرجند	10
31	Nashtifan in Khaf	نشتیفان شهر خواف	10
32	Alqoor in Birjand	القور شهر بیرجند	10

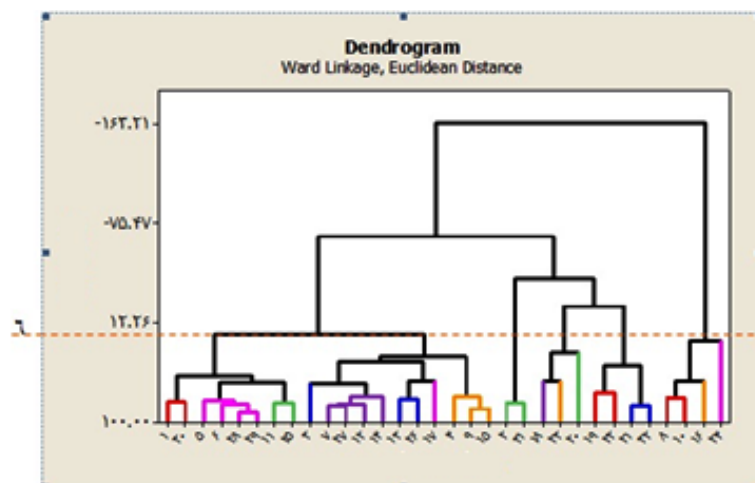
جدول ۳- خصوصیات رویشی اکوتیپ‌های عناب ایران
Table 3. Vegetative characteristics of jujube ecotypes of Iran

شماره ژنوتیپ Genotype No.	ژنوتیپ Genotype	دفعات گلدهی Flowering time	زاویه شاخه Branch angle	طول بلندترین خار Length of longest spines (cm)	طول شاخه یک ساله Length of one year branch (cm)	تعداد خار در شاخه Number of thorn at branch
1	Qahan	3	67	2.57	57.57	164.00
2	Khanghah	3	78	2.20	51.60	115.00
3	Magham sari	3	62	2.00	42.80	101.00
4	Kangan 1	3	51	2.20	49.00	216.00
5	Noghab 1	3	63	2.28	60.50	173.00
6	Asfich	3	50	2.66	76.60	156.300
7	Doroh 2	3	50	2.57	62.80	149.00
8	Bayazieh	3	43	2.22	26.33	35.00
9	Kalkestan	3	31	1.46	51.52	181.00
10	Baznavid	1	52	2.00	18.00	35.00
11	Koohpayeh	2	27	2.00	58.75	124.00
12	Shahreza	3	66	2.00	51.50	140.00
13	Noghab 2	3	68	2.00	2.33	66.04
14	Khoonik	3	45	3.00	2.20	67.20
15	Borzaderan 1	3	67	3.20	2.40	54.20
16	Nashtifan	4	85	3.00	3.02	48.50

Table 3. Continued

ادامه جدول ۳

شماره ژنوتیپ Genotype No.	ژنوتیپ Genotype	ژنوتیپ	دفعات گلدهی Flowering time	زاویه شاخه Branch angle	طول بلندترین خار Length of longest spines (cm)	طول شاخه یک ساله Length of one year branch (cm)	تعداد خار در شاخه Number of thorn at branch
17	Alghoor	الغور	3	44	2.00	0.40	47.40
18	Keshook 1	کشوک ۱	3	68	2.00	2.33	66.04
19	Ardestan	اردستان	3	35	1.90	35.00	61.50
20	Doroh 1	درح ۱	3	83	2.05	155.40	73.00
21	Manganehie	منگنه‌ای	3	58	2.30	138.60	79.00
22	Cheshmeh Aghsou	چشمه آغسو	3	52	1.72	88.00	68.00
23	Dahaneh Lariem	دهنه لاریم	3	53	2.83	140.70	87.08
24	Tejnood	تجنود	3	43	1.66	61.66	1.90
25	Dorokhsh	درخش	3	60	3.00	46.00	2.20
26	Giuk	گیوک	3	62	1.80	68.01	223.80
27	Anbarestan	عنبرستان ۱	3	85	1.88	65.00	147.37
28	Gazik	گزیک	3	65	1.91	81.87	171.00
29	Doostiran	دوستیران	3	58	1.45	79.80	40.00
30	Anbarestan	عنبرستان ۲	3	50	2.21	79.10	119.20
31	Kangan 2	کنگان ۲	3	66	1.76	73.30	187.66
32	Kangan 3	کنگان ۳	3	32	2.10	72.16	140.00



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۳۲ اکوتیپ عناب بر مبنای پنج صفت مورفولوژیک
 Fig. 1. Dendrogram from cluster analysis of 32 ecotypes of jujube based on five morphological traits

گزیك، گروه ۴- چشمه آغسو، عنبرستان ۱، گیوك و خوف، گروه ۵- دوستیران، اردستان، الیگودرز و بیاضیه و گروه ۶- مقام ساری، درح ۱، درح ۲، شهرضا، كشوك، تجنود، كنگان، كلکستان، درخش و كنگان ۱ و ۲.

نتایج این بررسی نشان داد که اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در سایر گروه‌ها حضور داشتند. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعات خاکدامن و همکاران (۲۰۶) که نسبت به جمع‌آوری پاجوش‌های عناب از پنج استان عناب خیز کشور اقدام کرده بودند، مشابهت داشت، به طوری که بعد از دو سال، پاجوش‌های جمع‌آوری شده در مطالعه مذکور بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیک، مورفولوژیک و فنوتیپی در سه گروه مستقل خراسانی، اصفهانی و مازندرانی قرار گرفتند که گروه خراسانی در سایر گروه‌ها حضور داشتند. به نظر می‌رسد که خراسان

بلندترین خار، زاویه شاخه، طول شاخه یک‌ساله، دفعات رشد سالیانه، تعداد خار در هر درخت را از میان اطلاعات مربوط به کلکسیون عناب استان قم انتخاب و با روش تجزیه خوشه‌ای مورد تفسیر قرار دادند. عبید و همکاران (Obeed *et al.*, 2008) صفات مورفولوژیکی درختان و چگونگی میوه‌دهی ارقام عناب را بررسی و تنوع زیادی از نظر ارتفاع درخت، قطر تنه، ریزش میوه و گسترش تاج را گزارش کردند. آن‌ها این صفات را قابل اطمینان‌ترین ویژگی برای طبقه‌بندی ارقام معرفی کردند. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس این صفات در این بررسی، اکوتیپ‌ها را در شش گروه مستقل به شرح ذیل قرار داد: گروه ۱- برزادران، قم، عنبرستان ۲ سبزوار، نوغاب، نوغاب ۱ و ۲، خونیک، آسفیچ، کوهپایه، گروه ۲- القور و خانقاه، گروه ۳- نهندان، جویبار و

خود به شرح ذیل قرار گرفتند:

الف) عناب‌های مناطق مرطوب و سرد با ویژگی‌های ظاهری زیر:

۱- تعداد خار در شاخه کمتر، دارای خارهای باریک‌تر و کوچک‌تر و برگ‌ها نیز با بریدگی کمتر

۲- شاخه‌ها کوچک‌تر و با تعداد کمتر، زاویه شاخه‌ها با تنه بازتر و فاصله بین گره‌ها در شاخه‌ها بیشتر

۳- ارتفاع درخت بلندتر و با تاج بازتر

۴- میوه دارای طعم تندتر و مزه گس مانند

ب) عناب‌های مناطق خشک و نیمه خشک با ویژگی‌های ظاهری زیر:

۱- تعداد خار در شاخه بیشتر، دارای خارهای ضخیم‌تر و بلندتر و برگ‌ها نیز با بریدگی بیشتر

۲- طول شاخه‌ها بیشتر و با تعداد زیادتر، زاویه شاخه‌ها با تنه بسته‌تر و فاصله بین گره‌ها در شاخه‌ها کمتر

۳- ارتفاع درخت کوتاه‌تر و با تاج بسته‌تر

۴- میوه با طعم و مزه شیرین

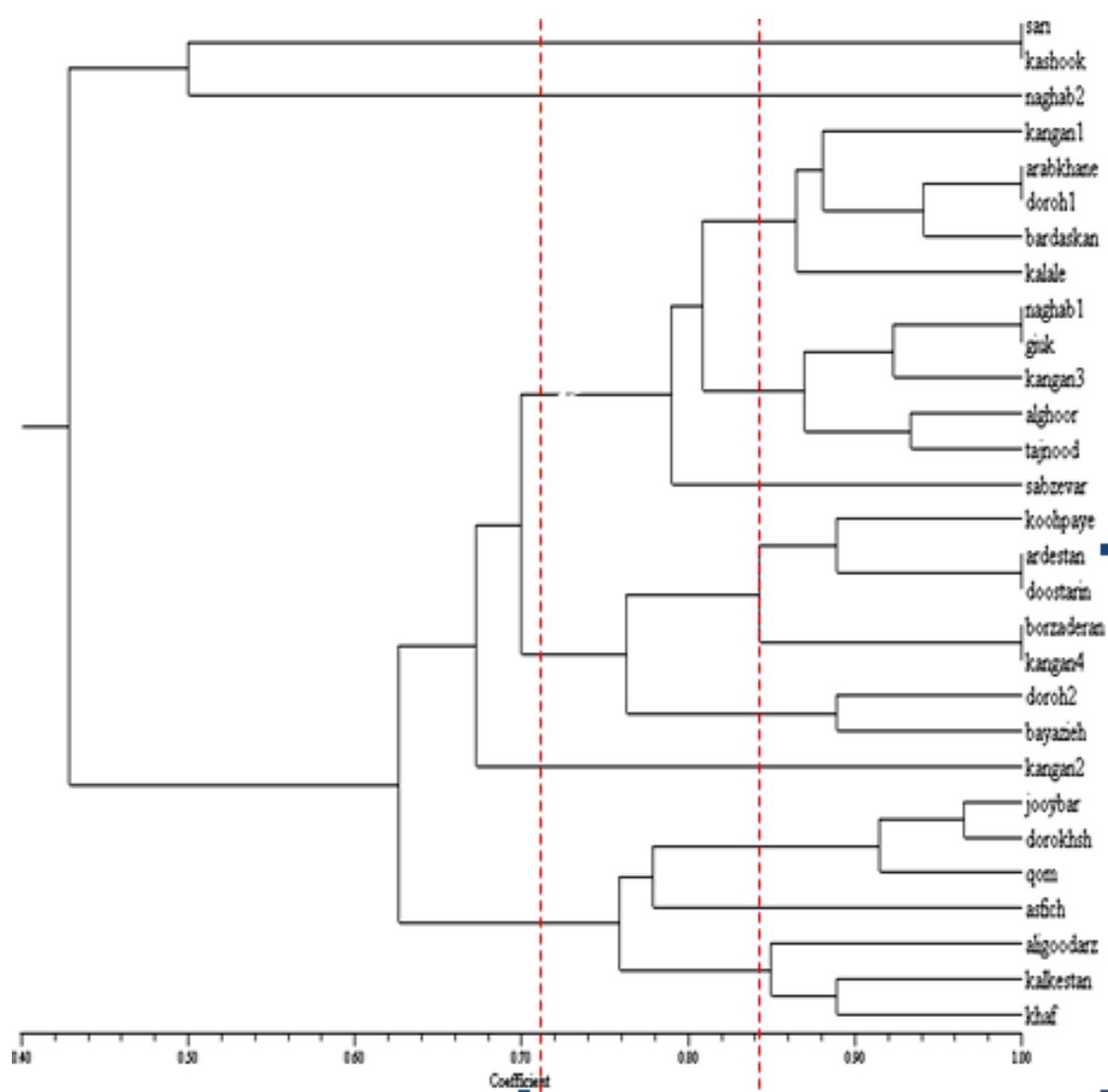
گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی

نتایج حاصل از گروه‌بندی بر اساس استفاده از نشانگرهای مولکولی نظیر ISSR که در شکل ۲ نشان داده شده ثابت کرد که دو گروه اکوتیپ‌های نوار شمالی کشور (استان‌های مازندران و گلستان) و نواحی مرکزی (استان‌های اصفهان و فارس) در فاصله بیشتری

جنوبی مرکز تنوع اصلی این گیاه دارویی در ایران است و چون از تنوع ارقام و فنوتیپ‌های فراوانی برخوردار است، می‌توان از این استان به عنوان مبدأ اصلی پراکنش عناب در ایران نام برد. همچنین به نظر می‌رسد دو گروه اکوتیپ‌های شمال ایران و اصفهان تنوع خود را از تنوع موجود در اکوتیپ‌های خراسان جنوبی دریافت کرده‌اند و توانسته‌اند به عنوان هسته‌های احتمالی تنوع در ایران مطرح شوند. از جمله نتایج قابل تامل در این بررسی قرار گرفتن اکوتیپ شهر فراه افغانستان در گروه اکوتیپ‌های خراسان جنوبی بود که این خود به وجود آورنده نظریاتی از جمله وجود یک کمربند از گونه جوجوبا (Jujuba) در باند نیمکره شمالی است که از چین در شرق شروع و تا غرب در ایران ادامه پیدا می‌کند. این ارقام با تغییرات اقلیمی به وجود آمده در طول زمان نبود یا محدود به نقاطی شدند که با شرایط رشدی آن‌ها تطابق بیشتری داشته است و تشابه اکوتیپ استان فراه افغانستان با اکوتیپ‌های خراسان جنوبی نیز می‌تواند مربوط به این موضوع باشد و یا این تشابه می‌تواند تقویت‌کننده این نظریه تاریخی باشد که عناب توسط جاده ابریشم از چین به مناطق غربی در ایران انتقال یافته است.

گروه‌بندی بر اساس صفات کمی

اکوتیپ‌های مورد بررسی از نظر صفات کمی در دو گروه با ویژگی‌های مخصوص به



شکل ۲- گروه‌بندی اکوتیپ‌های عناب بر اساس داده‌های مارکر مولکولی ISSR
 Fig. 2. Grouping of jujube ecotypes based of data from ISSR molecular markers analysis

اغلب در مطالعات جمعیتی استفاده می‌شود استفاده از نشانگرهای مولکولی نظیر ISSR و RAPD است که در این تحقیق نیز از آن استفاده شد. کیانی و نعمت‌زاده (Kiani and Nematzadeh, 2012) برای تعیین خلوص لاین‌های CMS برنج از نشانگرهای مولکولی استفاده کردند. در خصوص گونه

از اکوتیپ‌های خراسان جنوبی قرار گرفتند. به نظر می‌رسد این نواحی به همراه خراسان جنوبی را می‌توان به عنوان هسته‌های احتمالی تنوع عناب در ایران مطرح کرد. نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مارکرهای مولکولی RAPD نیز مشابه مارکرهای مولکولی SSR بود. از جمله روش‌هایی که

در ۵۰ ژنوتیپ Ber از گونه‌های *Z. nummularia*، *Z. mauritiana* و *Z. spina-christi* انجام داده و گزارش کردند که RAPD برای شناسایی ژنوتیپ و طراحی راهبردهای اصلاحی آینده بسیار مفید است. منگجون و جین (Mengjun and Jin, 2003) روابط ژنتیکی بین ۲۷ رقم و نژاد گونه‌های مرتبط با *Z. mauritiana* و *Z. acidujubba* از عناب‌های چینی را با استفاده از روش RAPD مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که تنوع بالایی در سطوحی مانند کاربوتایپ کروموزومی، شکل، اندازه و طول برگ و قطر گل وجود دارد. پنگ و همکاران (Peng et al., 2000) روابط ژنتیکی در ۶۴ رقم از عناب چینی را با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند. ارقام مورد بررسی در این مطالعه به هشت گروه تقسیم‌بندی شدند. نامبردگان رابطه ژنتیکی ۱۴ رقم عناب چینی (*Ziziphus jujuba*) و یک گونه وحشی را به وسیله RAPD بررسی کردند. بر اساس داده‌های RAPD، فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها محاسبه و یک دندروگرام با استفاده از روش UPGMA حاصل شد. نتایج نشان داد که فاصله ژنتیکی درون ارقام بیشتر از فاصله ژنتیکی بین آن‌ها بود، بنابراین باید یک طبقه‌بندی زیر گونه‌ای جدید از عناب چینی ایجاد شود.

در مطالعه‌ای دیگر توسط پینگ و همکاران (Ping et al., 2005) روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های *Ziziphus jujuba*

عناب هیچ کار مدونی در ایران تاکنون انجام نشده است. سینگ و همکاران (Singh et al., 2007) تنوع ژنتیکی در میان ۴۸ ژنوتیپ گنار (Ber) از مناطق مختلف جغرافیایی هند با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR را مورد مطالعه قرار دادند. این مطالعه برتری نشانگرهای ISSR نسبت به نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در گنار نشان داده شد. لی و همکاران (Li et al., 2009) با استفاده از روش ISSR تنوع ژنتیکی میان ۱۱۷ نمونه عناب 'Huizao' *Ziziphus jujuba* را که از نواحی مختلف جمع‌آوری شده بودند ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در نمونه‌ها وجود داشت و بنابراین پتانسیل اصلاحی این گونه زیاد است. در بررسی آن‌ها هیچ ارتباطی بین مناطق جغرافیایی و فاصله ژنتیکی دیده نشد. این نکته در تحقیق حاضر نیز صحت داشت به صورتی که علیرغم فاصله جغرافیایی موجود در مناطق کشت عناب در نواحی مختلف ایران، بین آن‌ها تفاوت ژنتیکی مشاهده نشد. فو و همکاران (Fu et al., 2007) به کمک نشانگرهای ISSR و RAPD روابط ژنتیکی ۲۲ توده از جنس *Ziziphus*، از جمله ۱۹ رقم Ber، دو رقم خرما چینی و یک رقم از Spin date را مطالعه کردند. با توجه به تجزیه خوشه‌ای، ۲۲ توده به سه گروه در سطح ۰/۸۴۵ قرابت ژنتیکی طبقه‌بندی شدند. دوانشی و همکاران (Devanshi et al., 2007) مطالعه روابط ژنتیکی را با استفاده از نشانگر RAPD

استفاده از نشانگرهای مولکولی برای مطالعات تاکسونومی تاکید کند. عبید و همکاران (Obeed *et al.*, 2008) در عربستان سعودی پنج رقم از Ber متعلق به گونه *Z. mauritiana* را با استفاده از نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که روش ISSR به طور منحصر به فردی توانست این پنج رقم را از هم تفکیک کند. همچنین مشخص شد که رقم Um-slaem از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با چهار رقم دیگر دارد و دو رقم پاکستانی و کومتری از نظر ژنتیکی مشابه‌اند. با توجه به دندروگرام تجزیه خوشه‌ای مربوط به نتایج نشانگرهای ISSR (شکل ۲) و حضور اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در تمامی گروه‌های تفکیک شده بر مبنای آغازگر و با توجه به این که خراسان جنوبی از دیرباز محل کشت عنب بوده است، به نظر می‌رسد این ناحیه می‌تواند به عنوان مبدأ احتمالی مقدم در پراکنش عنب در ایران مطرح باشد. مقایسه دندروگرام به دست آمده بر اساس آغازگرهای ISSR با تکرارهای دو و سه نوکلئوتیدی این نکته را مشخص کرد که نشانگر ISSR توزیع مناسبی را چه در نواحی گدکننده و چه در نواحی بین ژنی (غیر کدکننده) داشته است. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای مجدداً حضور اکوتیپ‌های خراسان جنوبی را در همه گروه‌ها نشان داده و مبین این نکته بود که تنوع قابل مشاهده در خراسان جنوبی تقریباً با تنوع حاکم بر کشور مطابقت می‌کند. به عبارت دیگر تنوع

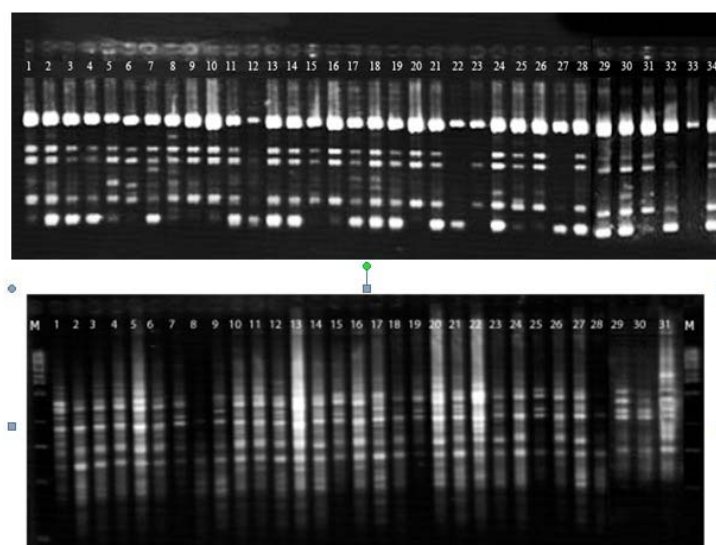
Ziziphus spinosa با استفاده از داده‌های RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این بررسی تفاوت‌های زیادی بین جمعیت‌های دو گونه *Z. spinosa* و *Z. jujuba* را نشان داد که می‌توانست این دو گونه را به خوبی از هم تفکیک کند. بای و همکاران (Bai *et al.*, 2009)، در مطالعات تنوع ژنتیکی میان ارقام عنب چینی با نشانگر RAPD، چند شکلی کمی را گزارش کردند. لی و همکاران (Li *et al.*, 2009) چند شکلی DNA ژنومی از ۱۴ گونه عنب چینی، ۱۱ رقم *Ziziphus jujuba* و یک برون‌گروه را به وسیله RAPD تجزیه و تحلیل کردند. بر اساس نتایج این تحقیق همه نمونه‌ها در شش گروه با شباهت ژنتیکی ۰/۲۶ دسته‌بندی شدند و پیشنهاد داد که *Z. jujuba* و *Z. acidojujuba* بایستی به عنوان یک گونه و *Z. xiangchengensis* و *Z. montana* نیز به عنوان یک گونه محسوب شوند. سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 2009) تنوع ژنتیکی میان ۴۷ ژنوتیپ از Ber متعلق به گونه زراعی از *Ziziphus mauritiana* و یک گونه وحشی از *Z. nummularia* را با استفاده از نشانگر ISSR بررسی کردند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA و تجزیه Bootstrap، تمام این ۴۸ ژنوتیپ را به چهار دسته مشخص تقسیم‌بندی کرد. این بررسی به طور موفقیت‌آمیزی ژنوتیپ‌هایی را که از نظر مورفولوژیکی مشابه بودند شناسایی و توانست بر

انجام واکنش PCR آزمایش شدند که ۶ آغازگر تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام داده و بین نمونه‌ها چندشکلی نشان دادند. جمعاً ۸۴ مکان ژنی امتیازبندی شدند که از این تعداد ۷۰ مکان (۸۳٪) چند شکلی نشان دادند. نتایج به دست آمده با الگوی بانندی نشانگر RAPD که توسط عباسی (Abbasi, 2010) گزارش شده است، مطابقت قابل توجهی نشان داد. در مطالعه حاضر شباهت ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۴۳ تا ۰/۹۲ متغیر بود که حکایت از وجود تنوع ژنتیکی مناسب جهت بهره‌گیری در پروژه‌های به‌نژادی آتی دارد. شکل ۳ نمونه‌ای از امکان سنجش تنوع ژنتیکی را در اکوتیپ‌های عناب با کمک نشانگرهای مولکولی در تحقیق حاضر نشان می‌دهد.

به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که نشانگرهای مولکولی ابزار مفیدی برای ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و ژنتیکی و شناسایی دقیق‌تر اکوتیپ‌های عناب هستند. با این نشانگرها می‌توان تنوع اکوتیپ‌ها و مطابقت آن‌ها با الگوهای جغرافیائی را به خوبی مشخص کرد. اطلاعات حاصل از مطالعات مولکولی می‌تواند مکملی برای اطلاعات به دست آمده از مطالعات مورفولوژیکی با روش‌های معمولی در باغ باشد. در این بررسی از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR استفاده شد. این نشانگرها توانستند به خوبی تنوع ژنتیکی موجود در اکوتیپ‌های عناب ایرانی را نشان دهند ولی برای مطالعه دقیق‌تر و کامل‌تر وضعیت

کل کشور در تنوع اکوتیپی خراسان جنوبی خلاصه شده است. دندروگرام شکل ۲ با نگاه دقیق به الگوی بانندی نشانگر ISSR با یکی از آغازگرهای مورد استفاده توانست دسته‌بندی قابل قبولی بر مبنای ۱۷ جایگاه بانندی که تعداد زیادی از آن‌ها پلی‌مورفیسم نشان دادند، ایجاد کند. این دندروگرام با دندروگرام حاصل از کار تحقیقاتی شایسته (Shayesteh, 2010) مطابقت زیادی داشت. این الگوی بانندی که تک تک، مبنای تهیه شناسنامه مولکولی برای اکوتیپ‌های عناب قرار گرفته است با توجه به تکرار نتیجه تکثیر DNA روی ۲۹ اکوتیپ به دست آمده است. اگر چه نمونه‌های جمع‌آوری شده از سراسر کشور مربوط به اقلیم‌های گوناگونی هستند ولی زمینه ژنتیکی و رد پای DNA نمونه‌های خراسان جنوبی در تمامی اکوتیپ‌ها یافت می‌شود. این امر باعث شده است که نتوان باندهای مشخصی از نشانگر را به اقلیم مشخصی منتسب کرد، اما الگوی بانندی منحصر به فردی که می‌تواند برای شناسایی اکوتیپ‌ها از جنبه کاربردی برخوردار باشد، به دست آمد. بر اساس دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای (کلاستر) برای الگوی بانندی مورد بررسی دوازده خوشه مختلف قابل تفکیک بود که حضور اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در تمامی خوشه‌ها قابل توجه است.

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ اکوتیپ عناب جمع‌آوری شده در این پژوهش از نشانگر ISSR استفاده شد. تعداد ۱۳ آغازگر در



شکل ۴- تصویری از چند شکلی در اکوتیپ‌های عناب ایران با کمک نشانگر RAPD (بالا) و نشانگر ISSR (پایین)

Fig. ۴. Image of polymorphism in Iranian jujube ecotypes induced by RAPD (up) and ISSR (down) markers

جمعیت‌ها و اکوتیپ‌های این گیاه و مقایسه
آن‌ها با هم لازم است این گونه مطالعات با
تعداد بیشتری اکوتیپ و تعداد نشانگرهای
بیشتری انجام شود.

References

- Abbasi, S. 2010.** Phylogenetic studies of genomic diversity based on DNA barcoding candidate gene-*matK* and RAPD molecular marker in Iranian Onnab ecotypes (*Ziziphus* spp.). MSc. Thesis, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (in Persian).
- Anonymous 2010.** Agricultural Statistics. South Khorasan Agricultural Organization, Birjand, Iran (in Persian).
- Bai, R. X., Peng, J. Y., Li, L., Zhang, Y., Han, B., and Zhang, L.S. 2009.** An improved protocol suitable for polymorphism studies in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Acta Horticulturae* 840: 97-106.
- Bal, J. S. 1992.** Identification of Ber (*Z. mauritiana*) cultivars through vegetative and

- fruit charactes. *Acta Horticulturae* 317: 245-253.
- Devanshi, A. K., Singh, A. K., Sharma, P., Singh, B., Singh, R., and Singh, N. K. 2007.** Molecular profiling and genetic relationship among ber (*Ziziphus* sp.) genotypes using RAPD markers. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 67(2): 121-127.
- Fu, J. X., Liu, C. M., and Xie, J. H. 2007.** Identification and classification of ber cultivars based on ISSR and RAPD analysis. *Acta Horticulturae* 764: 119-126.
- Ghouth, K. 2009. *Jujube*. Second edition. Saidimanesh Publications, Mashhad, Iran (in Persian).
- Ghouth, K. 2011.** Cultivation Techniques. available at : http://ziziphus-jujube.ir/en/?page_id=13
- Khakdaman, H., Poormaidani, A., and Adnani, M. 2006.** Assessment of genetic diversity in different ecotypes of jujube using cluster analysis. *Iranian Journal of Forests and Rangelands Plant Breeding and Genetic Research* 14 (4): 214-202 (in Persian).
- Khan, A. A., Awan, F. S., Sadia, B., Rana, R. M., and Khan, I.A. 2010.** Genetic diversity studies among colored cotton genotypes by using RAPD markers. *Pakistan Journal of Botany* 42(1): 71-77.
- Kiani, G., and Nematzadeh, G. 2012.** Moleclure purity assessment of rice CMS lines. *Seed and Plant Improvement Journal*. 28-1: 149-153 (in Persian).
- Li, J. D., Bi, H. T., Li, H. T., Li, Z. S., and Fenga, J. C. 2009.** Genetic analysis of *Ziziphus jujuba* 'Huizao' using ISSR markers. *Acta Horticulturae* 840: 135-142.
- Mengjun, L., and Jin, Z. 2003.** RAPD analysis on the cultivars, strains and related species of Chinese Jujube. *Acta Horticulturae* 622: 477-484.
- Obeed, R. S., Harhash, A. L., and Abdel-Mawgood, A. L. 2008.** Fruit properties and genetic diversity of five ber (*Ziziphus mauritiana* Lam) cultivars. *Pakistan Journal of Biological Science* 11: 888-893.
- Peng, J. Y., Shu, H. R., and Peng, S.Q. 2000.** A method for genomic DNA isolation of Chinese jujube and acid jujube. *Journal of Agricultural University of Hebei* 10: 46-49.
- Ping, L., Jianying, P., Shiqi, P., Junyi, Z., and Li, D. 2005.** Study on systematic relationships of *Ziziphus Jujuba* and *Ziziphus spinosa* using RAPD technique.

Scientia Silvae Sinicae 41(2): 182-185.

- Shayesteh, H. 2010.** Evaluation of genetic diversity in collection of Iranian jujube ecotypes (*Ziziphus* spp.) using ISSR-molecular marker. MSc. Thesis, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (in Persian).
- Singh, A. K., Devanshi, L., Sharma, P., Singh, R., Singh, B., Koundal, K. R., and Singh, N. K. 2007.** Assessment of genetic diversity in *Ziziphus mauritiana* using inter-simple sequence repeat markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 16: 35-40.
- Singh, A. K., Singh, R., and Singh, N. K. 2009.** Comparative evaluation of genetic relationships among ber (*Ziziphus* spp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 69(1): 50-57.
- Zargarie, A. 1993.** Medicinal Plants. First Volume. University of Tehran Publications, Tehran, Iran (in Persian).
- Zeng, J., Zou, Y. P., Bai, J. Y., and Zheng, H. S. 2002.** Preparation of total DNA from recalcitrant plant taxa. Acta Botanica Sinica 44: 694-697.

