

## بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.) کلکسیون مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان جنوبی با استفاده از نشانگرهای RAPD و SSR

سعید دقیقی<sup>۱\*</sup>، زهره علیزاده<sup>۱</sup> و هما حبیبی<sup>۲</sup>

۱ و ۲. استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۴)

### چکیده

عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.) با کشت طولانی مدت در ایران، دارای ارزش و اهمیت دارویی و اقتصادی می‌باشد. اطلاع از تنوع ژنتیکی جهت مدیریت مؤثر و کارآمد منابع ژنتیکی، شناسایی گونه‌ها و روابط ژنتیکی بین آنها مفید خواهد بود. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۵ درخت عناب کلکسیون مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان جنوبی، از ۱۶ آغازگر RAPD و ۲۲ جفت آغازگر SSR استفاده شد. هر دو نشانگر چندشکلی بالایی نشان دادند. قدرت تمایز نشانگرها با درصد چندشکلی، شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، قدرت تفکیک (RP)، شاخص نشانگر (MI) و شاخص مؤثر چندگانه (EMR) مقایسه شد. آغازگرهای RAPD، ۱۰۸ و در مقابل آغازگرهای SSR، ۱۱۸ باند چندشکل تکثیر کردند. مقدار متوسط PIC، EMR و MI در نشانگر SSR (به ترتیب ۰/۴۷، ۵/۳۶ و ۲/۵۸) نسبت به نشانگر RAPD (به ترتیب ۰/۱۹، ۳/۵۵ و ۰/۷۶) بیشتر بود. به‌رحال نشانگر RAPD مقدار RP بیشتری (۹/۹۲) نسبت به SSR (۲/۱۰) نشان داد. گروه‌بندی نمونه‌ها براساس دندروگرام ترسیم شده به‌روش UPGMA نشان داد که پاجوش‌های حاصل از یک ژنوتیپ از هم تفکیک شدند که نشان از وقوع جهش سوماتیکی در بین آنها بود. دندروگرام حاصل از ترکیب داده‌های RAPD و SSR، اکثر پاجوش‌ها از ژنوتیپ‌های یکسان را در خوشه‌های یکسانی قرار داد.

واژه‌های کلیدی: الیگونوکلئوتید، پاجوش، جهش سوماتیکی، ریزماهوره، ژرم پلاسما.

## Evaluation of genetic diversity in south Khorasan province Agricultural and Natural Resources Research and Education Center Collection jujube genotypes (*Ziziphus jujuba* Mill.) using SSR and RAPD markers

Saeid Daghighi<sup>1\*</sup>, Zohreh Alizadeh<sup>1</sup> and Homa Habibi<sup>2</sup>

1, 2. Assistant Professor and M. Sc. Student, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran  
(Received: Dec. 22, 2018 - Accepted: Feb. 13, 2019)

### ABSTRACT

Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) is cultivated for a long time in Iran, which has medicinal and economic value. In order to effective management of genetic sources, identifying species and determination on the genetic relationships between them, knowledge of genetic diversity will be helpful. To evaluate genetic diversity of 25 trees collected from South Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center Collection, 16 RAPD and 22 SSR primers were used. Both the markers showed highly polymorphic. Distinctive power of two markers were compared using percent of polymorphism, polymorphic information content (PIC), resolving power (RP), marker index (MI) and effective multiplex ratio (EMR). RAPDs produced 108 polymorphic bands, while SSRs amplified 118 polymorphic bands. SSRs showed higher PIC, EMR and MI (0.47, 5.36, 2.58, respectively) than RAPDs (0.19, 3.55, 0.76, respectively). However, RP of RAPDs (9.92) higher than to SSRs (2.10). The dendrogram drawn with UPGMA cluster analysis showed that root-suckers of the same rootstock were separated from each other, which is indicative of the occurrence of somatic mutation among them. Dendrogram derived from the combination of SSR and RAPD datas, divided most of root-suckers from the same rootstock into same clusters.

**Keywords:** Germplasm, microsatellite, oligonucleotide, root-sucker, somatic mutation.

\* Corresponding author E-mail: sdaghighi@birjand.ac.ir

### مقدمه

عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.) یکی از مهمترین جنس‌های شناخته‌شده تیره Rhamnaceae است که از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی اهمیت دارد (Zhao *et al.*, 2014). میوه آن در آسیا به دلیل طعم خوب آن، ارزش غذایی بالا و مقدار بالای قند و ویتامین C معروف است (Chen *et al.*, 2013). عناب سازگاری بالایی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف، بخصوص تنش شوری و خشکی دارد (Liu *et al.*, 2017). به همین دلیل گیاهی ایده‌آل برای کشت سودآور در مناطق خشک و نیمه‌خشک، که درختان میوه رایج به‌خوبی رشد نمی‌کنند، به حساب می‌آید (Liu *et al.*, 2014). عناب از طریق جاده ابریشم به ایران منتقل شده و در مناطق خشک و شور ایران کشت شده است (Daghighi, 1999). سطح زیرکشت عناب در ایران در سال ۹۶ در مجموع ۳۴۳۵/۲ هکتار گزارش شده و تولید سالانه آن برابر با ۵۶۰۵ تن بوده است. تولید این محصول در استان‌های ایلام، فارس، اصفهان، آذربایجان شرقی، لرستان، خراسان رضوی، سیستان و بلوچستان و خراسان جنوبی وجود دارد که میزان تولید این محصول به تفکیک استان‌های ذکرشده در سال ۱۳۹۶ به‌ترتیب برابر با ۰/۴، ۳، ۱۵، ۱۵، ۲۷، ۳۵/۹، ۷۰ و ۵۴۳۸/۷ تن برآورد شده است. بیشترین سطح کشت و بالاترین میزان تولید عناب متعلق به استان خراسان جنوبی به‌ترتیب با میزان ۳۲۱۸/۴ هکتار و ۵۴۳۸/۷ تن می‌باشد (Ministry of Agriculture Jihad, 2017).

تنوع ژنتیکی پایه و اساس بقاء گیاهان و بهبود محصولات است (Bhandari *et al.*, 2017). وجود تنوع در منابع ژنتیکی گیاهان فرصتی را برای اصلاح‌گران گیاه فراهم می‌کند که رقم‌های جدید بهبود یافته‌ای را با صفاتی که هم مطلوب کشاورزان است و هم اصلاح‌گران، توسعه دهند (Govidaraj *et al.*, 2014). مطالعه جامع تنوع ژنتیکی مولکولی در ژرم‌پلاسم گیاهی جهت تشخیص اینکه آیا طبقه‌بندی تاکسون‌ها بر اساس صفات مورفولوژیکی، الگوی تمایز ژنومی را نشان می‌دهد یا خیر، مفید خواهد بود. برنامه اصلاحی کارآمد نیاز ضروری به اطلاع از مقدار و ماهیت تنوع

ژنتیکی یک محصول دارد (Govidaraj *et al.*, 2014). آنالیز تنوع می‌تواند با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام شود (Bhandari *et al.*, 2017). استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA روش مطمئن‌تری است زیرا مقدار DNA به شرایط محیطی، اندام و مراحل رشدی خاص وابسته نیست (Ainsworth *et al.*, 1996) و ابزار قدرتمندی را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی در گیاهان ارائه می‌دهند. چندین نشانگر مولکولی از جمله ISSR (Li *et al.*, 2008)، SRAP و AFLP (Bai, 2008) جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت عناب استفاده شده است.

SSRها (توالی‌های تکراری ساده) یا ریزماهورها، با واحدهای تکراری ۶-۱۰ bp، به‌عنوان نشانگر برتر در بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از درختان میوه از جمله عناب در نظر گرفته شده‌است (Grkava-Gustavsson *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). SSRها به‌دلیل ویژگی‌هایشان از جمله تکرارپذیری بالا، توانایی برای شناسایی سطح بالایی از چندشکلی، توارث هم‌بارز و توزیع گسترده در سراسر ژنوم، در آنالیز ژنتیکی، اصلاح به‌کمک نشانگر، نقشه‌یابی ژنتیکی و شناسایی تنوع بسیار مفید هستند (Wang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). اخیراً با در دسترس قرار گرفتن توالی ژنوم عناب (Liu *et al.*, 2014)، پیشرفت‌هایی در زمینه شناسایی و توسعه آغازگرهای SSR، عناب صورت گرفته است و از آنها جهت بازسازی روابط فیلوژنتیکی در میان ارقام و ارزیابی تنوع و ساختار جمعیت عناب استفاده شده است. Ma *et al.* (2011) توانستند با رویکرد SAM<sup>۱</sup>، ۲۵ جفت آغازگر SSR برای عناب و گونه‌های مرتبط توسعه دادند و از ۱۶ جفت آغازگر جهت شناسایی چندشکلی در ۲۴ رقم عناب چینی، ۲ رقم عناب وحشی و ۲ رقم عناب هندی استفاده کردند. بر اساس آنالیز کلاستر، رقم‌ها مطابق با انتظار در سه گروه عناب چینی، هندی و وحشی قرار گرفتند. همچنین Wang *et al.* (2014) نیز توانستند تعداد زیادی جفت آغازگر SSR را برای عناب چینی توسعه دهند

به‌روش تجزیه خوشه‌ای و الگوریتم UPGMA آنها را به دو گروه اصلی در ضریب تشابه ۰/۸۲ تفکیک کرد. Diao *et al.* (2014) ۱۱ رقم عنب را با ۱۲ آغازگر RAPD به‌منظور بررسی روابط ژنتیکی آنها، مورد ارزیابی قرار دادند. هفتاد باند تکثیر شد که ۵۷ باند چندشکلی (۸۱/۴ درصد) نشان دادند. Peng *et al.* (2000) تنوع ژنتیکی ۶۴ رقم عنب را توسط ۴۰ آغازگر RAPD ارزیابی کردند. نتایج نشان داد ۴۹۲ باند تکثیر شد که ۲۹۳ باند (۵۹/۵۵ درصد) چندشکل بودند و تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها را در ۸ گروه تقسیم کرد. با توجه به اینکه عنب عمدتاً از طریق پاجوش تکثیر می‌شود، در این بررسی ما به دنبال مطالعه ژنوتیپ‌های مختلف عنب و یافتن نشانگرهایی هستیم که با کمک آنها بتوان آلل‌های اختصاصی برای درختان عنب کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بیرجند شناسایی کرد، تا بتوان از این طریق، اطلاعاتی از انتقال درختان عنب در مناطق مختلف این استان و همچنین ایران و تنوع ژنتیکی آنها به‌دست آورد.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۵ درخت عنب که در مجموع شامل ۸ ژنوتیپ می‌شوند و از مناطق مختلف استان خراسان جنوبی جمع‌آوری شده و در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان جنوبی کشت شده‌اند، مورد تحقیق و بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). جهت استخراج DNA، برگ‌های جوان و به رنگ سبز روشن پس از جمع‌آوری در پاکت‌های پلاستیکی با درج مشخصات به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی بیرجند منتقل شدند. پس از تمیز کردن سطح برگ، حدود ۰/۲ گرم از هر نمونه وزن شدند، توسط نیتروژن مایع پودر شدند و تا زمان استخراج DNA در  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. استخراج DNA به‌روش CTAB با کمی تغییرات انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده به‌ترتیب با دو روش نانودراپ و الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت DNAهای به‌دست‌آمده به  $50\text{ ng}/\mu\text{l}$  رقیق شدند و از این غلظت برای انجام واکنش PCR، استفاده شد. جهت انجام واکنش PCR از ۱۶ جفت آغازگر

همچنین از ۳۱ جفت آغازگر برای بررسی تنوع بین ۷۶ رقم عنب استفاده کردند. رقم‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای در سه گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. Fu *et al.* (2016) نیز توانستند فراوانی SSR را در ژنوم عنب بررسی کنند و میزان توزیع آن را با ژنوم گیاه مدل آرآیدوپسیس مقایسه کنند. آنها بیان کردند تراکم SSR در ژنوم عنب به مراتب بیشتر از ژنوم آرآیدوپسیس بود و موفق شدند ۷۰ جفت آغازگر SSR عنب توسعه دهند. آنها از ۲۰ جفت آغازگر به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین سه جمعیت عنب استفاده کردند. Zhang *et al.* (2015) با استفاده از ۲۴ جفت آغازگر SSR، ۴۵ الحاق رقم Jinsixiaozao را به جهت بررسی تنوع و روابط فیلوژنتیکی مورد ارزیابی دادند. شش آغازگر چندشکلی نشان داد و تجزیه خوشه‌ای براساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، الحاقات در ۸ گروه قرار گرفتند. Xu *et al.* (2016) ۲۴ جفت آغازگر SSR برای ارزیابی ۹۶۲ الحاق عنب از ۲ تا از بزرگترین ژرم‌پلاسماها، با هدف ژنوتیپ‌یابی به کمک آنالیز تنوع ژنتیکی و ساختار آنها و ساختن یک کلکسیون هسته که تنوع ژنتیکی را حفظ کند، به کار بردند.

نشانگر RAPD روشی سریع و راحت برای تشخیص چندشکلی، براساس قطعات تصادفی DNA با استفاده از آغازگرهای انفرادی از توالی‌های اختیاری نوکلئوتیدی است (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). RAPD نشانگر غیراختصاصی و غالب بوده و توانایی ردیابی تفاوت تک نوکلئوتیدی در میان ژنوم را دارد و می‌تواند در جهت تفکیک گونه‌های یک جنس براساس شباهت ژنومی و قرابت جغرافیایی با موفقیت استفاده شود (Sherry *et al.*, 2011). تحقیقات متعددی نیز با استفاده از نشانگر RAPD جهت بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف عنب و روابط بین آنها انجام شده است. Abbasi *et al.* (2011) بررسی تنوع ژنتیکی ۳۴ ژنوتیپ عنب از هشت استان عنب‌خیز ایران را با ۱۵ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار دادند، که ۶ آغازگر دارای چندشکلی مطلوب بود و در مجموع ۶۵ جایگاه تکثیر کردند. در بین این تعداد ۴۹ جایگاه (۷۵ درصد) چند شکلی نشان دادند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها

دقیقه انجام شد. تفکیک باندهای تکثیرشده توسط آغازگرهای SSR با ژل اکریل‌آمید ۱۰ درصد انجام شد. سه میکرولیتر از محصول PCR استفاده شد و به مدت دو ساعت با ولتاژ ۲۰۰، الکتروفورز شدند. جهت رؤیت نوارهای تکثیرشده، از روش رنگ‌آمیزی سریع نیترات نقره استفاده شد و سپس از ژل اسکن رنگی گرفته شد.

براساس عکس‌های به دست آمده، در قطعات تکثیرشده توسط آغازگرهای SSR، امتیازدهی براساس سبک‌ترین باند به عنوان اولین آلل، با حرف A و با افزایش اندازه باندها از حروف دیگر استفاده شد. در آنالیز نشانگر RAPD نیز باندها بر اساس حضور و عدم حضور باند به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. شاخص محتوی اطلاعات چندشکل (PIC) طبق فرمول  $PIC = 1 - \sum p_i^2$  محاسبه شد که در آن، pi فراوانی آلل نام است. درصد چند شکلی بر حسب تعداد باندهای چندشکل تقسیم بر کل باندها ضریب صد محاسبه گردید. شاخص موثر چندگانه (EMR) از طریق ضرب تعداد نوارهای چندشکل در درصد چندشکلی محاسبه شد. شاخص نشانگری (MI)، بر حسب فرمول  $MI = PIC \times EMR$  محاسبه گردید. قدرت تفکیک (RP) از جمع مقادیر Ib به دست می‌آید. Ib از فرمول  $Ib = 1 - [2(0.5 - pi)]$  (pi فراوانی آلل نام). آزمون مانتل با ضریب همبستگی پیرسون با نرم افزار xstat.2016، تعداد آلل اختصاصی با نرم افزار GENALEX نسخه ۶، و آنالیز خوشه‌ای نمونه‌ها توسط نرم افزار NTSYS نسخه ۲/۰۲e و براساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد.

RAPD (جدول ۲)، تهیه شده از شرکت سیناکلون، استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۰/۵ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، ۰/۶ میکرولیتر آغازگر (۱۰ μM)، ۷/۵ میکرولیتر Super PCR Master Mix 2x (یکتا تجهیز گستر) و ۶/۴ میکرولیتر آب استریل انجام گرفت. چرخه حرارتی واکنش شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه انجام شد. سپس ۴۵ چرخه در دماهای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۳۵°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه انجام شد و در نهایت جهت بسط نهایی DNA دمای ۷۲°C به مدت ۶ دقیقه در نظر گرفته شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد با رنگ آمیزی اتیدوم بروماید (۰/۱ mg/ml) در ولتاژ ۸۵ به مدت یک ساعت بارگذاری شد. در نهایت ژل‌ها پس از بارگذاری کامل توسط ژل‌داک (Cleaver Scientific Ltd)، زیر نور فرابنفش مشاهده و عکسبرداری شدند.

جهت انجام واکنش PCR از ۲۴ جفت آغازگر SSR (جدول ۳)، تهیه شده از شرکت سیناکلون، استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۰/۵ میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر (۱ μM)، ۷/۵ میکرولیتر Super PCR Master Mix 2x (یکتا تجهیز گستر) و ۳ میکرولیتر آب استریل انجام گرفت. چرخه دمایی آن شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از آن ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال بسته به آغازگر بین ۵۰°C-۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C نیز به مدت ۴۵ ثانیه بود. بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ده

جدول ۱. مشخصات درختان عناب  
Table 1. Characteristic of jujube trees

Tree	Group	Tree Origin	No.	Tree	Group	Tree Origin	No.
E1-Hardeng	E	Hardeng Khosf	13	A1-Giok	A	Giok sofla	1
E2-Hardeng		Hardeng Khosf	14	A2-Giok		Giok sofla	2
E3-Hardeng		Hardeng Khosf	15	B1-Kangan	B	Kangan sarbisheh	3
F1-Hardeng	Hardeng Khosf	16	B2-Kangan	Kangan Sarbisheh		4	
F2-Hardeng	F	Hardeng Khosf	17	B3-Kangan		Kangan Sarbisheh	5
F3-Hardeng		Hardeng Khosf	18	C1-Hardeng	Hardeng Khosf	6	
F4-Hardeng	G	Hardeng Khosf	19	C2-Hardeng	C	Hardeng Khosf	7
G1-Hardeng		Hardeng Khosf	20	C3-Hardeng		Hardeng Khosf	8
G2-Hardeng		Hardeng Khosf	21	D1-Giok	D	Giok sofla	9
G3-Hardeng	Hardeng Khosf	22	D2-Giok	Giok sofla		10	
G4-Hardeng	Hardeng Khosf	23	D3-Giok	Giok sofla		11	
H1-Siojan	H	Siojan Khosf	24	D4-Giok		Giok sofla	12
H2-Siojan		Siojan Khosf	25				

جدول ۲. مشخصات نشانگرهای RAPD مورد استفاده

Table 2. Characteristic of RAPD used primers

GC (%)	Sequence (5'-3')	Primer	GC (%)	Sequence (5'-3')	Primer
70	5'-GTGGCCGATG-3'	OPAC07	70	5'-TGCCGAGCTG-3'	OPA02
60	5'-ACGGAAGTGG-3'	OPAC20	60	5'-AGTCAGCCAC-3'	OPA03
60	5'-GTTGCGATCC-3'	OPAB02	60	5'-AGGGGTCTTG-3'	OPA05
70	5'-GGGCGACTAC-3'	OPAB09	70	5'-GGTCCCTGAC-3'	OPA06
60	5'-TCGCATCCAG-3'	OPAB17	60	5'-GTGACGTAGG-3'	OPA08
70	5'-CTGGCGTGTC-3'	OPAB18	70	5'-GGGTAACGCC-3'	OPA09
60	5'-TGAGTGGGTG-3'	OPC18	60	5'-GTGATCGCAG-3'	OPA10
70	5'-GTTGCCAGCC-3'	OPC19	70	5'-ACGGGACCTG-3'	OPAC04

جدول ۳. مشخصات آغازگرهای SSR

Table 3. Characteristic of SSR used primers

Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Size (bp)	Ta (°C)	Refrence
BFU0277	F:GCACTACCCTGTGGAAC TCAA R: AGTGTGACCTGGCAAGAAGA	(GA)11	232-270	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0286	F:GATTGTTGCTGGTTCCATGT R: CTGGACTCTCCGATGCAGTAG	(AG)10	248	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0308	F:TTTCCACCCCAAAAATACCAA R: AGACGCTGGATGAGGATGAT	(TC)11	157-172	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0363	F:ACACCAGATCCTGGGTTC AA R: AGCCTTCCAAGCAATCTGAG	(AT)11	-	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0377	F:CCAGCTGGTATCCAATTGCT R: ACGACGATGCCATGAAAAGAT	(CT)10	300-363	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0435	F:TTAGGATGAGCCAGGGCATA R: GAGATGGTGAGCCAATTCGT	(AGA)6	191-200	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0467	F:CCGGACCGAGTGGAGTTATTA R:AGAATATGGCATCAACCTATACCA	(TC)9	224-278	59	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0478	F:AACGCTGAAGATTTCTCTCTC R: CCTGAATTCCAACCAAAACAG	(TC)9	191	59.5	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0479	F:GAAAACCATTTGTTGGAGACCA R: TGAACCAAGCAACAAAATCA	(TC)9	220-236	59.5	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0539	F:CCGGAAACGTTTAAAATGACA R: GGAGGAAGAAGGATCCAAGG	(TC)8	210	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0564	F:CTTTTCAAGCACCGCTTTTT R: GACTATTGGCAACCTCCAA	(TC)7	-	59.5	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0574	F:GAAGGTTGAAGATGCTCTCTCTC R: CCTGACATCCATTTGAAGGAA	(CA)7	100-160	59	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0581	F:TGAGAAGGTTGAAGATGCTCTC R: CCTGACATCCATTTGAAGGAA	(CA)7	108-151	59	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0586	F:CGAACTTGAGAGCTTGGAG R: TTGAGCTCTGCAACGAAATG	(TC)7	250	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0733	F:TCCTTTTGCCGAGAATATGAA R: GTGAAGCCCCTAATTGTGTCA	(CT)9	280	59	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU0753	F:ATTTGAAAATTACCATCCATCGA R:CTCAACCCATATTATCAATCTCCA	(TG)7(TA)10	335	58	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU1178	F:CCTTGGTGGATTTTGGTTTG R: TATACTTTGGCAGCGGTGTG	(TG)9	280	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU1205	F:TGTGCTGGTTCAATTCCAG R: CTTATGGCTTTTTTCATTTTGTGA	(CA)8	166-172	59	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU1279	F:TTTTTCAAGACCTCCACGATG R: TCCCACCACTTTCTCTCAT	(TTAA)4	184	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU1409	F:CAAATGATGGATCGAGCAAAA R: AATGGAGGACAAACCGTCAC	(CA)6	167	59	Wang <i>et al.</i> , 2014
BFU1479	F:ATTTAATAGCCACGAGGTTGATG R: AGTTTTGGCAATGAATGTGGC	(TCTCTT)4(TC)8	232	60	Wang <i>et al.</i> , 2014
JUJU23	F:CCATCCGACCACTGAAAAT R: CGATAAAGCACCAGCAAAA	(AG)29	110-155	53	Fu <i>et al.</i> ,2016
JUJU18	F:GATGTACGGGAAAGACGG R: ATCACTCTGGTTGCTTG	(CT)52	348	53	Fu <i>et al.</i> ,2016
JUJU57	F:ATTTATTCCTTATTGCTAGTAG R: CAACCTTCTGTAGTTATTTT	(CA)27	200	55	Fu <i>et al.</i> ,2016

DNAهای استخراج شده بین ۵۸۸ تا ۱۹۹۱ نانوگرم

بر میکرولیتر برآورد شد و تمام نمونه‌ها تا غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق شدند.

## نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی ۲۵ درخت عناب توسط ۱۶ آغازگر RAPD و ۲۴ جفت آغازگر SSR بررسی شد. غلظت

از نشانگر RAPD جهت بررسی تنوع ژنتیکی در میان رقم‌های عناب استفاده کردند، بیشتر بود. Zhang *et al.* (2014) نیز درصد چندشکلی حاصل از ۹ جفت آغازگر SSR را در میان اکثر جمعیت‌های عناب وحشی ۱۰۰ درصد گزارش کردند.

شاخص محتوی اطلاعات چندشکلی معیاری برای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها است و بالا بودن مقدار PIC در یک مکان ژنی، بیانگر وجود آلل نادر در آن مکان ژنی می‌باشد و می‌توان از آن برای تمایز موثر ژنوتیپ‌ها استفاده کرد، که این شاخص برای همه آغازگرها محاسبه شد. مقدار میانگین PIC در نشانگر SSR، ۰/۴۷ و در RAPD ۰/۱۹ بود. متوسط شاخص PIC در نشانگر SSR، در این بررسی کمتر از دیگر بررسی‌های انجام‌شده در عناب بود. متوسط مقدار PIC در نشانگر RAPD از متوسط آن در بررسی Devaneshi *et al.* (2007) و Singh *et al.* (2009) کمتر بود.

دامنه مقدار PIC در بین آغازگرهای SSR از ۰/۵ تا ۰/۳۹ (BFU0586, BFU0478, BFU0539 و BFU0581) بود (جدول ۵) و در RAPD بین ۰/۳۶ (OPA09) و ۰/۰۶ (OPAB09) بود (جدول ۴). به‌طور مشابه Ahmed *et al.* (2012)، مشاهده کردند مقدار متوسط شاخص PIC، در نشانگر SSR (۰/۳۹) در مقایسه با نشانگر RAPD (۰/۲۵) در گردو بیشتر بود. بر این اساس در این مطالعه نشانگر SSR در نشان دادن باندهای دارای اطلاعات مفید بیشتر، نسبت به نشانگر RAPD، دارای برتری بود.

#### بررسی چندشکلی و مقادیر PIC، MI، EMR و RP

همه ۱۶ آغازگر RAPD و ۲۲ جفت از ۲۴ جفت آغازگر SSR به‌ترتیب توانستند ۱۰۸ و ۱۱۸ باند تکثیر کنند. همه باندهای SSR دارای چندشکلی بودند (۱۰۰ درصد)، درحالی‌که ۷۳ باند RAPD (۶۷/۵۹ درصد) چندشکلی نشان دادند. تعداد متوسط باندهای چندشکل به ازای هر آغازگر ۶/۷۵ و ۵/۳۶ باند به‌ترتیب برای RAPD و SSR بود. دامنه باندهای چندشکل در SSR ها بین ۲ (JUJU18, JUJU57) تا ۱۲ باند (BFU1409) و در میان RAPD ها بین ۲ (OPA03, OPA06 و OPAB09) تا ۱۰ باند (OPAB17) بود. میزان چندشکلی بر اساس نشانگر RAPD در این بررسی از درصد چندشکلی گزارش‌شده توسط Liu *et al.* (2009) (۹۹/۷۸ درصد)، که از ۳۱ آغازگر RAPD برای بررسی روابط ژنتیکی بین ۱۴ گونه از جنس *Ziziphus* و رقم *Paliurus spina-christi* و *Z.jujuba* Mill. به‌عنوان outgroup استفاده کردند، کمتر بود. همین‌طور درصد چندشکلی گزارش‌شده توسط Abbasi *et al.* (2011) (۷۵ درصد) بیشتر از درصد چندشکلی به‌دست آمده در این مطالعه بود. این امر می‌تواند به علت حضور گونه‌های مختلفی از جنس *Ziziphus* باشد، همچنین تعداد نمونه‌ها و آغازگرهای استفاده‌شده در این دو بررسی بیشتر از مطالعه حاضر بود. با این حال درصد چندشکلی RAPD در مطالعه حاضر از میزان چندشکلی مطالعات Liu *et al.* (2005)، Peng *et al.* (2002)، Peng *et al.* (2000) که

جدول ۴. درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات ۱۶ آغازگر RAPD

Table 4. Polymorphism percentage and content information of 16 RAPD primers

Primer	Number of total bands	Number of polymorphic bands	Percent polymorphism	PIC	EMR	MI	RP
OPA02	7	5	% 71.34	0.16	3.57	0.57	12.24
OPA03	8	2	% 25	0.08	0.50	0.04	14.48
OPA05	10	8	% 80	0.18	6.40	1.13	9
OPA06	3	2	% 66.67	0.23	1.33	0.31	3.68
OPA08	5	4	% 80	0.28	3.2	0.90	2.22
OPA09	7	7	% 100	0.36	7	2.52	9.26
OPA10	4	3	% 75	0.19	2.25	0.43	5.52
OPAC04	6	6	% 100	0.18	6	1.06	10.72
OPAC07	6	3	% 50	0.13	1.5	0.19	8.80
OPAC20	9	7	% 77.78	0.23	5.45	1.24	12.72
OPAB02	4	4	% 100	0.14	4	0.55	7.36
OPAB09	9	2	% 22.22	0.06	0.44	0.03	16.72
OPAB17	10	10	% 100	0.23	10	2.30	13.60
OPAB18	5	3	% 60	0.23	1.80	0.41	8.08
OPC18	8	3	% 37.50	0.17	1.13	0.19	13.58
OPC19	7	4	% 57.14	0.13	2.29	0.29	10.88
Mean	6.75	4.56	% 67.59	0.19	3.55	0.76	9.92

جدول ۵. درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات ۲۲ آغازگر SSR

Table 5. Polymorphism percentage and content information of 22 SSR primers

Locus	Number of total bands	Number of polymorphic bands	Percent polymorphism	PIC	EMR	MI	RP
BFU0479	7	7	%100	0.47	7	3.29	1.92
BFU0478	7	7	%100	0.50	7	3.50	2
BFU1479	6	6	%100	0.48	6	2.88	1.68
BFU1409	12	12	%100	0.40	12	4.80	1.12
BFU0586	4	4	%100	0.50	4	2	1.92
BFU0753	6	6	%100	0.50	6	3	2
BFU0286	7	7	%100	0.47	7	3.29	1.52
BFU0539	3	3	%100	0.50	3	1.50	2.08
BFU01178	5	5	%100	0.46	5	2.30	2.56
BFU1279	4	4	%100	0.48	4	1.92	2.40
BFU1205	7	7	%100	0.49	7	3.43	2.76
BFU0733	9	9	%100	0.49	9	4.41	1.68
BFU0377	4	4	%100	0.47	4	1.88	2.48
BFU0467	5	5	%100	0.49	5	2.45	2.16
BFU0574	4	4	%100	0.41	4	1.64	2.64
BFU0435	5	5	%100	0.45	5	2.25	2.48
BFU0277	4	4	%100	0.44	4	1.76	2.72
BFU0308	6	6	%100	0.49	6	2.94	1.76
BFU0581	4	4	%100	0.39	4	1.56	1.68
JUJU57	2	2	%100	0.49	2	2.49	2.24
JUJU18	2	2	%100	0.48	2	0.96	2.40
JUJU23	5	5	%100	0.49	5	2.45	2.08
Mean	5.36	5.36	%100	0.47	5.36	2.58	2.10

مجموعه C، منحصر به فرد شناخته شد. همچنین این مکان ژنی با آلل ۳۴۹ bp در سه پاجوش مجموعه F اختصاصی بود. مکان ژنی BFU0467 با آلل ۲۷۲ bp در سه پاجوش مجموعه G منحصر به فرد بود. مکان ژنی BFU1409 با آلل ۱۷۰ bp در دو پاجوش مجموعه G (G1-Hardeng و G2-Hardeng) و درخت (F4-Hardeng) از مجموعه F به صورت مشترک، منحصر به فرد شناخته شد (جدول ۶).

#### آنالیز روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها براساس SSR و

#### RAPD

ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های RAPD با ضریب تشابه جاکارد تشکیل شد. متوسط ضریب تشابه بین نمونه‌ها برابر با ۰/۶۷ بود و دامنه آن، از ۰/۸۷ تا ۰/۴۴ متغیر بود. دو پاجوش (E3-Hardeng) و (E2-Hardeng) که از یک ژنوتیپ هستند، بیشترین شباهت و دو نمونه (G4-Hardeng) و (F3-Hardeng)، با وجود اینکه از یک منطقه هستند، کمترین شباهت و بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم نشان دادند. دندروگرام RAPD با ضریب تشابه جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA، ترسیم شد و با قطع آن در ضریب تشابه ۰/۶۷، نمونه‌ها در ۷ خوشه تقسیم‌بندی شدند.

به منظور بررسی کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگر (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) محاسبه شد. نسبت چندگانه مؤثر SSR (۵/۳۶) در مقایسه با RAPD (۳/۵۵) بالاتر بود. با توجه به بالا بودن مقدار PIC و EMR در نشانگر SSR، متوسط شاخص MI در نشانگر SSR (۲/۵۸) نسبت به نشانگر RAPD (۰/۷۶) بیشتر بود. شاخص قدرت تفکیک (RP) که پتانسیل تمایز آغازگر را برای تفکیک ژنوتیپ‌ها یا افراد را نشان می‌دهد، برای هر آغازگر محاسبه شد. میانگین قدرت تمایز RAPD برابر با ۹/۹۲ بود در حالی که میانگین این شاخص در SSR برابر با ۲/۱۰ به دست آمد. بیشترین و کمترین مقدار مقدار RP در نشانگر RAPD به ترتیب ۱۴/۴۸ (OPA03) و ۲/۲۲ (OPA08) بود (جدول ۴)، و در آغازگرهای SSR بین ۱/۱۲ (BFU1409) و ۲/۷۶ (BFU1205) بود (جدول ۵). طبق نتایج به دست آمده، تنها ۳ باند منحصر به فرد در آغازگرهای RAPD در درختان مجموعه F مشاهده شد در صورتی که بر اساس آغازگرهای SSR، در ۱۰ مکان ژنی، ۲۵ آلل اختصاصی در میان درخت مشاهده شد. در میان درختان دو مجموعه E و H آلل اختصاصی وجود نداشت. مکان ژنی BFU0753 با آلل ۳۷۰ bp، در همه پاجوش‌های

جدول ۶. آل‌های اختصاصی SSR در ۲۵ نمونه عناب

Table 6. SSR private alleles in 25 jujube genotypes

No.	Tree	Group	Loci with Private Alleles	No.	Tree	Group	Loci with Private Alleles
1	A1-Giok	A	BFU1279 (173 bp)	9	F2-Hardeng	F	BFU0753 (349 bp)
2	A2-Giok	A	BFU0586 (240 bp)	10	F3-Hardeng	F	BFU1409 (185 bp), BFU0753 (349 bp), BFU1279 (179 bp)
3	B1-Kangan	B	BFU0286 (268 bp)	11	F4-Hardeng	F	BFU1409 (170 bp), BFU0753 (349 bp)
4	B3-Kangan	B	BFU0478 (224 bp)	12	G1-Hardeng	G	BFU01409 (170 bp), BFU0753 (342 bp)
5	C1-Hardeng	C	BFU0753 (370 bp)	13	G2-Hardeng	G	BFU0467 (272 bp), BFU1409 (170 bp)
6	C2-Hardeng	C	BFU0753 (370 bp)	14	G3-Hardeng	G	BFU0467 (272 bp), BFU0286 (247 bp)
7	C3-Hardeng	C	BFU1409 (176 bp), BFU0753 (370 bp), BFU0733 (296 bp)	15	G4-Hardeng	G	BFU0467 (272 bp), BFU0478 (228 bp)
8	D1-Giok	D	BFU0581 (104 bp), BFU0733 (264 bp, 292 bp)				

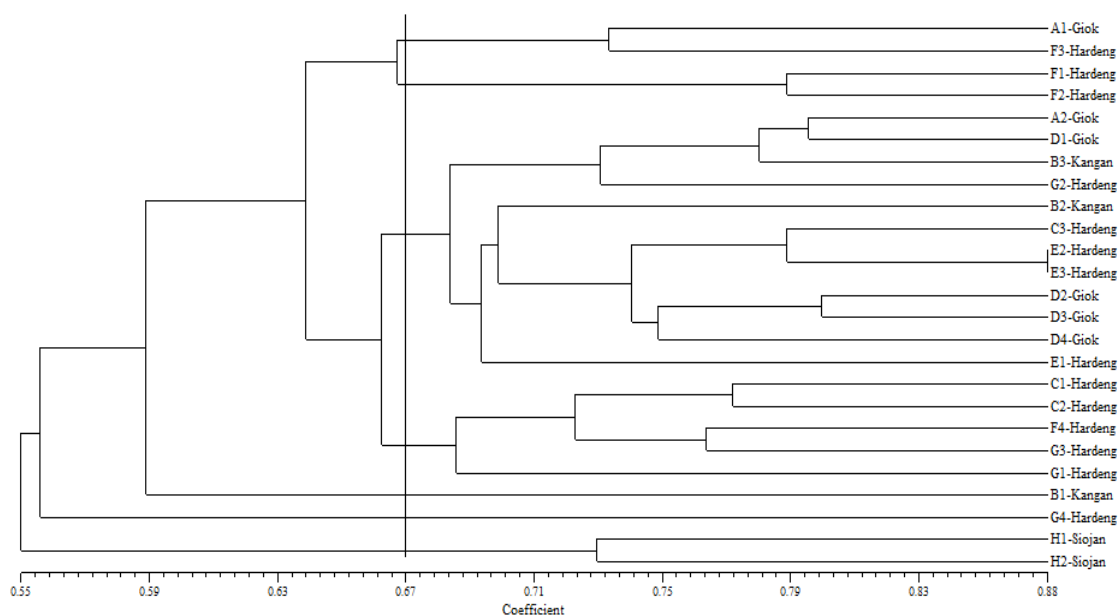
متوسط  $0.41$  متغیر بود. قطع دندروگرام در ضریب تشابه  $0.41$ ، نمونه‌ها را در ۶ گروه قرار داد. گروه اول دارای دو زیرگروه بود. در زیرگروه اول دو پاجوش (A1-Giok)، (A2-Giok) با درصد تشابه  $0.72$ ، و سه پاجوش (B1-Kangan، (Kangan، (B2-Kangan)، (B3-Kangan)، با دامنه تشابه  $0.65$  تا  $0.89$  درصد، و در زیر گروه دوم نیز دوپاجوش (F3-Hardeng) و (F4-Hardeng) با درصد تشابه  $0.63$  قرار گرفتند. نمونه (C1-Hardeng) در کنار نمونه‌های منطقه کنگان قرار گرفت. گروه دوم از یک نمونه (C2-Hardeng) و گروه سوم از دو نمونه (C3-Hardeng) و (D1-Giok) تشکیل شد. گروه چهارم شامل نمونه‌های (E3-Hardeng)، (F1-Hardeng) و (F2-Hardeng) بود. در گروه پنجم نیز پاجوش‌های مجموعه G، با درصد تشابه  $0.52$  تا  $0.76$  و پاجوش‌های مجموعه H با میزان شباهت  $0.66$  درصد، قرار گرفتند. در گروه آخر نیز پاجوش‌های (D2-Giok)، (D3-Giok)، (D4-Giok) با تشابه بین  $0.50$  تا  $0.58$  درصد و پاجوش‌های (E1-Hardeng) و (E2-Hardeng) بود با شباهت  $0.64$  درصدی قرار گرفتند. مطابق دندروگرام SSR همه پاجوش‌های مجموعه C در گروه‌های مختلف پراکنده شدند و از مجموعه D و E، یک پاجوش در گروهی جدا از سایر پاجوش‌ها قرار گرفت (شکل ۲).

بررسی هر دو دندروگرام SSR و RAPD، نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی‌شان گروه‌بندی نشدند که این موضوع می‌تواند به علت سطح کشت وسیع عناب در خراسان جنوبی و احتمال جابه‌جایی پاجوش‌های آنها در بین مناطق مختلف استان باشد. با این حال دندروگرام SSR بهتر توانست پاجوش‌های حاصل از یک ژنوتیپ را در گروه‌های یکسانی قرار دهد.

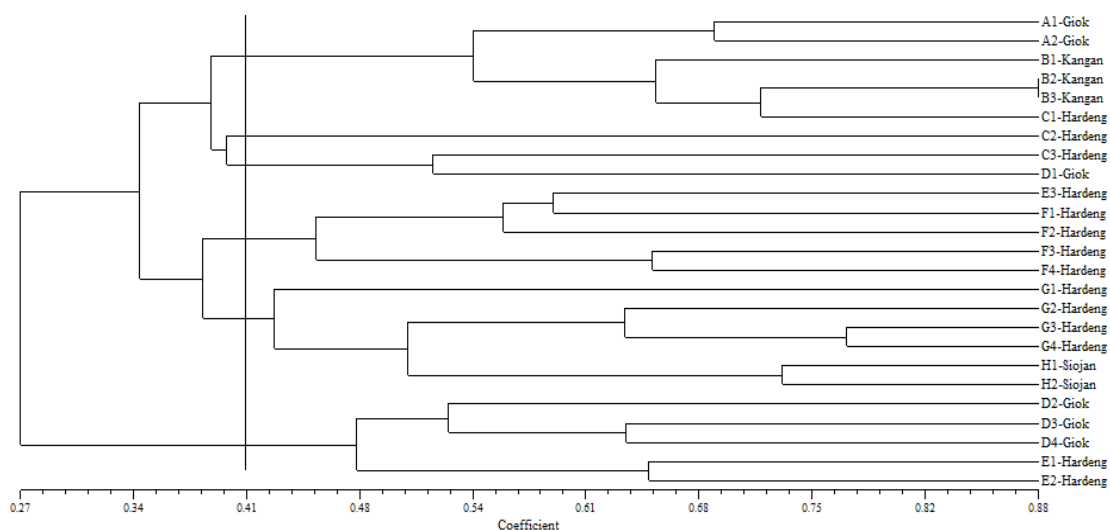
گروه اول شامل دو نمونه (A1-Giok) و (F3-Hardeng) با درصد تشابه  $0.74$  و گروه دوم شامل دو پاجوش یک ژنوتیپ، (F1-Hardeng) و (F2-Hardeng) با درصد تشابه  $0.79$  بود. گروه سوم شامل دو زیر گروه بود. زیرگروه اول از نمونه‌های (A2-Giok) و (D4-Giok)، (C3-Hardeng) و (G2-Hardeng) با درصد شباهت بین  $0.80$  تا  $0.60$  درصد متغیر و زیرگروه دوم شامل ۸ نمونه بود که در بین آنها، سه نمونه (E1-Hardeng)، (E2-Hardeng) و (E3-Hardeng)، پاجوش یک ژنوتیپ بوده درصد شباهت آنها از  $0.87$  تا  $0.69$  متغیر بود. همچنین پاجوش‌های (D2-Giok)، (D3-Giok)، (D4-Giok)، از یک ژنوتیپ یکسان، با درصد تشابه  $0.80$  تا  $0.72$  در این گروه قرار گرفتند. گروه چهارم نیز از پنج نمونه تشکیل شد. در این گروه، دو پاجوش (C1-Hardeng) و (C2-Hardeng) با درصد تشابه  $0.77$  و دو پاجوش (G3-Hardeng) و (G1-Hardeng) نیز با  $0.73$  درصد تشابه قرار گرفتند. گروه پنجم و ششم هر کدام شامل یک نمونه، که به ترتیب مربوط به منطقه کنگان و هردنگ بودند. گروه هفتم نیز از دو نمونه منطقه سیوجان با میزان شباهت  $0.73$  درصد، تشکیل شد. بر اساس دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD تنها دو مجموعه از پاجوش‌ها (E و H) را در یک گروه مشترک قرار دهد و در بقیه مجموعه‌ها، حداقل یک پاجوش در گروه مجزا از سایر پاجوش‌های یک ژنوتیپ قرار گرفته است (شکل ۱).

داده‌های SSR نیز نمونه‌ها را بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA گروه‌بندی کرد. دامنه ضرایب تشابه بین نمونه‌ها، از  $0.89$  بین دو پاجوش (B2-Kangan) و (Kangan) تا  $0.09$  بین نمونه (F3-Hardeng) با دو نمونه (D3-Giok) و (D4-Giok) با





شکل ۱. دندروگرام مربوط به گروه‌بندی نمونه‌های عناب با استفاده از داده‌های RAPD، با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد  
Figure 1. Dendrogram obtained by UPGMA analysis of RAPD marker and Jaccard similarity coefficient



شکل ۲. دندروگرام مربوط به گروه‌بندی نمونه‌های عناب با استفاده از نشانگر SSR، با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد  
Figure 2. Dendrogram obtained by UPGMA analysis of SSR marker and Jaccard similarity coefficient

ماتریس تشابه بر اساس ترکیب داده‌های SSR و RAPD نشان داد، دامنه ضرایب تشابه بین نمونه‌ها از ۳۷ تا ۷۸ درصد با متوسط تشابه برابر با ۵۷ درصد محاسبه گردید. دو پاجوش (B2-Kangan) و (B3-Kangan)، همانند SSR، بیشترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند و دو نمونه (H2-Siojan) و (B3-Kangan)، بیشترین فاصله را داشتند. در دندروگرام ترکیب شده، اکثر پاجوش‌های ژنوتیپ‌های یکسان در خوشه‌های یکسان

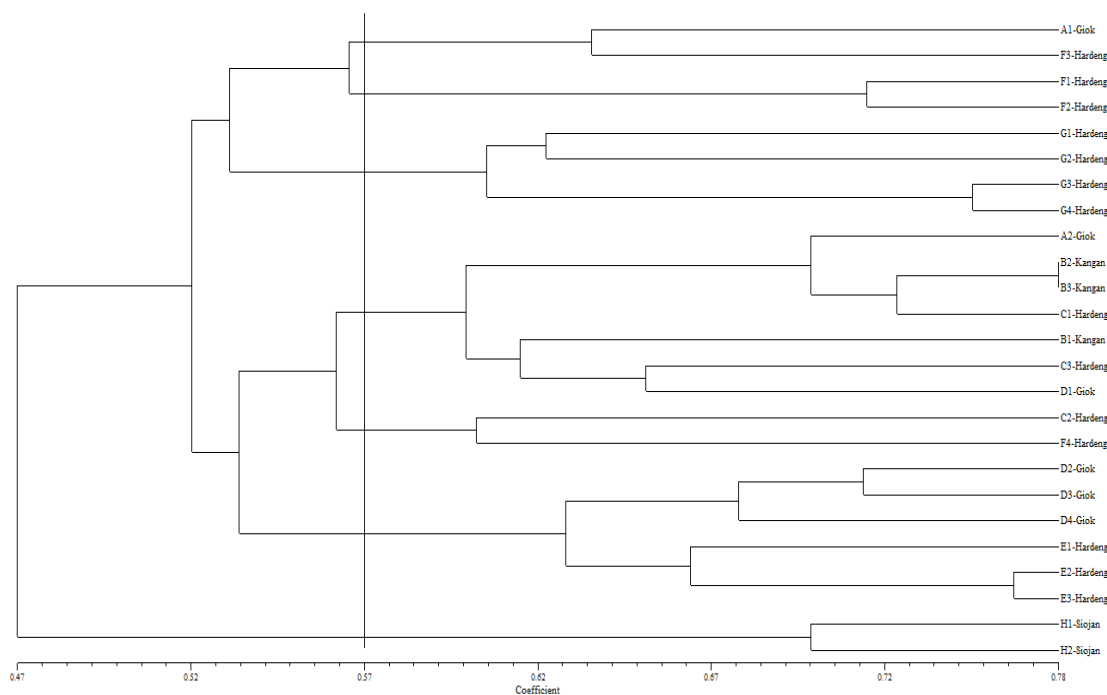
همبستگی میان دو نشانگر RAPD و SSR بر اساس ماتریس تشابه و با استفاده از آزمون مانتل (ضریب پیرسون)، پایین بود ( $r=0/158$ ) که بیانگر این موضوع است که دو مجموعه نشانگر، برآوردهای غیرمرتبط از روابط ژنتیکی را نشان می‌دهند. Karim *et al.* (2008) نیز همبستگی ضعیفی را بین دو نشانگر RAPD و SSR در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ جو گزارش کردند.

در نظر گرفته می‌شود که وابسته به سن کلون، تنش‌های محیطی و نوع ژنوتیپ می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان منبعی از تغییرات در زمینه ژنتیک یکنواخت تلقی شوند (Slatkin, 1985; Eisen, 1999; Vezzulli *et al.*, 2012). وقوع جهش منجر به تفاوت بین توالی DNA اصلی و کپی شده می‌شود و شایع‌ترین علت جهش در مکان‌های ریزماهورای لغزش DNA پلیمرز در طی تکثیر رشته DNA است (Eisen, 1999; Hamilton, 2009). چنین جهش‌هایی ممکن است در مراحل اولیه توسعه مریستم، زمانی که فرد جدید از جوانه‌های نابجا روی ریشه رشد می‌کند، رخ دهد (D'Amato, 1997; Vezzulli *et al.*, 2012). مکانیسم جهش میکروستلایت‌ها که به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است بر اساس مدل Slipped-Strand mispairing می‌باشد، که طبق این مدل، لغزش DNA پلیمرز موجب اتصال مجدد ناهموار، در تکثیر رشته DNA می‌شود و در نتیجه باعث حذف و یا الحاق یک یا تعداد بیشتری از واحدهای تکراری می‌شود، با این حال شواهد قطعی مبنی بر پشتیبانی از این مدل وجود ندارد (Lian *et al.*, 2004).

قرار گرفتند، به جز پاجوش‌های سه مجموعه A، C، D، F. در هر سه دندروگرام نمونه (D1-Giok) از سایر پاجوش‌های مجموعه D جدا شد. همچنین نمونه‌های دو مجموعه D و E در یک خوشه قرار گرفتند که نشان از قرابت ژنتیکی آنها نسبت به هم است. در دندروگرام ترکیب شده، پاجوش‌های منطقه سیوجان در گروهی جدا قرار گرفتند (شکل ۳). وجود تمایز بین پاجوش‌های حاصل از یک ژنوتیپ، نشان از احتمال وقوع جهش سوماتیکی در آنها می‌دهد. گزارش‌هایی مبنی بر وقوع جهش سوماتیکی در جایگاه‌های ژنی ریزماهورای در گونه‌های چوبی که اغلب از طریق رویشی در طبیعت تکثیر می‌شوند، وجود دارد (Lian *et al.*, 2004; Ally *et al.*, 2008; Jarni *et al.*, 2015). در بررسی انجام‌شده علاوه بر تفاوت پاجوش‌ها در مکان‌های ریزماهورای، آنها در مکان‌های ژنی RAPD نیز با هم متفاوت بودند.

### جهش سوماتیکی

جهش سوماتیکی در گیاهان به‌عنوان یک نیروی تکاملی



شکل ۳. دندروگرام مربوط به ترکیب داده‌های SSR و RAPD، با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

Figure 3. Dendrogram obtained by UPGMA analysis of combined data of SSR and RAPD markers and Jaccard Similarity coefficient

## نتیجه‌گیری کلی

خوشه‌ها نشان می‌دهد. ترکیب داده‌های دو نشانگر همچنین خوشه‌بندی مناسب‌تری از نمونه‌ها را به نمایش گذاشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده، ما ژنوتیپ‌هایی با توالی‌های اختصاصی داریم که می‌توان با جمع‌آوری نمونه‌هایی از مناطق مختلف این استان و ایران و مقایسه آنها با نمونه‌های مرکز تحقیقات، تحلیل مناسبی از ساختار و تنوع ژنتیکی عناب در ایران ارائه داد همچنین می‌توان اطلاعاتی از منشأ و مسیر جابه‌جایی عناب در ایران تهیه کرد.

براساس مقایسه پارامترهای PIC، MI و EMR دو نشانگر، به‌نظر می‌رسد نشانگر SSR قدرت تمایز بهتری نسبت به نشانگر RAPD نشان داده‌است. همچنین دندروگرام حاصل از داده‌های SSR بهتر توانست نمونه‌ها را تفکیک کند، زیرا پاجوش‌هایی که از ژنوتیپ‌های یکسانی بودند در دندروگرام حاصل از SSR در خوشه‌های یکسانی قرار گرفتند، درحالی‌که دندروگرام RAPD پراکندگی زیاد پاجوش‌ها را در

## REFERENCES

1. Abbasi, S., Malekzaheh Shafarodi, S., Ghos, K. & Shahryari, F. A. (2011). Genetic diversity evaluation of jujube ecotypes using RAPD molecular marker. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 10(3) 583-590. (in Farsi)
2. Ahmed, N., Mir, J. I., Rashid, R., Wani, S. H., Shafi, W., Mir, H. & Sheikh, M. A. (2012). SSR and RAPD analysis of genetic diversity in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Jammu and Kashmir, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(2), 149-160.
3. Ainsworth, C., Beynon, J. & Buchanan-Wollaston, V. (1996). Techniques in plant biology: The practical manual. *Wye College, University of London, UK*.
4. Ally, D., Ritland, K. & Otto, S. P. (2008). Can clone size serve as a proxy for clone age? An exploration using microsatellite divergence in *Populus tremuloides*. *Molecular Ecology*, 17, 4897-4911.
5. Bai, R. X. (2008). *Studies on genetic diversity and core collections construction of Ziziphus jujuba germplasm resources using AFLP and SRAP marker*. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Hebei, China.
6. Bhandari, H. R., Bhanu, N. A., Srivastava, k., Singh, M. N. & Shreya, I. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plant- an overview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7(3), 1-8.
7. Chen, J., Li, Z., Maiwulanjiang, M., Zhang, W. L., Zhan, J. Y., Lam, C. T., Zhu, K. Y., Yao, P., Choi, R. C., Lau, D. T., Dong, T. T. & Tsim, K. W. (2013). Chemical and biological assessment of *Ziziphus jujuba* fruits from China: different geographical sources and developmental stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 7315-7324.
8. Daghighi, S. (1999). *Survey of methods of propagation of jujube tree*. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran, 85p. (In Farsi)
9. D'Amato, F. (1997). Role of somatic mutations in the evolution of higher plants. *Caryologia*, 50(1), 1-15.
10. Devanshi, A. K., Singh, A. K., Sharma, P., Singh, B., Singh, R. & 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.
11. Diao, Y., Han, H., Jiang, J. & Zheng, Y. (2014). RAPD Analysis of Different *Ziziphus jujuba* Mill. Varieties. Hubei Agricultural Sciences, from [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-HBNY201401035.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HBNY201401035.htm).
12. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11- 15.
13. Eisen, J.A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Golstein, D.B. & Schlötterer, C. (Ed). *Microsatellites. Evolution and Applications*. (pp. 34-48) Oxford University Press,.
14. Fu, P. C., Zhang, Y. Z., Ya, H. Y. & Gao, Q. B. (2016). Characterization of SSR genomic abundance and identification of SSR markers for population genetics in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *PeerJ*, 4, e1735.
15. Garkava-Gustavsson, L., Mujaju, C., Sehic, J., Zborowska, A., Backes, G. M., Hietaranta, T. & Antonius, K. (2013). Genetic diversity in Swedish and Finnish heirloom apple cultivars revealed with SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 162, 43-48.
16. Govindaraj, M., Vetriventhan, M. & Srinivasan, M. (2014). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. *Journal of Genetics Research International*, 2015, 1-14.
17. Hamilton, M. B. (2009). *Population genetics*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell. 407 pp.

18. Jarni, K., Jakse, J. & Brus, R. (2015). Vegetative propagation: linear barriers and somatic mutation affect the genetic structure of a *Prunus avium* L. stand. *Forestry*, 88, 612-621.
19. Karim, K., Rawda, A., Hatem, C. M., Mbarek, B. N. & Mokhtar, T. (2008). Analysis of genetic diversity and relationships in local Tunisian barley by RAPD and SSR analysis. *African Journal of Biotechnology*, 9(44), 7429-7436.
20. Li, L., Peng, J. Y. & Bai, R. X. (2009). Study on phylogenetic relationship of Chinese ziziphus. *Acta Horticulturae Sinica*, 36(4), 475-480.
21. Li, J. D., Bi, H. T., Li, Z. S. & Feng, J. C. (2008). Genetic analysis of *Ziziphus jujuba* 'Huizao' using ISSR markers. *Acta Horticulturae*, 840, 135-142.
22. Lian, C., Oishi, R., Miyashita, N. & Hogetsu, T. (2004). High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 836-841.
23. Liu, M. J., Zhao, J., Cai, Q. L., Liu, G. C., Wang, J. R., Zhao, Z. H., Liu, P., Dai, L., Yan, G. J., Wang, W. J., Li, X. S., Chen, Y., Sun, Y. D., Liu, Z. G., Lin, M. J., Xiao, J., Chen, Y. Y., Li, X. F., Wu, B., Ma, Y., Jian, J. B., Yang, W., Yuan, Z., Sun, X. C., Wei, Y. L., Yu, L. L., Zhang, C., Liao, S. G., He, R. J., Guang, X. M., Wang, Z., Zhang, Y. Y. & Luo, L. H. (2014). The complex jujube genome provides insights into fruit tree biology. *Nature Communication* 5,5315.
24. Liu, P., Jianying, P., Siqi, P., Junyi, Z. & Li, D. (2005). Study on systematic relationships of *Ziziphus jujuba* and *Ziziphus spinosa* using RAPD technique. *Scientia Silvae Sinica*. 2, 182-185.
25. Liu, Z., Zhang, L., Xue, C., Fang, H., Zhao, J. & Liu, M. (2017). Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene family in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *BMC Genomics*, 18, 855.
26. Ma, Q. H., Wang, G. X. & Liang, L. S. (2011). Development and characterization of SSR markers in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and its related species. *Scientia Horticulturae* 129(4),597–602.
27. Ministry of Agriculture Jihad. (2017). *Agricultural Statistics: Horticultural crop* (3). From <https://www.maj.ir>
28. Peng, J. Y., Shu, H. R. & Peng, S. Q. (2002). To address the problem of infraspecific classification of *Ziziphus jujuba* Mill. Using RAPD data. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 40, 89-94.
29. Peng, J. Y., Shu, H. R., Sun, Z. X. & Peng, S. Q. (2000). RAPD Analysis of germplasm resources on Chinese date. *Acta Horticulturae Sinica*, 27(3), 171-176.
30. Sherry, M., Smith, S., Patel, A., Harris, P., Hand, P., Trenchard, L. & Henderson, J. (2011). RAPD and microsatellite transferability studies in selected species of *Prosopis* (section *Algarobia*) with emphasis on *Prosopis juliflora* and *P. pallida*. *Journal of Genetics*, 90, 251-264.
31. Singh, A. K., Singh, R. & Singh, N. K. (2009). Comparative evaluation of genetic relationships among ber (*Ziziphus* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 69(1), 50-57
32. Slatkin, M. (1985). Somatic mutations as an evolutionary force. In: *Evolution-essays in honour of John Maynard-Smith*, (pp. 19-30.) Cambridge University Press, Cambridge.
33. Song, Y., Fan, L., Chen, H., Zhang, M., Ma, Q., Zhang, S. & Wu, J. (2014). Identifying genetic diversity and a preliminary core collection of *Pyrus pyrifolia* cultivars by a genome-wide set of SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 167, 5e16.
34. Vezzulli, S., Leonardelli, L., Malossini, U., Stefanini, M., Velasco, R. & Moser, C. (2012) Pinot blanc and Pinot gris arose as independent somatic mutations of Pinot noir. *Journal of Experimental Botany*, 63, 6359-6369.
35. Wang, S., Liu, Y., Ma, L., Liu, H., Tang, Y., Wu, L., Wang, Z., Li, Y., Wu, R. & Pang, X. (2014). Isolation and characterization of microsatellite markers and analysis of genetic diversity in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *PLoS ONE*, 9:e99842.
36. Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.
37. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. K. & Tingey, S. K. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
38. Xu, C., Gao, J., Du, Z., Li, D., Wang, Z., Li, Y. & Xiaoming, P. (2016). Identifying the genetic diversity, genetic structure and a core collection of *Ziziphus jujuba* Mill. var. jujuba accessions using microsatellite markers. *Scientific Reports*, 6:31503.
39. Zhang, C., Huang, J., Yin, X., Lian, C. & Li, X. (2014). Genetic diversity and population structure of sour jujube, *Ziziphus acidofujuba*. *Tree Genetics & Genomes*, 11 (1), 809.
40. Zhang, Z., Gao, J., Kong, D., Wang, A., Tang, S., Li, Y. & Pang, X. (2015). Assessing genetic diversity in *Ziziphus jujuba* 'Jinsixiaozao' using morphological and microsatellite (SSR) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 196-202.
41. Zhao, J., Jian, J., Liu, G., Wang, J., Lin, M., Ming, Y., Liu, Z., Chen, Y., Liu, X. & Liu, M. (2014). Rapid SNP discovery and a RAD-based high-density linkage map in Jujube (*Ziziphus* Mill.). *PLoS ONE*, 9(10), 1-8.