نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 3، پاییز 1396، ص. 437-425
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 425-437
ISSN: 2008 - 4730

ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های کلکسیون عناب ایران (*Ziziphus* spp.) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

هاجر شایسته[1] - سعید ملک زاده شفارودی[2*] - کمال غوث[3] - فرج الله شهریاری[4]

تاریخ دریافت: 1392/08/28
تاریخ پذیرش: 1395/12/17

چکیده

عناب (*Zizyphus jujuba* Mill.) به عنوان یک میوه ارزشمند و مقاوم به شرایط مختلف آب و هوایی در بسیاری از مناطق ایران گسترش دارد. از عناب علاوه بر صادرات بعنوان گیاه دارویی نیز استفاده می‌شود لذا ارزش اقتصادی قابل توجهی دارد. ارزیابی تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و گام اولیه برای شناسایی و نگهداری ذخایر ژنتیکی و از اصول اولیه اصلاح گیاهان محسوب می‌شود. استفاده از نشانگرهای DNA از بهترین روش‌های موجود برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشند. در این بررسی از نشانگر ISSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی 31 اکوتیپ عناب جمع‌آوری شده از هشت استان عناب‌خیز کشور استفاده گردید. تعداد 13 آغازگر در واکنش PCR آزمایش شدند که شش آغازگر DNAی الگو را بخوبی تکثیر و در بین نمونه‌ها چندشکلی را آشکار نمودند. از میان 84 مکان ژنی شناسایی شده، تعداد 70 مکان (83 درصد) چندشکلی نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و به روش UPGMA انجام گرفت. در تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌ها در سطح تشابه 0/85 در هفت گروه اصلی جای گرفتند. بیشترین تشابه ژنتیکی (0/95) بین نمونه‌های کلاله و درح و همچنین نوغاب و دوستیران و کمترین تشابه ژنتیکی (0/48) بین نمونه‌های برزادران و کنگان بدست آمد. آغازگرهای $(AC)_8YT$ و $(GA)_8A$ مناسب‌ترین آغازگرها برای مطالعات بعدی تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع کل نمونه‌های کشور تقریباً در تنوع ناحیه خراسان‌جنوبی خلاصه شده است. همچنین در اکوتیپ‌های متعلق به استان‌های اصفهان و مازندران، سطح قابل ملاحظه‌ای از تنوع مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی ISSR، *Zizyphus jujuba*

مقدمه

عناب با نام علمی *Zizyphus jujuba* Mill. به خانواده *Rhamnaceae* تعلق دارد. این گیاه دارویی که در زبان فارسی به نام‌های تبرخون، شیلان، سنجد بلخ و سیب کوهی نیز خوانده می‌شود، از گذشته‌های بسیار دورکشت می‌شده و در آثار و فسیل‌های به جا مانده قدمت آن به بیش از 12 تا 14 میلیون سال پیش می‌رسد. درختی است بومی چین که حدود 7700 سال پیش در چین کاشت می‌شده است و به خرمای چینی معروف است. درخت عناب به حالت نیمه خودرو پرورش یافته و تا ارتفاع 2000 متری در نواحی شمالی ایران، گرگان، گیلان، کاشمر (خانقاه، سیر)، بلوچستان، بندر عباس، کرمان، شیراز و اطراف سیستان و زابل می‌روید (5 و 23). در جدول 1 آمار سطح زیر کشت عناب در ایران بر اساس آمارگیری سال 1388 سازمان جهاد کشاورزی خراسان جنوبی نشان داده شده است (6).

عناب به عنوان داروی تصفیه‌کننده خون، آرام‌کننده اعصاب، مقوی عمومی، مقوی معده، آرام‌بخش، ملین، ضدسرفه و مدر بکار می‌رود. بی‌خوابی را از بین برده و عرق شبانه را قطع می‌کند. برای ضعف عمومی و به طور کلی احساس خستگی و ضعف شدید بسیار نافع است. از برگ، ریشه و پوست درخت عناب برای قطع بعضی انواع تب، افزایش رشد موی سر و تهیه مایع شستشوی چشم استفاده می‌شود. عناب از داروهای ملین و نرم‌کننده سینه است (7). این گیاه از جمله درختان مقاومی است که قابلیت رشد و تولید در زمین‌های کم‌آب و شور را دارا می‌باشد و توجه بیشتر به آن ضمن بالا بردن ظرفیت تولید محصولات کشاورزی در حفاظت خاک نیز می‌تواند مؤثر باشد (5). در ایران تاکنون در خصوص تنوع موجود در نمونه‌های

1، 2 و 4- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: malekzadeh-s@um.ac.ir
3 - کارشناس ارشد کشاورزی، جهاد کشاورزی استان خراسان جنوبی
DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.27523

عناب اقدام چندان زیادی صورت نگرفته است. با این حال نتایج اولیه روی نمونه‌های جمع‌آوری شده اکوتیپ‌های موجود و ایجاد کلکسیون از برخی انواع عناب در ایران نشان می‌دهد که تنوع مورفولوژیکی زیادی در عناب وجود دارد.

دانش کافی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی و چگونگی استفاده بهینه از آن، از منافع بنیادین برای علوم پایه و برنامه‌های کاربردی مانند مدیریت مؤثر منابع ژنتیکی محصولات گیاهی است (11). جهت تعیین تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی مواد ژنتیکی، بهترین روش استفاده از نشانگرهای مولکولی می باشد زیرا تعیین تنوع بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی با توجه به اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ بر فنوتیپ گیاهان، کارایی لازم را نخواهد داشت. نشانگرهای DNA به دو دسته مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم می‌شوند. از نشانگرهای معمول مبتنی بر PCR می‌توان RAPD[1]، AFLP[2] و SSR[3] را نام برد (17).

محدودیت‌های اصلی این روش‌ها تکرارپذیری کم RAPD، هزینه زیاد AFLP و نیاز به دانستن توالی‌های مجاور برای تولید آغازگرهای خاص هر گونه در مورد SSR می‌باشد. ISSR-PCR تکنیکی است که بر بیشتر این محدودیت‌ها غلبه کرده است (17). قطعاتISSR، توالی DNA به طول 3000-100 جفت باز می‌باشند که بین دو ناحیه ریزماهوارک[4] که در جهت مخالف هم قرار گرفته‌اند، جای دارند. آغازگرهایی بر اساس ریزماهوارک طراحی و استفاده می‌شوند تا توالی DNA بین دو ISSR را تکثیر کنند (9). این آغازگرها شامل تکرارهایی دو، سه، چهار و یا پنج نوکلئوتیدی می‌باشند. همچنین آغازگرها می‌توانند قلاب نشده و یا معمولاً قلاب‌شده در انتهای ´3 یا ´5 بوسیله 1 تا 4 باز باشد. این تکنیک در مواردی چون بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعات فیلوژنی و تهیه نقشه ژنوم به کار می‌رود. مجموعه این ویژگی‌ها باعث شده که این روش کاربرد و اهمیت بالایی بویژه در مطالعه ژنوم‌های ناشناخته داشته باشد (17).

نشانگر ISSR بطور موفقیت‌آمیزی برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در سطوح بین و درون‌گونه‌ای در مورد دامنه وسیعی از محصولات گیاهی استفاده شده است (4، 8 و 15). نوروزی و همکاران (12)، برای اولین بار از روش ISSR برای شناسایی رقم‌های پسته ایرانی، از 6 آغازگر استفاده کردند و نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی میان 31 رقم پسته مورد مطالعه وجود دارد و آنالیز ISSR-PCR چندشکلی کافی برای انگشت‌نگاری DNA در مقیاس بزرگ را تولید می‌کند. رائو و همکاران (16) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR روابط ژنتیکی بین 19 رقم نخود و جد وحشی *Cicer reticulatum* را بررسی نمودند. آنها گزارش کردند که حتی با شش آغازگر چند شکل ISSR تخمین قابل اعتمادی از تنوع ژنتیکی قابل دستیابی است، در حالی‌که حدود 30 آغازگر جهت تخمین تنوع ژنتیکی با استفاده از RAPD مورد نیاز می‌باشد.

استفاده از نشانگر ISSR در تعیین روابط خویشاوندی گونه‌های مختلف جنس *Ziziphus* نیز با موفقیت همراه بوده است (14 و 20). به عنوان مثال فو و همکاران (3) ارتباط ژنتیکی بین 22 رقم از جنس *Zizyphus* شامل 19 رقم ازber، دو رقم از Chinese date و یک رقم از spine date با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD بررسی کردند. طبق آنالیز خوشه‌ای این 22 رقم در سه گروه با سطح شباهت ژنتیکی 0/845 قرار داده شد. اولین گروه شامل 16 واریته ber از تایوان، گروه دوم شامل سه رقم دیگر ber از ویتنام و گروه سوم شامل Chinese date و spine date بود. نتایج آنالیز خوشه‌ای کاملاً منطبق با ایدئولوژی سنتی در مورد طبقه‌بندی بود. در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی در میان 48 ژنوتیپ ber از مناطق مختلف جغرافیایی هند با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد مطالعه قرار گرفت. شباهت ژنتیکی در میان 48 ژنوتیپ ber در محدوده 47/62 درصد تا 88/97 درصد بود و پیشنهاد گردید که یک پایه ژنتیکی گسترده برای مجموعه ژرم‌پلاسم ber است. این مطالعه برتری سیستم مارکری ISSR نسبت به مارکر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در ber را نشان داد (21). لی و همکاران (10) با استفاده از روش ISSR تنوع ژنتیکی میان 117 نمونه عناب *Ziziphus jujuba* ’Huizao‘ که از نواحی مختلف جمع‌آوری شده بودند را ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت وجود دارد و بنابراین پتانسیل اصلاحی زیادی در این گونه وجود دارد. تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارتباط اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده عناب از مناطق مختلف ایران در کلکسیون عناب ایران (در خراسان جنوبی) با کمک نشانگر ISSR، به عنوان یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی به اجرا گذارده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از 31 اکوتیپ عناب که از میان هشت استان عناب‌خیز کشور شامل استان‌های لرستان،مازندران، گلستان، خراسان جنوبی و رضوی، اصفهان، فارس و قم جمع‌آوری شده بود، استفاده گردید. اکوتیپ‌های مذکور به همت کارشناس اداره جهاد کشاورزی شهرستان سربیشه ـآقای مهندس کمال غوث- در قالب کلکسیونی در محل دشت خاران شهرستان سربیشه کاشته شده‌اند. نمونه‌برداری از برگ‌های جوان نهال‌ها صورت گرفت و سپس در دمای 20- سانتیگراد نگهداری شدند. منشأ و علامت اختصاری اکوتیپ‌های مورد استفاده در جدول 2 آمده است.

1- Random Amplified Polymorphic DNA
2- Amplified fragment length polymorphism
3- Simple Sequence Repeat
4- Microsatellite

جدول 1- آمار سطح زیر کشت عناب در ایرانبر اساس آمارگیری سال 1388 سازمان جهاد کشاورزی خراسان جنوبی (6)

Table 1- Statistics of jujube cultivation in Iran based on the 1388 Census of Agricultural Organization of Southern Khorasan Province (6)

نام استان Name of Province	جمع کل Total (ha)	میزان کل تولید Total production (tonne)
خراسان جنوبی Southern Khorasan	1168	1702
خراسان رضوی Razavi Khorasan	31	9
اصفهان Isfahan	3	8
فارس Fars	6	15
کرمان Kerman	2	0.5
لرستان Lorestan	50	50
یزد Yazd	2	1
جمع کل Total	1260	1785.5

استخراج DNA: استخراج DNAی ژنومی به روش CTAB بر اساس روش زنگ و همکاران (24) با اندکی تغییرات انجام شد. غلظت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز تعیین گردید و تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آغازگرها: در این پژوهش از 13 آغازگر استفاده شد که اکثر آن‌ها بر اساس مطالعات لی و همکاران (10) انتخاب شدند. مشخصات آغازگرها در جدول 3 آمده است. از میان آغازگرهای استفاده شده، شش آغازگر که تکثیر DNAی الگو را به خوبی انجام داده و در بین نمونه‌ها چندشکلی مطلوبی نشان دادند، جهت آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: تکثیر قطعات DNA در یک واکنش با حجم نهایی 25 میکرولیتر، شامل 2/5 میکرولیتر بافر PCR (10 x)، 60 نانوگرم DNAی ژنومی، 2/5 میلی‌مولار $MgCl_2$، 0/5میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs- سیناژن)، 10 پیکومول آغازگر و یک واحد آنزیم DNA تک‌پلیمراز (Fermentas) انجام شد. برای تکثیر قطعات DNA از دستگاه ترموسایکلر مدل Flex cycler (Biostep- آلمان) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با واسرشت‌سازی اولیه DNAی ژنومی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه آغاز و با 35 چرخه شامل دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 45 ثانیه برای واسرشت‌سازی، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت 45 ثانیه با توجه به دمای اتصال آغازگرها مطابق جدول 3، گسترش رشته جدید به مدت 2 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد و گسترش نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 10دقیقه دنبال شد. از ژل آگارز 1/5 درصد برای مشاهده محصولات PCR استفاده شد. نمونه‌ها با ولتاژ ثابت 90 و به مدت 100 دقیقه الکتروفورز شدند. برای تخمین اندازه قطعات حاصل از واکنش PCR از نشانگر اندازه استفاده شد. پس از شستشوی ژل عکس‌برداری توسط نور UV صورت گرفت.

جدول2- مشخصات اکوتیپ‌های عناب کلکسیون سربیشه

Table 2-Characteristics of sarbisheh jujube collection ecotypes

ردیف Number	محل جمع‌آوری Gathering place	کد Code
1	ساری-مازندران Sari- Mazandaran	Sari 8
2	کنگان سربیشه-خراسان جنوبی Kangan- Southern Khorasan	Kangan 9
3	نوغاب سربیشه-خراسان جنوبی Noghab Sarbisheh- Southern Khorasan	Noghab 10

4	القور بیرجند-خراسان جنوبی Ahghur- Southern Khorasan	Alghur 11
5	کلاله-گلستان Kalale- Southern Khorasan	Kalale 12
6	عربخانه نهبندان-خراسان جنوبی Arabkhane- Southern Khorasan	Arabkhane 14
7	نوغاب سربیشه-خراسان جنوبی Noghab Sarbisheh- Southern Khorasan	Noghab 15
8	بردسکن-خراسان رضوی Bardaskan- Razavi Khorasan	Bardaskan 18
9	جویبار-مازندران Juibar- Mazandaran	Juibar 19
10	درح سربیشه-خراسان جنوبی Doroh- Southern Khorasan	Doroh 20
11	کنگان سربیشه-خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 21
12	درخش درمیان-خراسان جنوبی Derakhsh- Southern Khorasan	Derakhsh 22
13	تجنود قائن-خراسان جنوبی Tajnud Ghaen- Southern Khorasan	Tajnud 23
14	کوهپایه – اصفهان Kouhpayeh- Isfahan	Kouhpayeh 26
15	درح سربیشه- خراسان جنوبی Doroh Sarbisheh- Southern Khorasan	Doroh 27
16	آسفیچ سربیشه- خراسان جنوبی Asphich Sarbisheh- Southern Khorasan	Asphich 28
17	کنگان سربیشه- خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 29
18	قم Qom	Qom 30
19	گیوک بیرجند- خراسان جنوبی Giuk- Southern Khorasan	Giuk 31
20	درح سربیشه-خراسان جنوبی Doroh Sarbisheh- Southern Khorasan	Doroh 32
21	الیگودرز- لرستان Aligoudarz- Lorestan	Aligoudarz 33
22	کلکستان نوغاب- خراسان جنوبی Kalkestan- Southern Khorasan	Kalkestan 34
23	خواف- خراسان جنوبی Khaf- Southern Khorasan	Khaf 35
24	بیاضیه- اصفهان Bayazieh- Isfahan	Bayazieh 36
25	کنگان سربیشه-خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 38
26	برزادران بیرجند- خراسان جنوبی Borzaderan Birjand- Southern Khorasan	Borzaderan 39
27	کشوک پائین- خراسان جنوبی Kashuk paeen- Southern Khorasan	Kashuk 40
28	اردستان – اصفهان Ardestan- Isfahan	Ardestan 41
29	برزادران بیرجند- خراسان جنوبی Borzaderan Birjand- Southern Khorasan	Borzaderan 42
30	دوستیران-فارس Doostiran- Fars	Doostiran 43
31	کنگان سربیشه- خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 44

جدول 3- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده بر اساس مطالعات لی و همکاران

Table 3- Primers used for the ISSR analysis according to Lei et al.

ردیف Number	نام آغازگر Primer	فرمول توالی Sequence formula	توالی آغازگر (5´-3 primer sequence)	دمای اتصال Annealing temperature (C°)
1	UBC807	$(AG)_8T$	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT -3'	49
2	UBC808	$(AG)_8C$	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC -3'	49
3	UBC810	$(GA)_8T$	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAT -3'	49
4	UBC811	$(GA)_8C$	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC -3'	49
5	UBC812	$(GA)_8A$	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAA -3'	49
6	UBC814	$(CT)_8A$	5'- CTCTCTCTCTCTCTCTA-3'	49
7	UBC815	$(CT)_8G$	5'-CTCTCTCTCTCTCTCTG -3'	49
8	UBC834	$(AG)_8Y*T$	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT -3'	49
9	UBC840	$(GA)_8YT$	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT -3'	49
10	UBC841	$(GA)_8YC$	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYC -3'	49
11	UBC855	$(AC)_8YT$	5'-ACACACACACACACACYT -3'	49
12	UBC864	$(ATG)_6$	5'-ATGATGATGATGATGATG -3'	45
13	UBC868	$(GAA)_6$	5'-GAAGAAGAAGAAGAAGAA -3'	45

*Y= C و T

جدول 4- میزان چندشکلی ایجاد شده توسط آغازگرهای مورداستفاده ISSR

Table 4- Number of DNA polymorphic bands produced by ISSR primers

نام آغازگر primer	توالی sequence	تعداد کل باندها Total number of Bands	تعداد باندهای چندشکل Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)
UBC855	$(AC)_8YT$	16	14	87.5
UBC811	$(GA)_8C$	10	8	80
UBC864	$(ATG)_6$	15	13	86.6
UBC808	$(AG)_8C$	15	11	73.3
UBC812	$(GA)_8A$	12	11	91.6
UBC834	$(AG)_8YT$	16	13	81.2
Average		14	11.6	83.3

تحلیل داده‌ها: قطعات DNAی تکثیر شده بر اساس همردیفی باندها به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیازبندی شد. داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel ،جهت تجزیه خوشه‌ای[1] با استفاده ازالگوریتم UPGMA[2] و ضریب دایس[3] به نرم‌افزار NTSYSpc Ver 2.02 (18) وارد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین جهت تعیین میزان قرابت جمعیت‌هابا یکدیگر، از نرم‌افزار POPGEN3.2 (22) استفاده شد.

نتایج و بحث

مشاهده الگوهای باندی ISSR:تجزیه ISSR در 31 نمونه عناب، با استفاده از شش آغازگر، در مجموع 84 مکان قابل امتیازدهی ایجاد کرد که اندازه آنها در محدوده 200 تا 2000 جفت باز بود. در این بین 70 مکان (83 درصد) چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر 14 و میانگین تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر 11/6 بود. تعداد باند چندشکل مشاهده شده بوسیله این شش آغازگر در کلکسیون عناب ایران بین هشت تا 14 باند بود. بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگرUBC855 با14باند و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگرUBC811با هشت باند بود (جدول 4).

در مجموع 13 آغازگر مورد آزمایش به نظر می‌رسد آغازگرهای با تکرارهای دو نوکلئوتیدی نسبت به آغازگرهای با تکرارهای سه نوکلئوتیدی باندهای چندشکل بیشتری را تولید می‌کنند که به نظر می‌رسد این امر به دلیل فراوانی بیشتر توالی‌های حاوی تکرارهای دونوکلئوتیدی و قرارگیری آن‌ها در ناحیه بین ژنی باشد. همچنین احتمال وقوع جهش در این توالی‌ها نسبت به نواحی کد کننده ژن

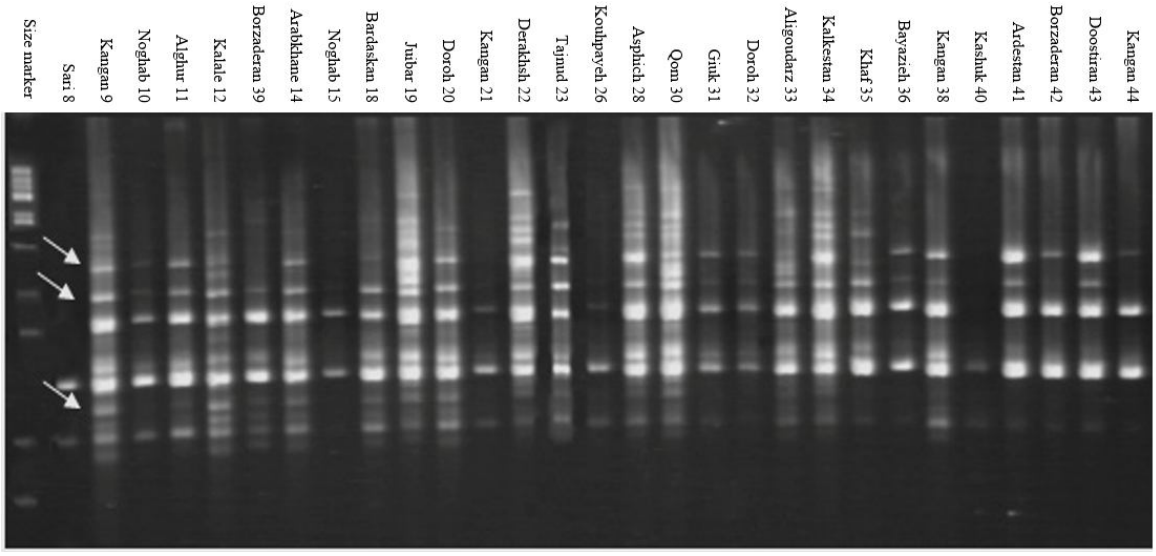
1 -Cluster analysis

2- Unweighted Paired Group Method of Arithmetic averages

3- Dice coefficient

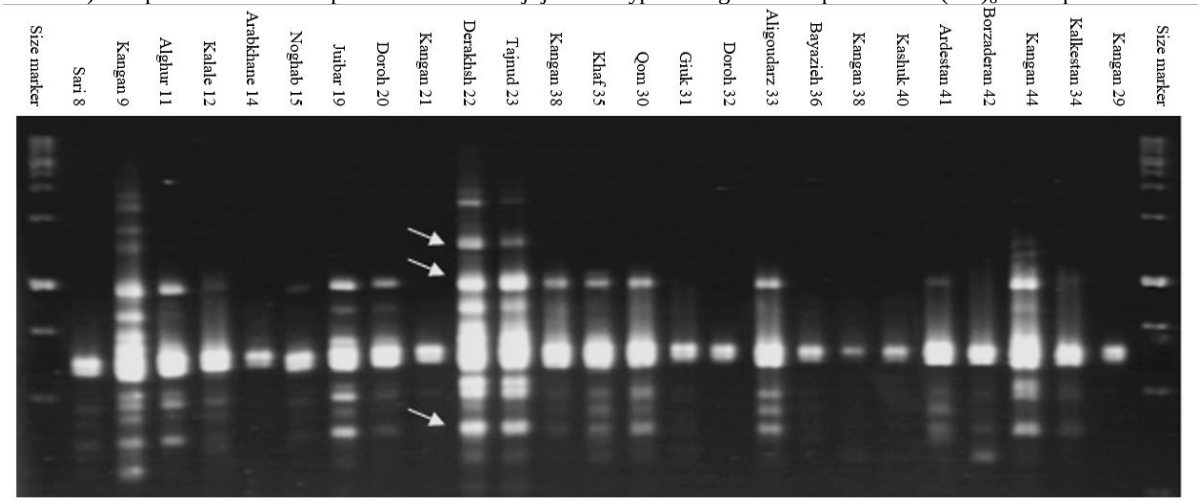
بیشتر است که سبب می‌شود تنوع در این نواحی بالاتر باشد. بلایر و همکاران (2) نیز بیان داشتند که معمولاً تکرارهای دونوکلئوتیدی که در انتهای '3 یا '5 مهار شده‌اند، چندشکلی بالاتری را آشکار می‌کنند. نمونه‌ای از باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ISSR در شکل 1نشان داده شده است.

مقایسه درصد باندهای چندشکل (83 درصد) در مطالعه حاضر با دیگر پژوهش‌های انجام گرفته در جنس *Ziziphus* نشان داد که چندشکلی بالایی با استفاده از آغازگرهای گزینش شده، ایجاد شده است. در مطالعه سینگ و همکاران (20) روی 47 ژنوتیپ از ber متعلق به گونه کشت شده از*Ziziphus mauritiana* و یک گونه وحشی از *Z. nummularia* میزان چندشکلی با استفاده از 18 آغازگر ISSR برابر 89 درصد بود. در بررسی لی و همکاران (10) نیز تعداد 10 آغازگر کارآمد از میان 70 آغازگر انتخاب شد. از میان 96 باند تکثیر شده 76 باند (79/17 درصد) چندشکلی داشتند و نتایج آن‌ها تنوع ژنتیکی بالایی را در میان 117 نمونه عناب نشان داد. بالا بودن درصد چندشکلی حاصل از شش آغازگر مورد بررسی در این تحقیق نیز نشان دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بود.



الف) الگوی تکثیرDNAی اکوتیپ‌های عناب با استفاده از آغازگرUBC855با توالی $(AC)_8YT$

A) The pattern of DNA amplification bands in jujube ecotypes using UBC855primer with $(AC)_8YT$ sequence.



ب) الگوی تکثیر باند DNAی اکوتیپ‌های عناب با استفاده از آغازگر UBC864 با توالی $(ATG)_6$

B) The pattern of DNA amplification bands in jujube ecotypes using UBC864 primer with $(ATG)_6$ sequence.

شکل 1-الگوی تکثیر نشانگر ISSR در اکوتیپ‌های عناب با استفاده از آغازگرهای الف:UBC855و ب:UBC864. چند نمونه از باندهای چندشکل با پیکان نشان داده شده است

Figure 1- The pattern of DNA amplification bands in jujube ecotypes using A: UBC855 and B: UBC864. A few examples of polymorphic bands are shown by arrows

بر اساس داده‌های بدست آمده از تمامی آغازگرها، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین 0/48 تا 0/95 متغیر بود و میانگین شباهت ژنتیکی بین تمام جفت نمونه‌ها 0/75 محاسبه گردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تنوع ژنتیکی مناسبی جهت انجام برنامه‌های اصلاحی بر روی عناب وجود دارد. در مطالعه‌ای که توسط سینگ و همکاران (20) در هند روی جنس *Ziziphus* انجام شد، میزان شباهت ژنتیکی از 43/07 تا 90/30 درصد متغیر بود. آنان نتیجه‌گیری کردند که ژنوتیپ‌های مورد استفاده، واگرا و منشعب هستند. در مطالعه حاضر جفت نمونه‌های نوغاب (noghab10) و دوستیران (dustarin43) و همچنین کلاله (kalaleh12) و درح (doroh20) بیشترین تشابه ژنتیکی را نسبت به هم (0/95) داشتند و نمونه‌های کنگان (kangan9) و برزادران (borzaderan42) در دورترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم (0/48) قرار گرفتند.

آنالیز مولکولی اکوتیپ‌های مورد بررسی

با توجه به احتمال بیشتر قرارگیری توالی‌های با تکرارهای سه نوکلئوتیدی در مناطق کد کننده ژن و حضور توالی‌های با تکرارهای دو نوکلئوتیدی در نواحی بین ژنی انتظار می‌رود توانایی آن‌ها در تفکیک اکوتیپ‌ها متفاوت باشد. لذا در این مطالعه سه آنالیز جداگانه بر اساس داده‌های حاصل از (الف)آغازگر با سه نوکلئوتید تکراری، (ب) آغازگرهای با دو نوکلئوتید تکراری و (ج) تمامی آغازگرها صورت گرفت.

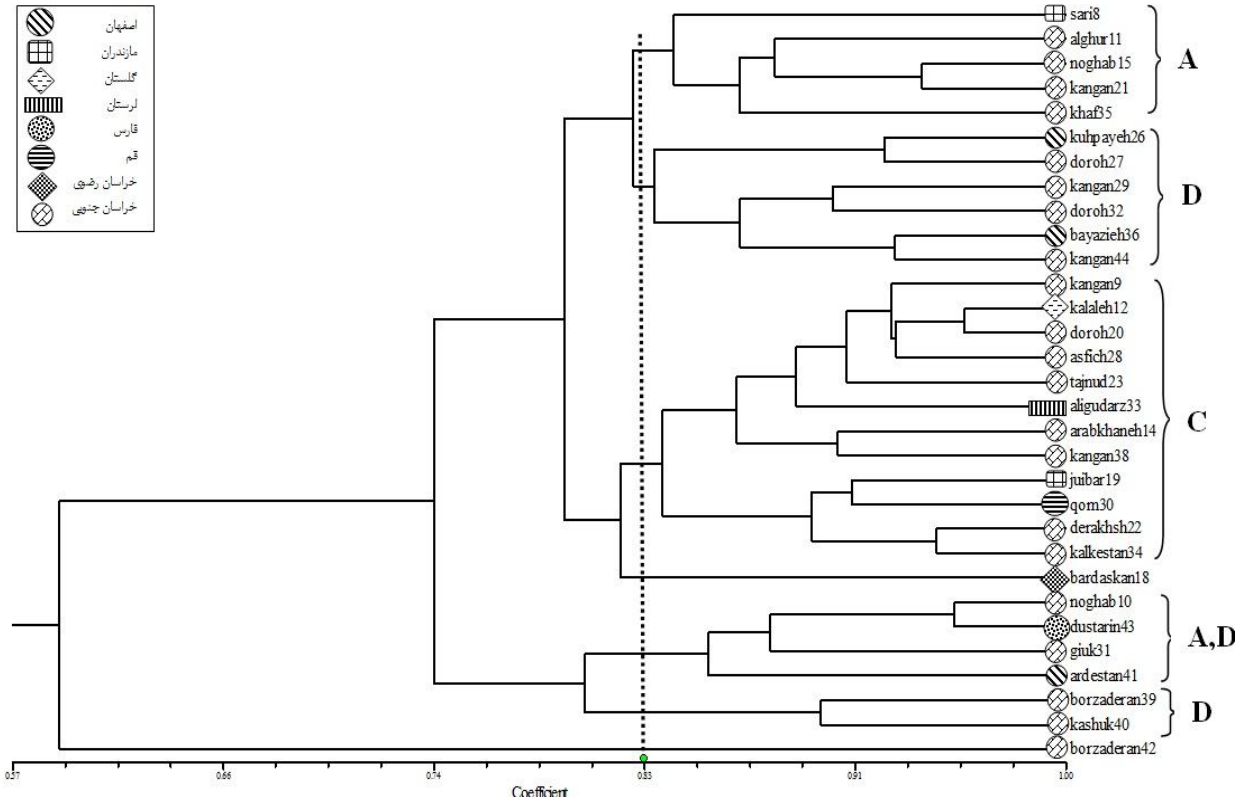
الف) تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگر با تکرارهای سه نوکلئوتیدی: پیش از بیان نتایج حاصل، لازم به ذکر است که شش اکوتیپ از مجموع 31 اکوتیپ موجود، هیچ باندی را با استفاده از این آغازگر تولید نکردند. در نتیجه آنالیز روی 25 اکوتیپ باقیمانده صورت گرفت. دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA در ضریب شباهت 0/82، چهار گروه اصلی (clade) را در بین نمونه‌های عناب مشخص کرد (شکل 2). گروه A شامل سه اکوتیپ از خراسان جنوبی و یک اکوتیپ از هر یک از استان‌های اصفهان، مازندران و لرستان بود. گروه B تنها شامل چهار اکوتیپ خراسان جنوبی و گروه C شامل چهار اکوتیپ دیگر از خراسان جنوبی و یک اکوتیپ از هر یک از استان‌های گلستان، مازندران و قم بود. در گروه D نیز هفت اکوتیپ از خراسان جنوبی به همراه یک اکوتیپ از استان اصفهان قرار گرفتند. بطور کلی می‌توان گفت نمونه‌های خراسان جنوبی در تمامی گروه‌ها حضور داشتند. همچنین نمونه‌های اصفهان در دو گروه جدا از هم و نمونه‌های مازندران نیز در دو دسته دور از هم مشاهده شدند. گروه‌های چهارگانه قابل تفکیک در این آنالیز که احتمال می‌رود مربوط به بخش‌های کدکننده ژنی باشند با حروف A، B، C و D در شکل 2 نشان داده شده‌اند. به نظر می‌رسد آنچه از اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در دسته‌های مختلف طبقه‌بندی شده مشاهده می‌شود با اکوتیپ‌های سایر استان‌ها قرابت ژنتیکی مناسبی داشته است. این امر وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در خراسان جنوبی برای ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه را تأیید کرد.

ب) تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگرهای با تکرارهای دو نوکلئوتیدی: نتایج تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و با استفاده از پنج آغازگر با تکرارهای دونوکلئوتیدی نشان داد که در ضریب شباهت 0/82 می توان پنج گروه اصلی را مشخص کرد (شکل 3). جهت میسر شدن امکان مقایسه میان اشکال نامگذاری دسته‌ها با توجه به گروه‌بندی اکوتیپ‌ها در شکل 2 صورت گرفته است. دندروگرام حاصل از آغازگرهای با تکرارهای دو نوکلئوتیدی نیز حاکی از پراکنش اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در تمامی دسته‌ها بوده و نیز فاصله زیاد اکوتیپ‌های مازندران از یکدیگر و نیز اکوتیپ‌های اصفهان از هم در این گروه‌بندی مشاهده شد که از این لحاظ با نتایج حاصل از آغازگر $(ATG)_6$ هماهنگی نشان داد.

ج) تجزیه خوشه‌ای بر اساس تمامی آغازگرها: نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس شباهت ژنتیکی به روش UPGMA حاکی از وجود هفت گروه اصلی در ضریب شباهت 0/85 است (شکل 4). مطابق شکل گروه‌هایی که بیشترین تشابه را با دسته‌های بدست آمده از دندروگرام شکل 2 دارند، با حروف یکسان نشان داده شده‌اند. البته اکوتیپ‌های متعلق به دسته A در سایر گروه‌ها پراکنده شده‌اند و برخی اکوتیپ‌ها نیز به تنهایی در یک گروه قرار گرفته‌اند. نظری دقیق‌تر به شکل 4 نشان می‌دهد که اعضای مربوط به استان خراسان جنوبی در همه گروه‌ها یافت می‌شوند و در یک گروه جداگانه قرار نگرفته‌اند، بطوری‌که حتی نمونه‌های متعدد ناحیه کنگان سربیشه (خراسان جنوبی) در چهار دسته مجزا قرار دارند. این امر حاکی از تنوع قابل ملاحظه عناب حتی در منطقه محدودی نظیر سربیشه خراسان جنوبی است.

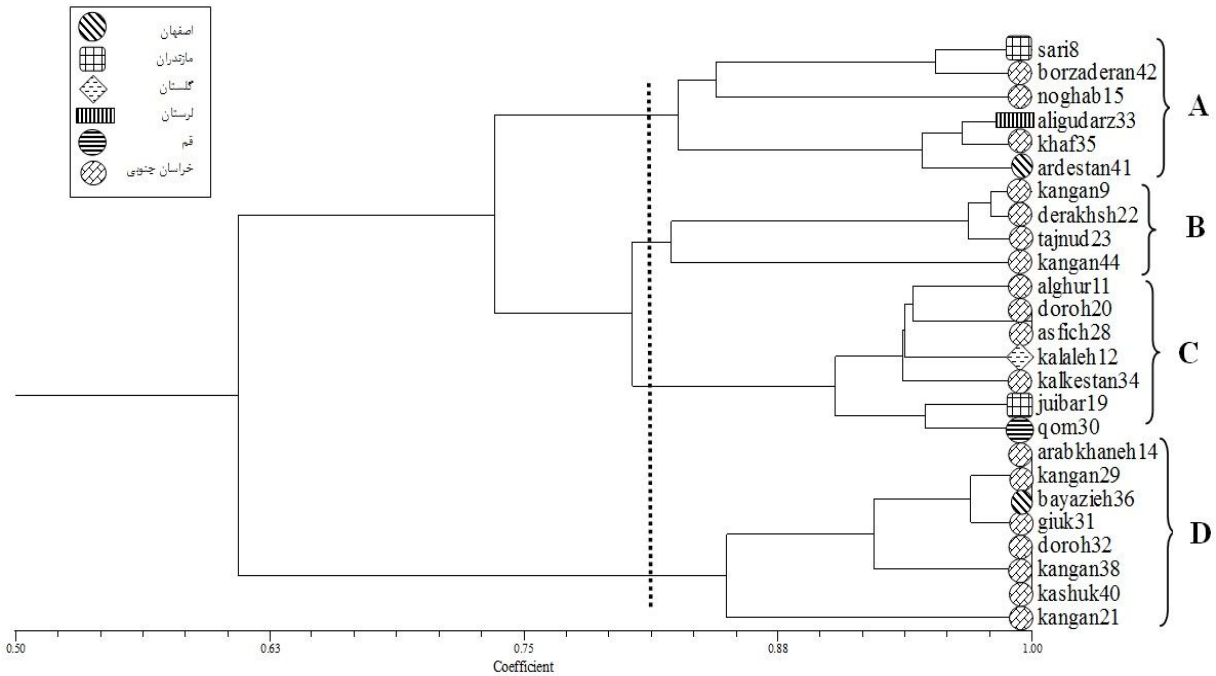
مقایسه نتایج آغازگرهای دوتایی و سه‌تایی ISSR با یکدیگر دسته‌بندی مناسب‌تر اکوتیپ‌ها را در گروه‌های منفک‌شده بر اساس آغازگر سه‌تایی بهتر از دسته‌بندی آغازگرهای دوتایی نشان می‌دهد. این امر تا حدودی حاکی از دقت بهتر این نوع آغازگر در تفکیک نمونه‌هاست که احتمالاً به ارتباط بیشتر این نوع توالی‌های SSR به نواحی کدکننده مربوط می‌شود. به همین دلیل توجه به نتایج تفکیک و دسته‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس آغازگر $(ATG)_6$ به عنوان مبنای تقسیم‌بندی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

بطور کلی مقایسه تجزیه خوشه‌ای حاصل از سه آنالیز انجام شده بر اساس آغازگرهای مختلف نشان داد که در تمام گروه‌ها، اکوتیپ‌های متعلق به خراسان جنوبی حضور دارند.



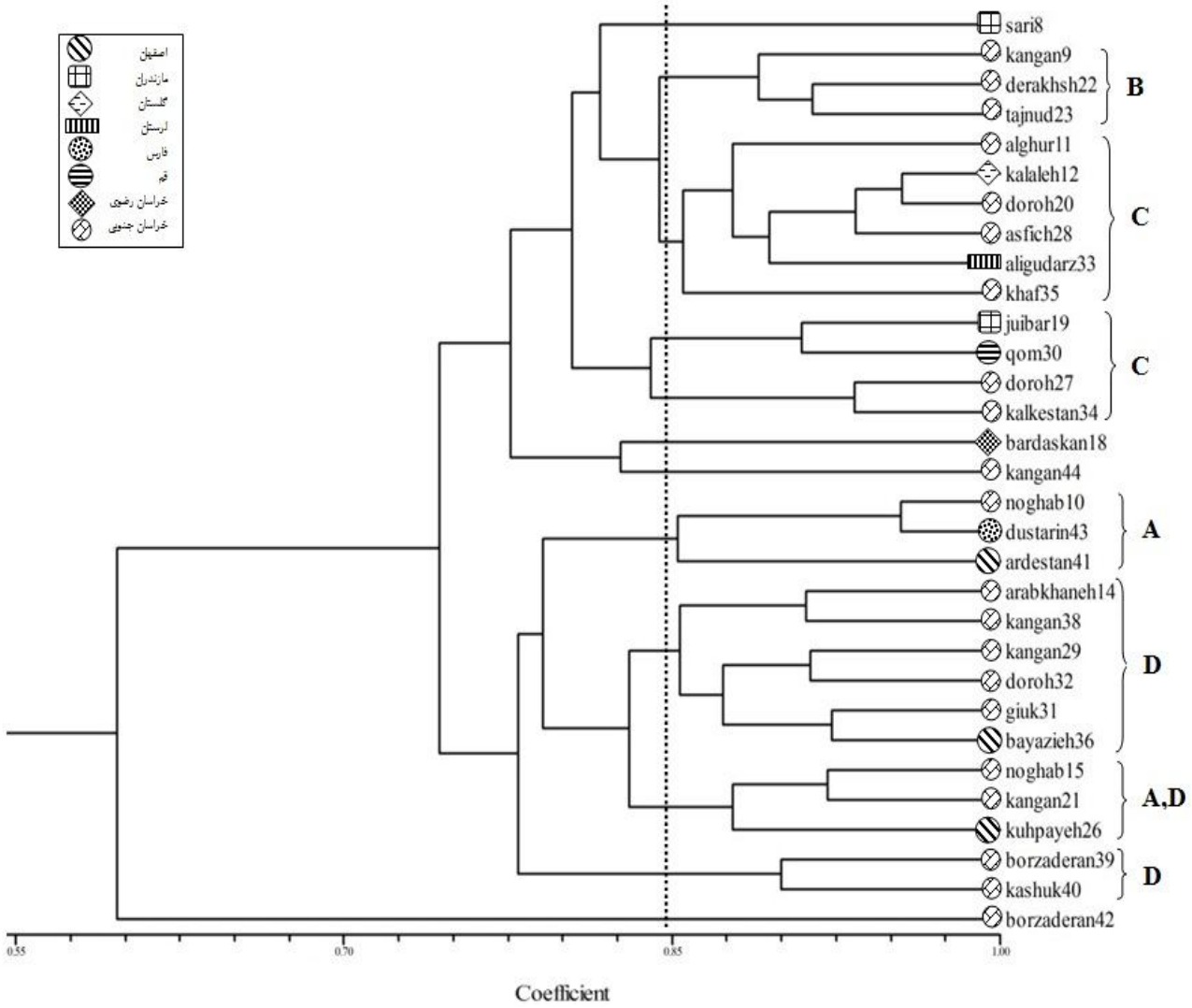
شکل 2- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای اکوتیپ‌های عناب ایران بر اساس آغازگر $(ATG)_6$

Figure 2-UPGMA dendrogram based on $(ATG)_6$ primer for Iranian jujube ecotypes



شکل 3- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای اکوتیپ‌های عناب ایران بر اساس آغازگرهای با تکرارهای دوتایی

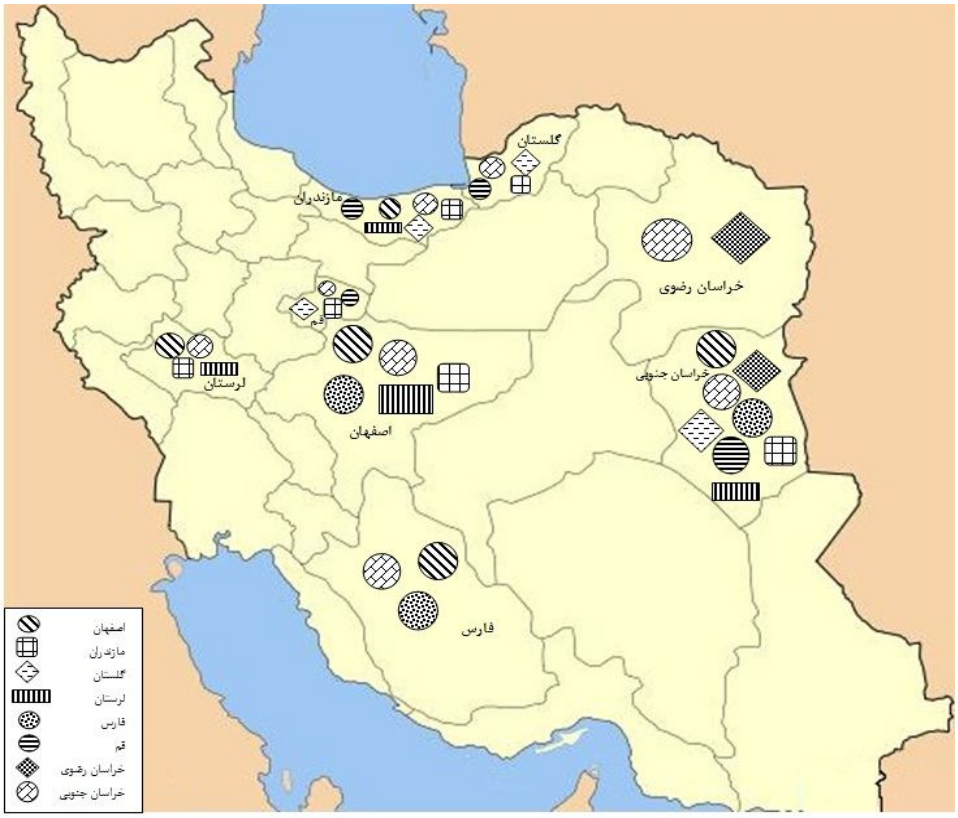
Figure 3-UPGMA dendrogram based on primers with double repeatfor Iranian jujube ecotypes



شکل 4- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای 31 اکوتیپ عناب ایران بر اساس 6 آغازگر آزمون شده

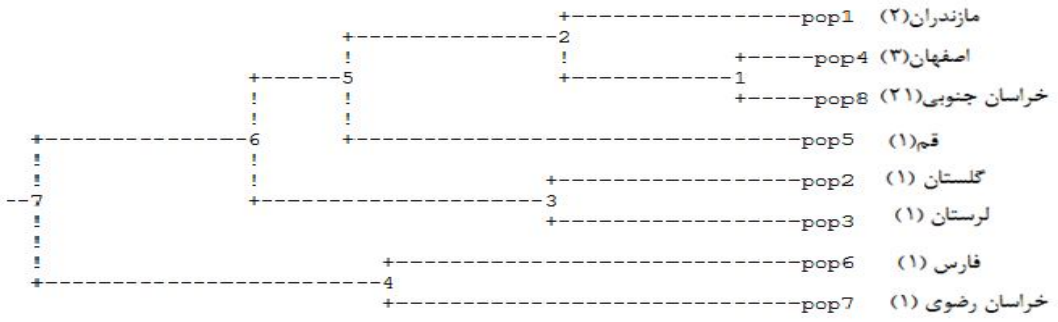
Figure 4-UPGMA dendrogram based on six used primers for Iranian jujube ecotypes

نتایج حاکیست تنوع کل نمونه‌های مناطق مختلف، تقریباً در تنوع ناحیه خراسان جنوبی خلاصه شده است. با توجه به اینکه خراسان جنوبی از دیرباز محل کشت این گیاه دارویی بوده، احتمالاً یکی از مراکز و هسته‌های مهم تنوع عناب، این منطقه به حساب می‌آید (5). خاکدامن و همکاران (7) نیز با بررسی‌های مورفولوژیک روی این گیاه، به این نتیجه رسیدند که گروه خراسانی یکی از مبادی اصلی و مرکز تنوع در میان اکوتیپ‌هاست. عباسی و همکاران (1) نیز در تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های عناب جمع‌آوری شده در کلکسیون سربیشه با استفاده از نشانگر RAPD نشان دادند که گروه خراسانی یکی از منشأهای اصلی عناب در ایران است و از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشد. بعلاوه از آنجا که نمونه‌های استان اصفهان در هر سه دندروگرام ترسیم شده در گروه‌های جدا از هم قرار گرفته‌اند، می‌توان گفت که این استان نیز از تنوع ژنتیکی مناسبی برخوردار است. این فرضیه در مورد اکوتیپ‌های استان مازندران نیز صادق است زیرا نمونه‌های این استان نیز در دو دسته مجزا قرار گرفتند. نتایج این پژوهش با نتایج شاه‌حسینی و همکاران (19) که از 15 آغازگر AFLP برای بررسی ژنتیکی 29 ژنوتیپ عناب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور استفاده نمودند، تا حدود زیادی مطابقت داشت. آنها نیز نشان دادند که سه گروه خراسان، اصفهان و قم بطور کاملا مجزا تفکیک شده‌اند و می‌توان (این مناطق) نواحی مرکزی را با اطمینان بالا به عنوان یکی از خاستگاه‌های عناب معرفی نمود.در شکل 5 نحوه پراکنش اکوتیپ‌های عناب در هشت استان کشور با توجه به آنچه در نتایج آنالیز تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های مختلف بدست آمده، مشخص شده است. مطابق این شکل اهمیت مراکز هسته‌ای تنوع در استان‌های ذکر شده، نشان داده شده است.



شکل 5- نحوه پراکنش اکوتیپ‌های عناب در هشت منطقه جغرافیایی ایران. این شکل بر اساس حضور اکوتیپ‌های مناطق مختلف در دسته‌های جداگانه مطابق شکل‌های 2 و 4 ترسیم شده است. اکوتیپ‌های یک استان خاص که بااکوتیپ‌های دیگر استان‌ها در یک دسته مشترک قرار گرفته‌اند، در هر یک از مناطق هشت‌گانه در کنار هم نشان داده شده‌اند

Figure 5- Distribution of jujube ecotypes into eight geographic regions of Iran. This figure is drawn based on ecotypes of different areas in separated categories according to Figures 2 and 4. Ecotypes of a particular province were with other province ecotypes in a common category have been shown togetherin each of the eight regions



شکل 6-دندروگرام حاصل از نرم‌افزار POPGEN3.2 برای هشت جمعیت جغرافیایی در کلکسیون عناب ایرانبر اساس داده‌های بدست آمده از تمامی آغازگرها

Figure 6- Dendrogram of POPGENe.3.2 software for eight geographic populations in jujube collection based on the data from all Primers

آنالیز مولکولی جمعیت‌های عناب ایران: به منظور محاسبه میزان تنوع ژنتیکی بین 8 جمعیت جغرافیایی از اکوتیپ‌های عناب ایران، ماتریس شباهت با استفاده از ضریب نی (13) و توسط نرم‌افزار POPGEN3.2 تعیین شد و دندروگرام حاصل از آن ترسیم

گردید (شکل 6). بر اساس داده‌های بدست آمده از تمامی آغازگرها، تشابه ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بین 0/47 تا 0/95 متغیر بود. دو جمعیت اصفهان و خراسان جنوبی کمترین اختلاف و جمعیت‌های اصفهان و خراسان رضوی بیشترین اختلاف را نشان دادند. این امر حاکی از تنوع ژنتیکی نزدیک جمعیت اصفهان به تنوع موجود در خراسان جنوبی است و ظاهراً زمینه ژنتیکی بررسی شده در آن‌ها تفاوت چندانی از لحاظ ایجاد چندشکلی با کمک نشانگر کارآمد ISSR نداشته است. این در حالی است که به نظر می‌رسد اکوتیپ‌های استان فارس و باریکه شمالی کشور به دلیل اختلافات ژنتیکی جدی‌تر، هسته تنوع متفاوت‌تری را نسبت به تنوع نسبتاً گسترده مشاهده شده در خراسان جنوبی داشته‌اند.

منابع

1- Abbasi S., Malekzadeh Shafaroudi S., Ghooth K., and Shahriari F. 2012. Analysis of genetic diversity in Iranian Onnab ecotypes (*Ziziphus* spp.) using RAPD molecular Marker. Iranian Journal of Field Crops Research, 10(3):583-590. (in Persian)

2- Blair M.W., Panaud O., and McCouch S.R. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). Theoretical and Applied Genetics, 98: 780–792.

3- 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.

4-Goulao L. and Oliveira C.M. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (Malus x domestica Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica, 122:81-89.

5- Ghouth K. 2010. Jujube Forgotten Fruit. Agricultural Organization of Southern Khorasan Province. (in Persian)

6- Ghouth K., and Malekzadeh Shafaroudi S. 2011. Identification Book of Iranian Collection of Jujube Ecotypes. Agricultural Organization of Southern Khorasan Province. (in Persian)

7- Khakdaman H., Pourmeidani A., and Adnani M. 2007. Study of genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) ecotyps. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14(4):202-214. (In Persian with English abstract)

8- Koohi dehkordi M., Rahimmalek M., Sayed Tabatabae B., Baninasab B., and Mobli M. 2006. Assessment of Genetic Relationship among some of the Iranian and Foreign Olive Cultivars using ISSR Markers. Journal of Horticultural Science and Technology, 7(2):93-102. (in Persian)

9- Kumar P., Gupta V.K., Misra A.K., Modi D. R., and Pandey B. K. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. Plant Omics Journal, 2:141-162.

10- 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

11-Mondini L., Noorani A., and Mario Pagnotta A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity, 1:19-35.

12-Noroozi S., Baghizadeh A., and Javaran M. 2009. The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. Biological Diversity and Conservation, 2(2):50-56

13-Nei M., and Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the Natural Academy of Science of the U.S.A, 76:5269-5273

14-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

15 -Okun D.O., Kenya E.U., Oballa P.O., Odee D.W., and Muluvi, G.M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. African Journal of Biotechnolog, 7:2119–2123

16- Rao L.S., Usha-Rani P., Deshmukh P.S., Kumar P.A., and Panguluri S.K. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetic Resources and Crop Evolution, 54:1235–1244.

17- Reddy M.P., Sarla N., and Siddiq E.A.2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128:9–17.

18- Rohlf F.J. 1997. NTSYS-pc numerical taxonomy andmultivariate analysis system, *version 2.0*. Exeter Publications, N.Y.

19- Shahhoseini1 R., Babaei A., Kazemi M., and Omidbaigi R. 2012. A study on genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) genotypes using molecular AFLP marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(1):55-68

20-Sing 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.
21-Singh A.K., Singh R., and Singh N.K. 2009. Comparative evaluation of genetic relationships among ber (*Ziziphus* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 69(1): 106-118.
22-Yeh F.C., Yang R-C., Boyle T.B.J., Ye Z-H., and Mao J.X. 1999. POPGENE the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
23- Zargari A. 1992. Medical Plants. First volume. University of Tehran Press. (in Persian)
24- 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.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 425-437
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 3، پاییز 1396، ص. 437-425
شاپا: 2008 - 4730

Evaluation of Genetic Diversity in Collection from Iranian Jujube Ecotypes (*Ziziphus* spp.) using ISSR-molecular Marker

H. Shayesteh[1]- S. Malekzadeh Shafaroudi[2]*- K. Ghouth[3] - F. Shahriari[4]

Received: 19-11-2013
Accepted: 07-03-2017

Introduction: Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) as a valuable medicinal plant and adapted to different climatic conditions is widespread in many parts of Iran. Nowadays, beside the export of its fruit, jujube is also used as an herbal medicine to treat the diseases, so it has a high economic value. Study on genetic diversity is the first step to identify and preservation of germplasm. It is also considered as the basic principles of plant breeding. DNA markers seem to be the best way in determination of the genetic diversity. Inter simple sequence repeats (ISSR) markers are highly polymorphic and combine most benefits of Simple Sequence Repeats (SSRs) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) to the generality of random amplified polymorphic DNA (RAPD).

Materials and Methods: In order to study of the genetic diversity among 31 ecotypes collected from eight Jujube-rich provinces, including South Khorasan, Razavi Khorasan, Mazandaran, Golestan, Qom, Isfahan, Lorestan and Fars. Genomic DNA was extracted by CTAB method and polymerase chain reaction (PCR) was performed with 13 ISSR primers in which six most efficient primers were selected. Cluster analysis based on Dice similarity coefficient and Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) was carried out and POPGENe.3.2 software was used to determine the similarity of populations with each other.

Results and Discussion: 84 loci were amplified and 70 of them (83%) revealed a proper polymorphism with the size between 200 and 2000 base pair. The average number of amplified and polymorphic bands per primer was 14 and 11.6 respectively. Primers with di-nucleotide repeats produced more polymorphic bands than ones with tri-nucleotide repeats. It seems that this is due to a higher frequency of sequences containing di-nucleotide repeats in intergenic regions and higher possibility of mutation revealed in more diversity in comparison to gene coding regions. Anchored primers with 1 or 2 nucleotides at the 5' end make sure annealing only to the ends of SSRs in template DNA, so avoiding internal priming and smear formation. In addition, the anchor lets only a subset of the microsatellites to serve as priming sites. Primers $(AC)_8YT$ and $(GA)_8A$ with the higher percentage of polymorphism is recommended for further analysis. According to the cluster analysis, the ecotypes could be classified into seven main groups at the 0.85 level of genetic similarity. The most genetic similarity (0.95) was observed between ecotypes from Kalaleh and Doroh and also Noghab and Dustiran and the least genetic similarity (0.48) observed between Kangan and Borzaderan. POPGENe.3.2 software data indicated that populations of Isfahan and South Khorasan had the slightest difference while populations of Isfahan and Razavi Khorasan showed the most difference.

Conclusions: In general results demonstrated that the total diversity of jujube ecotypes in Iran is summarized in the area of South Khorasan province. Given data showed that South Khorasan has been an original place of cultivation of this medicinal plant, this area could be considered as one of the important centers of jujube diversity. In addition, significant levels of diversity were observed among ecotypes belonging to Isfahan and Mazandaran provinces.

Keywords: Genetic diversity, ISSR marker, *Zizyphus jujuba*

1, 2 and 4- Ph.D. Student, Associate Professor and Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: malekzadeh-s@um.ac.ir)
3- Master of Science in Agriculture, Jahad-e-Keshavarzi Institute of Southern Khorasan