

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاه دارویی عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.) با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP

رضا شاه‌حسینی^۱، علیرضا بابائی^{۲*}، مهربانو کاظمی^۳ و رضا امیدبیگی^۴

۱- کارشناس ارشد، علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پست الکترونیک: arbabaei@modares.ac.ir

۳- کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۴- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱

چکیده

عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.) یکی از گیاهان ارزشمند دارویی می‌باشد که به دلیل برخورداری از موسیلاژ، انواع ویتامین، پکتین، آلکالوئید، ترکیبات فنلی و اسیدهای چرب اهمیت زیادی در صنایع دارویی دارد. این گیاه علاوه بر استفاده دارویی دارای جنبه زینتی نیز بوده و در جلوگیری از فرسایش خاک و بیابان‌زدایی کاربرد وسیعی دارد. این پژوهش به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های عناب با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP انجام شد. جمعیتی شامل ۲۹ ژنوتیپ عناب از نقاط مختلف کشور انتخاب گردید و توسط ۱۵ جفت آغازگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای EXCEL و NTSYS استفاده شد. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جاکارد، تجزیه خوشه‌ای با الگوریتم UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی انجام شد. ۱۲ جفت از ۱۵ جفت آغازگر AFLP، دارای چندشکلی بودند. این آغازگرها در مجموع ۶۸۹ باند تولید کردند که ۴۴ عدد از آنها چندشکلی نشان دادند. براساس نتایج حاصل از دندروگرام، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به هشت گروه مجزا در سطح تشابه ۰/۷۵ تقسیم شدند. نشانگر AFLP به‌طور مشخص توانست سه گروه قم، اصفهان و خراسان را تفکیک نماید. دقت این تفکیک در حدی بود که گروه خراسانی به صورت کاملاً خالص و مجزا از سایر گروه‌ها قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز تأیید شد. دو گروه قم و اصفهان به صورت مجزا تفکیک شدند؛ بنابراین این مناطق (نواحی مرکزی) را می‌توان با اطمینان بالایی به‌عنوان یکی از خاستگاه‌های عناب معرفی نمود. به‌طور کلی کارایی بالای این نشانگر در تفکیک و جداسازی ژنوتیپ‌ها قابل ملاحظه است.

واژه‌های کلیدی: عناب، تنوع ژنتیکی، نشانگر AFLP.

مقدمه

در برنامه‌های اصلاحی گیاهان و به منظور شناسایی و تشخیص قرابت‌های ژنتیکی ارقام، ارزیابی بسیاری از تفاوت‌ها به دلیل عدم تظاهر مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، تنها از طریق بررسی DNA قابل ثبت هستند و به همین دلیل طی چند دهه گذشته نشانگرهای مبتنی بر DNA توجه محققان را برای بررسی تنوع ژنتیکی موجودات مختلف، به خود جلب کرده است. از تعدادی از این نشانگرها برای شناسایی ارقام و جمعیت‌های گیاه دارویی عناب استفاده شده است. در بین تمام تکنیک‌ها، نشانگرهای (Amplified Fragment Length Polymorphism) AFLP به دلیل داشتن مزایایی مانند چندشکلی بالا، سرعت، دقت و تکرارپذیری بالا؛ به‌طور مؤثری برای شناسایی ژرمپلاسم عناب به کار رفته‌اند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیشتر نشانگرهای مولکولی مورد استفاده جهت شناسایی ارقام و یا گونه‌های جنس عناب، نشانگرهای RAPD و AFLP بوده است (Azam-ali *et al.*, 2006; Anonymous, 2008). طی پنجاه سال اخیر در چین محققان با اعمال روش‌های مختلف به‌زرعی و به‌نژادی موفق به اصلاح و انتخاب ۴۰۰ رقم از بین بیش از ۵۳۰ رقم عناب شده‌اند. از بین روش‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی در این زمینه، استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و AFLP به‌طور مؤثری سودمند واقع شده‌اند (Wang *et al.*, 2008). نشانگر AFLP ترکیبی از روش‌های RFLP و PCR است که قطعات بُرش‌یافته توسط آنزیم‌های بُرشی را به صورت تصادفی تکثیر می‌کند. در این روش پس از اتصال دنباله‌هایی (Adaptor) به انتهای قطعات بُرش‌خورده، به تکثیر آغازگرهایی اقدام می‌گردد که همولوگ با دنباله‌های مذکور می‌باشند. افزودن نوکلئوتیدهای دلخواه به انتهای ۳' آغازگرها سبب انتخابی بودن تکثیر می‌شود که

علاوه‌بر انتخابی کردن آغازگر، باعث کاهش پیچیدگی فرآورده‌های حاصل نیز می‌گردد (Vos *et al.*, 1995).

در مطالعات انجام‌شده به منظور بررسی تنوع و قرابت ژرمپلاسم عناب، نتایج آزمایش Peng و همکاران (۲۰۰۲) که بر روی شناسایی ۱۴ رقم عناب با استفاده از نشانگر RAPD انجام شد، نشان داد که از ۴۲۹ بانده دست‌آمده، تنها ۲۱۴ عدد (۴۹/۸۸ درصد) آنها دارای چندشکلی بودند و براین اساس تعداد ارقام باید کاهش یابد. طی پژوهشی، Li و همکاران (۲۰۰۸a) به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی عناب (رقم Huizao) که یکی از معروف‌ترین ارقام کشت‌شده عناب در استان هنان چین است، از نشانگر ISSR استفاده کردند. بدین منظور تعداد ۱۱۷ نمونه برگگی از گیاهان منطقه پراکنش این رقم جمع‌آوری شد. برای انجام مرحله PCR از ۷۰ آغازگر مورد بررسی، ده عدد از آنها به‌عنوان کارآمدترین آغازگرها انتخاب شدند. در مجموع از ۹۶ الگوی بانده تولیدشده، ۷۶ عدد (۷۹/۱۷ درصد) از آنها دارای چندشکلی بودند. در نتایج این بررسی هیچ ارتباط معنی‌داری از لحاظ توزیع جغرافیایی و سطح ژنی بین افراد مشاهده نشد. در پژوهشی دیگر، Li و همکاران (۲۰۰۸b) اثبات کردند که نشانگر SRAP به‌عنوان ابزاری کارا و دارای قابلیت تکرارپذیری بالا می‌تواند در شناسایی، تعیین روابط ژنتیکی و انگشت‌نگاری اکوتیپ‌ها و ارقام عناب مورد استفاده قرار گیرد. همچنین در این مطالعه روش بهینه PCR در استفاده از این نشانگر تشریح شد.

طی پژوهش دیگری ۵۸ رقم و ۲ گونه وحشی عناب (مجموعاً ۶۰ ژنوتیپ) به منظور تعیین ارتباط ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای AFLP انتخاب شدند. از ۹ ترکیب از ۴۰ آغازگر مورد استفاده بهره‌گیری شد. آغازگرهای مورد استفاده، در مجموع ۱۱۱۸ بانده قابل امتیازدهی در محدوده

گرفتند. این نشانگر با بازده بالا توانست نابسامانی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را سامان‌دهی نماید و به‌عنوان یک نشانگر توانمند در شناسایی و معرفی ژنوتیپ‌های این گیاه به‌کار رود. در آزمایشی ارزیابی روابط ژنتیکی ۲۶ رقم از عناب در جنوب چین به منظور توسعه ارقام برتر، با استفاده از نشانگر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. هشت ترکیب آغازگر در این آزمایش استفاده شد. از ۸۸۶ باند، تعداد ۸۱۷ عدد (۹۲/۲ درصد) از آنها دارای چندشکلی بودند. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای ارقام در دو گروه قرار گرفتند. ارقام تازه‌خوری دارای ارتباط ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر بودند. ارقام Sucuizao و Kongfusucuizao بسیار نزدیک به یکدیگر بودند. رقم Jidanzao که از دو استان هنان و هونان جمع‌آوری شده بود، فاصله ژنتیکی زیادی نشان دادند و به‌عنوان دو رقم مجزا معرفی شدند (Wen & He., 2007).

با وجود ذخایر ژنتیکی بسیار عظیم گیاه دارویی عناب و پراکنش گسترده آن در سراسر ایران (Khakdaman et al., 2007)، تاکنون در مورد تنوع ژنوتیپ‌های بومی این گیاه ارزشمند و استفاده از آنها پژوهش‌های اندکی، خصوصاً با استفاده از تکنیک‌های مولکولی برتر انجام شده است. هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP، تفکیک و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و تعیین روابط بین آنها به منظور اهداف مختلف اصلاحی بوده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: جهت انجام این پژوهش، جمعیتی شامل ۲۹ ژنوتیپ عناب از نقاط مختلف کشور انتخاب گردید. محل جمع‌آوری ژنوتیپ‌های عناب مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

۱۰۰ تا ۴۵۰ جفت باز ایجاد کردند. از این تعداد باند، ۱۰۶۶ باند (۹۵/۳۵ درصد) چندشکلی نشان دادند. نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس تشابه ژنتیکی به روش UPGMA حاکی از وجود ۴ گروه اصلی با ضریب تشابه ۰/۴۷ و ۰/۸۷ (به‌ترتیب نی و لی) بود. دو گونه وحشی به طور متفاوت و مجزا از سایر ارقام در خوشه یک قرار گرفتند که با توجه به فاصله ژنتیکی ایجادشده به‌عنوان دو گونه تفکیک شدند. ۵۷ رقم عناب به دو دسته عمده با ضرایب تشابه ۰/۷۰ دسته‌بندی شدند و دارای ارتباط ژنتیکی نزدیک به یکدیگر بودند. بین ارقام تازه، خشک و زیتتی در سطح مولکولی با یکدیگر اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. ارقام Sucuizao و Kongfusucuizao دارای قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک به هم بودند (Wen et al., 2008).

در یک پژوهش، Lu و همکاران (۲۰۰۵) به منظور بررسی روابط بین هیبریدهای عناب از نشانگر AFLP استفاده کردند. در این تحقیق از ۵۶ ژنوتیپ که حاصل از گرده‌افشانی آزاد بین ارقام مختلف بودند، استفاده شد. از ۸۱ ترکیب آغازگری مورد استفاده، ۱۲ جفت از آنها انتخاب شدند. از ۵۱۷ باند، تعداد ۳۷۶ عدد از آنها دارای چندشکلی بودند. در چندین هیبرید مورد مطالعه تنها تعدادی نشانگر خاص مشاهده شد و این نشانگر به خوبی توانست ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را تفکیک نماید. طی مطالعه‌ای Wang و همکاران (۲۰۰۷) به منظور یافتن روابط ژنتیکی بین ۲۸ رقم عناب، از بین ۳۲ ترکیب آغازگر ۵ جفت آغازگر را که غنی از چندشکلی و دارای کیفیت بالاتر بودند، انتخاب نمودند. در نهایت آغازگرها ۲۱۳ باند تولید کردند که ۱۷۲ عدد از آنها از چندشکلی برخوردار بودند، به‌طوری که درصد چندشکلی ۷۶/۱۶ به‌دست آمد. پس از امتیازدهی باندها و تجزیه خوشه‌ای، این ارقام در سه گروه مجزا جای

جدول ۱- شماره و محل جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مختلف عناب

شماره	نام ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	شماره	نام ژنوتیپ	محل جمع‌آوری
۱	هموارلکها (قم)	بخش مرکزی، جنوب قم، حاشیه جاده قدیم اصفهان	۱۶	اردستان (اصفهان)	شهر اردستان، ناحیه عناب‌خیز
۲	قاضی علیا (قم)	بخش سلفچگان، روستای قاضی علیا	۱۷	نطنز (اصفهان)	شهر نطنز، مرکز عناب
۳	مارون (قم)	بخش جعفرآباد، دوراهی دولت‌آباد-سلفچگان، توده مارون	۱۸	بیاضیه (اصفهان)	شهر بیاضیه، توده رایج
۴	کاسوا (قم)	بخش خلجستان، قاهان، روستای کاسوا	۱۹	دشت بیاض (خراسان)	بخش نیمبلوک- شهرستان دشت بیاض
۵	کلاغ‌نشین ۱ (قم)	بخش جعفرآباد، روستای کلاغ‌نشین، توده بزرگ	۲۰	آلقو (بیرجند)	بیرجند، بخش مرکزی، روستای آلقو
۶	کلاغ‌نشین ۲ (قم)	بخش جعفرآباد، روستای کلاغ‌نشین، توده کوچک	۲۱	گلیان (بیرجند)	بیرجند، بخش مرکزی، روستای گلیان
۷	کم‌چنار (قم)	بخش خلجستان، قاهان، مرز تفرش، روستای کم‌چنار	۲۲	نودان ۱ (فارس)	دشت ارژن، منطقه دوسیران، نودان، توده متراکم
۸	دولت‌آباد (قم)	بخش جعفرآباد، مرز سلفچگان، روستای دولت‌آباد	۲۳	نودان ۲ (فارس)	دشت ارژن، منطقه دوسیران، نودان، توده پراکنده
۹	نهالستان (قم)	بخش مرکزی، جنت‌آباد، نهالستان عناب	۲۴	کلاله (گلستان)	شهرستان کلاله، توده خودرو
۱۰	شهرضا (اصفهان)	شهر شهرضا، دامنه عناب	۲۵	مقام (ساری)	ساری، بخش مرکزی، روستای مقام، قبرستان عمومی
۱۱	نیاسر (کاشان)	کاشان، پارک نیاسر	۲۶	حمیدآباد (ساری)	ساری، بخش مرکزی، روستای حمیدآباد
۱۲	کوهپایه ۱ (اصفهان)	شهرستان نائین، شهر کوهپایه، توده بالا	۲۷	بهشهر (مازندران)	شهر بهشهر، توده کناررود
۱۳	کوهپایه ۲ (اصفهان)	شهرستان نائین، شهر کوهپایه، توده پائین	۲۸	لاریم (مازندران)	شهرستان جویبار، بخش گیلخواران، شهر لاریم
۱۴	پوده ۱ (اصفهان)	شهرستان دهاقان، بخش مرکزی، شهر پوده، توده دامنه	۲۹	دهنه لاریم (مازندران)	شهرستان جویبار، بخش گیلخواران، شهر لاریم، دهنه سیاهرود
۱۵	پوده ۲ (اصفهان)	شهرستان دهاقان، بخش مرکزی، شهر پوده، توده دشت			

بود. این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم و به مدت ۱۲ ساعت به طول انجامید.

۲- اتصال دنباله (Ligation): اجزاء حجمی واکنش ۲۵ میکرولیتری برای اتصال دنباله به هر نمونه شامل ۲۰ میکرولیتر DNA هضم‌شده، یک میکرولیتر آداپتور *EcoRI* (۵ پیکومول)، یک میکرولیتر آداپتور *MseI* (۵۰ پیکومول)، یک میکرولیتر آنزیم لیگاز T4 (*T4 DNA Ligase*) (Enzyme)، یک میکرولیتر بافر (*T4 DNA Ligase* Buffer) (۱۰ واحد در میکرولیتر) و یک میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم انجام شد.

۳- پیش‌تکثیر (Pre-amplification): قبل از انجام این مرحله، DNA حاصل از مرحله هضم و اتصال به نسبت ۳ به ۱ رقیق شدند و به میزان ۳/۷۵ میکرولیتر در میکروتیوپ‌های جدید توزیع گردیدند. در این مرحله آغازگرهای بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳' آغازگر، E00 (3'-GACTGCGTACCAATTC-5') و M00 (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') استفاده شد. اجزاء حجمی واکنش ۲۵ میکرولیتری جهت تکثیر مقدماتی شامل ۳/۷۵ میکرولیتر DNA حاصل از مرحله اتصال، یک میکرولیتر آغازگر E00 (۱۰ پیکومول)، یک میکرولیتر آغازگر M00 (۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ برابر)، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵ میلی‌مول)، ۱/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPS) (۴۰ میلی‌مول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز (*Taq Polymerase*) (یک واحد در میکرولیتر) و ۱۳/۰۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اولیه شامل ۲۰ چرخه به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱۲۰ ثانیه) بود. جهت حصول

استخراج DNA: پس از بهینه‌سازی، استخراج DNA ژنومی ژنوتیپ‌ها بر مبنای روش Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳)، با مقداری تغییرات صورت گرفت. در این روش به‌ازاء هر ۰/۱ گرم بافت برگی پودر شده با ازت مایع، ۴۵۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB ۱۰ درصد، مقدار ۵ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) استفاده شد. همچنین به‌منظور رسوب ماده ژنتیکی و شستشوی آن، به‌ترتیب از ایزوپروپانول سرد و اتانول ۷۰ درصد استفاده شد. در پایان پس از خشک‌شدن رسوب DNA، ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به آن اضافه شد. DNA استحصال‌ی از نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری کمیّت و کیفیت آنها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین کمیّت و کیفیت DNA: برای تعیین کمیّت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) استفاده گردید.

آزمایش‌های AFLP: این تکنیک بر مبنای روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با مقداری تغییرات و پس از بهینه‌سازی به شرح زیر انجام شد.

۱- هضم آنزیمی (Digestion): در این مرحله DNA ژنومی با غلظت ۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر به‌وسیله دو آنزیم محدودگر با انتهای چسبنده (Cohesive End) مورد تیمار قرار گرفت. اجزاء حجمی واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل ۱۵ میکرولیتر DNA (۱۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر بافر (Tango Buffer) (۱۰۰ میکرولیتر استات منیزیم ۵۰ میلی‌مول، ۲۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵۰ میلی‌مول، ۵۰ میکرولیتر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مول که با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بُرشی *EcoRI* (۱۰ واحد در میکرولیتر) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم بُرشی *MseI* (۱۰ واحد در میکرولیتر)

نوکلئوتیدهای مختلف استفاده شد. اجزای حجمی واکنش ۲۵ میکرولیتری جهت تکثیر انتخابی شامل ۵ میکرولیتر DNA حاصل از مرحله تکثیر اولیه، یک میکرولیتر از آغازگرهای انتخابی (۲باز) E+ و (۲باز) M+ (۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ برابر)، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵ میلی‌مول)، ۱/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۴۰ میلی‌مول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلیمرز (۱ واحد در میکرولیتر) و ۱۱/۸ میکرولیتر آب دوبارتقطیر بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در این مرحله از نوع کاهش حرارتی (Touch Down)، در ۴ مرحله و در مجموع ۳۶ چرخه دمایی انجام شد. لیست ترکیبات آغازگر حاوی نوکلئوتیدهای اضافی در جدول ۲ نمایش داده شده است.

اطمینان از تکثیر اولیه، ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه با ۳ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری مخلوط و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. رؤیت نوار اسمیر (Smear) روی ژل پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید تحت نور ماوراءبنفش، معیاری جهت اجرای موفق تکنیک تا این مرحله تلقی گردید. پس از انجام مراحل فوق، ۱۰ میکرولیتر از این محلول با ۹۰ میکرولیتر آب به نسبت (۱۰:۱) جهت استفاده در مرحله تکثیر انتخابی رقیق شد.

۴- تکثیر انتخابی (Selective Amplification): نحوه انجام این مرحله شبیه مرحله پیشین است. تنها تفاوت آن در کاربرد نوکلئوتیدهای انتخابی است که بدین منظور محصول واکنش مرحله تکثیر اولیه، برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* با تعداد

جدول ۲- توالی و ترکیب آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر انتخابی

ترکیب آغازگر <i>EcoRI</i>	ترکیب آغازگر <i>MseI</i>	ردیف
5' GACTGCGTACCAATTCTG	5' GATGAGTCCTGAGTAAGC	۱
5' GACTGCGTACCAATTCTC	5' GATGAGTCCTGAGTAAGC	۲
5' GACTGCGTACCAATTCTC	5' GATGAGTCCTGAGTAAAC	۳
5' GACTGCGTACCAATTC TC	5' GATGAGTCCTGAGTAATG	۴
5' GACTGCGTACCAATTCAC	5' GATGAGTCCTGAGTAAGC	۵
5' GACTGCGTACCAATTCAC	5' GATGAGTCCTGAGTAAAC	۶
5' GACTGCGTACCAATTCGC	5' GATGAGTCCTGAGTAATC	۷
5' GACTGCGTACCAATTCGC	5' GATGAGTCCTGAGTAACA	۸
5' GACTGCGTACCAATTCGC	5' GATGAGTCCTGAGTAAGT	۹
5' GACTGCGTACCAATTCGG	5' GATGAGTCCTGAGTAACT	۱۰
5' GACTGCGTACCAATTCGG	5' GATGAGTCCTGAGTAATG	۱۱
5' GACTGCGTACCAATTCGG	5' GATGAGTCCTGAGTAAAC	۱۲
5' GACTGCGTACCAATTCGA	5' GATGAGTCCTGAGTAAGC	۱۳
5' GACTGCGTACCAATTCGA	5' GATGAGTCCTGAGTAATC	۱۴
5' GACTGCGTACCAATTCGA	5' GATGAGTCCTGAGTAACT	۱۵

مطالعه، تکثیری نداشتند. دوازده جفت ترکیب آغازگر برای ۲۹ ژنوتیپ عناب، در مجموع ۶۸۹ باند قابل امتیازدهی در محدوده ۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت‌باز تولید کردند که در این بین ۴۴ باند چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیرشده و چندشکل به‌ازای هر جفت آغازگر به‌ترتیب ۵۷/۴۲ و ۳/۶۷ بود. توانایی جفت آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه متغیر بود. در این میان ترکیب جفت‌آغازگری (*EcoRI-GC/MseI-TC*) دارای بیشترین تعداد باند چندشکل و ترکیب جفت‌آغازگری (*EcoRI-AC/MseI-AC*) دارای کمترین تعداد باند چندشکل بود. به دلیل عدم سهولت در امتیازبندی باندهای AFLP و خطاهایی که به علت تغییر در کیفیت ژل رخ می‌دهد، با حذف باندهای بسیار ضعیف، کمیاب و مصنوعی (باندهایی که به دلیل خطای دید، هضم ناقص، تغییر شرایط PCR، تیرگی ژل و ... به صورت باند رؤیت می‌شوند)، از بروز خطا در میزان قرابت افراد در تجزیه خوشه‌ای ممانعت گردید. زیرا عدم دقت در امتیازبندی و وجود باندهای اضافی، باعث ارزیابی نادرست روابط ژنتیکی بین افراد می‌شود (Powell et al., 1996). خوشه‌بندی توسط ضریب تشابه جاکارد انجام شد (et al., 2003) و در پایان، نتایج حاصل به صورت یک دندروگرام در شکل ۱ خلاصه گردید. براساس نتایج حاصل از دندروگرام، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به ۸ گروه مجزا در سطح تشابه ۷۵ درصد تقسیم شدند.

۵- تک‌رشته‌ای کردن قطعات تکثیرشده: جهت واسرشت‌سازی قطعات تکثیرشده، فرآورده‌های حاصل از تکثیر انتخابی با حجمی برابر ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری فراماید [فراماید ۹۶٪، EDTA ۱۰ میلی‌مول، برموفنول‌بلو (Bromophenol Blue) و زیلن‌سیانول (Xylen Cyanole)] مخلوط و پس از ۴ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، بلافاصله روی یخ قرار داده شد.

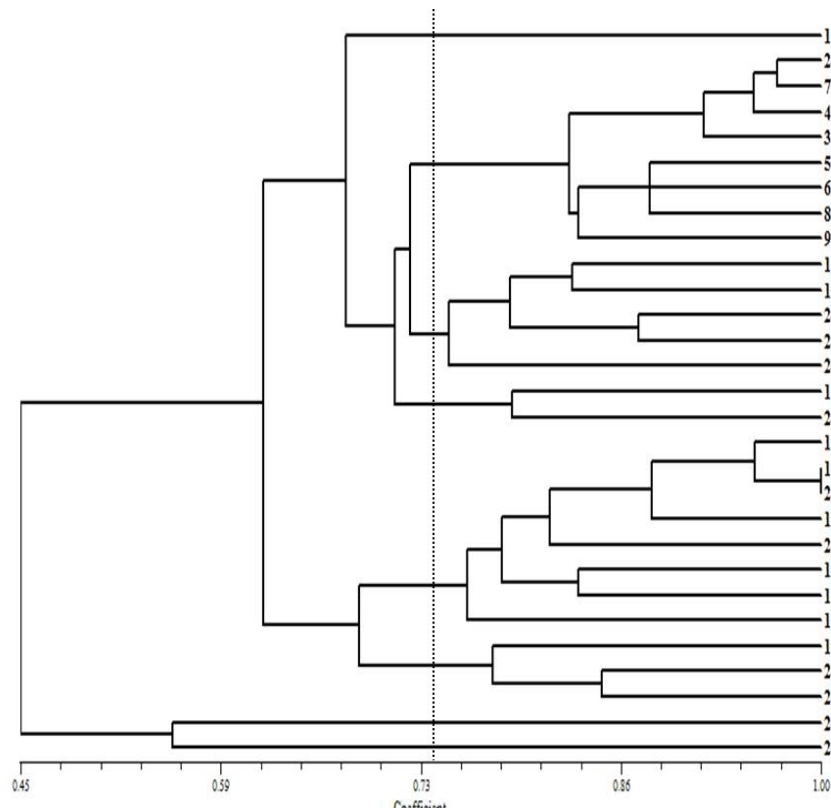
۶- الکتروفورز DNA: پس از اتمام مرحله تکثیر انتخابی از ژل توالی‌یاب (Sequencing Gel) پلی‌اکریلامید ۶ درصد به منظور مشاهده و تفکیک باندها استفاده شد.

۸- رنگ‌آمیزی: جهت مشاهده قطعات حاصل از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی با نیترات نقره توسط شیکر دوآر با سرعت ثابت ۴۰ دور در دقیقه و در زیر هود انجام شد (Bassam et al., 1991).

۷- تجزیه و تحلیل داده‌ها: هریک از قطعات DNA تکثیرشده توسط نشانگر به‌عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها، به‌ترتیب با اعداد یک و صفر در نرم‌افزار Excel نمره‌دهی شدند. فاصله ژنتیکی براساس روش ضریب تشابه جاکارد (Jaccard's Similarity Coefficient) توسط نرم‌افزار (ver 2.02) NTSYS محاسبه گردید. تجزیه خوشه‌ای (Cluster Analysis) با الگوریتم UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی (Principle Coordinate Analysis) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد.

نتایج

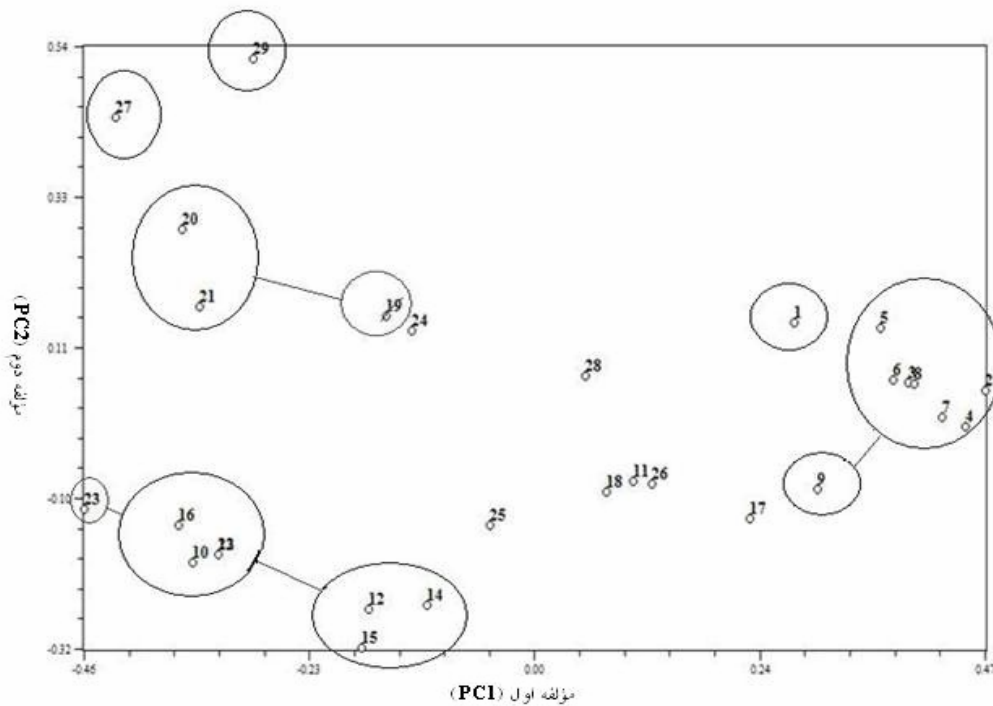
در این آزمایش ۱۵ جفت ترکیب آغازگر استفاده شد که از این تعداد، ۳ آغازگر بر روی ژنوتیپ‌های مورد



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل باندهای AFLP روی ژنوتیپ‌های عَناب با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

مازندران را در بر گرفت. گروه هشتم نیز به طور مجزا شامل ژنوتیپ دهنه لاریم از مازندران شد. تجزیه به مختصات اصلی براساس ماتریس تشابه به دست آمده از ضریب تشابه جاکارد انجام گردید. نتایج نشان داد که اولین مؤلفه بیشترین تغییرات را (۲۷/۸۵) نسبت به سایر مؤلفه‌ها توجیه می‌کند و مؤلفه دوم حدود ۱۰ درصد تغییرات را توجیه می‌کند. با ادامه این روال مؤلفه شانزدهم تنها حدود ۱ درصد و مؤلفه‌های بعد از آن کمتر از ۱ درصد اطلاعات را توجیه می‌کند. بنابراین ۱۶ مؤلفه اول ۹۶/۳ درصد تغییرات را توجیه می‌کند. در ضمن کاهش اطلاعات به دو مؤلفه اصلی توانست ژنوتیپ‌ها را مطابق شکل ۲ از یکدیگر تفکیک نماید.

گروه اول به تنهایی شامل ژنوتیپ هموارلک‌ها از قم بود. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های قاضی‌علیا، کم‌چنار، کاسوا، مارون، کلاغ‌نشین ۱، کلاغ‌نشین ۲، دولت‌آباد و نهالستان بود که همگی مربوط به نواحی مختلف استان قم بودند. گروه سوم ژنوتیپ‌های نیاسر و بیاضیه از اصفهان، کلاله از گلستان، لاریم و مقام ساری از مازندران را در بر گرفت. گروه چهارم شامل ژنوتیپ‌های نطنز از اصفهان و حمیدآباد از ساری بود. گروه پنجم ژنوتیپ‌های شهرضا، کوهپایه ۱، کوهپایه ۲، اردستان، پوده ۱، پوده ۲ از اصفهان و همچنین نودان ۱ و نودان ۲ از فارس را در بر گرفت. گروه ششم شامل ژنوتیپ‌های دشت بیاض، آلقو و گلیان از خراسان بود. گروه هفتم به تنهایی ژنوتیپ بهشهر از



شکل ۲- نمودار دو بُعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ماتریس تشابه جاکارد

بحث

آزمون، یک روش مفید و قابل اعتماد می‌باشد، زیرا تکرارپذیری یک روش ساده برای ارزیابی کیفیت نشانگر محسوب می‌شود که در نتیجه می‌توان خوشه‌بندی صحیحی برای داده‌های حاصل از آن، برای ارقام متفاوت انجام داد. در مطالعه‌ای توسط Jhones و همکاران (۱۹۹۷) مشخص شد که تکنیک AFLP تکرارپذیری بالایی در آزمایش‌های مختلف داشته است، این آزمایش‌ها تنها در یک باند با هم تفاوت داشتند. با این وجود، این نشانگر به‌عنوان یک نشانگر غالب محسوب می‌شود و در نتیجه نمی‌توان هتروزیگوت‌ها را از هموزیگوت‌ها تشخیص داد. هرچند میزان اطلاعاتی که از روش AFLP حاصل می‌شود، تا حدود زیادی به تعداد آغازگر و نوع نوکلئوتید انتخابی آن بستگی دارد، اما Ellis و همکاران (۱۹۹۷) ثابت کردند که با انتخاب ۶ جفت از بهترین آغازگرها،

به طور کلی در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان، از دو تکنیک AFLP و SSR (Simple Sequence Repeat)، به دلیل میزان بالای چندترکیبی بیشتر از سایر روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده می‌شود. چندترکیبی فرایندی است که توسط آن می‌توان مقدار زیادی از مکان‌های ژنی یا آلل‌ها را به‌طور همزمان تجزیه نمود (Maguire *et al.*, 2002; Becker & Heun, 1995).

نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی به خوبی و با دقت بالایی توانست ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را منطبق با خاستگاه اغلب آنها تفکیک نماید. البته برخی ژنوتیپ‌های با منشأ یکسان نیز، در نقاط مختلف دندروگرام پراکنده شده‌اند. روش AFLP به دلیل تکرارپذیری بالا و تولید تعداد زیادی باند در یک

توانست ۳ گروه قم، اصفهان و خراسان را تفکیک نماید. به‌طور کلی دقت این تفکیک در حدی بود که گروه خراسانی به صورت کاملاً خالص و مجزا از سایر گروه‌ها قرار گرفت و ژنوتیپ‌های نواحی مختلف قم (به استثنای یک ژنوتیپ)، نیز به صورت مشترک در یک گروه جای گرفتند. این موضوع تا حد بالایی در مورد گروه اصفهان نیز صدق می‌کند.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principle Components Analysis) یکی از روش‌های چندمتغیره برای گروه‌بندی بر پایه ضریب تشابه یا واریانس، کواریانس در بین داده‌ها می‌باشد که اطلاعات مفیدتری درباره تمایز گروه‌های اصلی ارائه می‌کند (Bottini et al., 2002). از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌توان برای نمایش دو بُعدی پراکنش افراد استفاده کرد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات، نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. از آن‌جا که در این مطالعه داده‌ها کیفی بودند و مقادیر صفر و یک گرفتند، به جای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، از تجزیه به مختصات اصلی استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی برای کاستن حجم داده‌ها به منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی می‌باشد. این نوع دسته‌بندی اجازه نمایان‌شدن تفاوت‌ها بین افراد را داده و مشاهده همه گروه‌ها را ممکن می‌سازد. کاسته‌شدن حجم داده‌ها توسط تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیرهای مستقل جدیدی که به‌عنوان مختصات اصلی شناخته می‌شوند انجام می‌گیرند، به‌طوری که اولین مؤلفه بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم بیشترین مقدار تغییرات باقی‌مانده را بعد از مؤلفه اول توجیه می‌کند و به همین روال تا آخرین مؤلفه ادامه دارد. هر مؤلفه تغییراتی را

امکان توجیه ۸۰ درصد روابط وجود دارد (et al., 2003). (Rahaei).

گروه اول به تنهایی شامل ژنوتیپ هموارلک‌ها از قم بود. سایر ژنوتیپ‌های مناطق مختلف قم همگی به‌طور مشترک در گروه دوم گرفتند. در واقع تنها گروه‌های سوم و چهارم تا حدی دارای ناخالصی بودند و ژنوتیپ‌های دو منطقه متفاوت مرکزی و شمال ایران را در خود جای دادند که البته در گروه سوم هم ژنوتیپ‌های نیاسر و بیاضیه از اصفهان، به صورت جداگانه در یک زیرگروه قرار گرفتند؛ که از این نظر حائز اهمیت است. در گروه پنجم بیشتر ژنوتیپ‌های اصفهان و ژنوتیپ‌های فارس جای گرفتند، که با توجه به وضعیت جغرافیایی نسبتاً مشترک و بسیار نزدیک مناطق فارس و اصفهان، می‌توان این گروه را به‌عنوان گروه اصلی اصفهان در نظر گرفت. گروه ششم شامل ژنوتیپ‌های دشت بیاض، آقو و گلپایگان از منطقه خراسان بود، که دقت و کارایی بالای نشانگر AFLP به خوبی توانست ژنوتیپ‌های این منطقه را در یک گروه مجزا جای دهد. جداکردن ژنوتیپ‌های آقو و گلپایگان از بیرجند در یک زیرگروه مجزا از ژنوتیپ دشت بیاض، بازده و دقت این نشانگر را بیشتر نمایان می‌سازد. گروه‌های هفتم و هشتم نیز هرکدام به‌ترتیب ژنوتیپ‌های بهشهر و لاریم از مازندران را شامل شدند که هرچند در دو گروه متفاوت جای گرفتند، اما از یک نیای مشترک اشتقاق یافته‌اند که می‌تواند بیانگر قرابت این ژنوتیپ‌ها باشد.

در بررسی روابط ژنوتیپ‌ها، با وجود این‌که برخی از ژنوتیپ‌های مربوط به نقاط مشترک و تا حدی دارای منشأ یکسان، به صورت پراکنده و نامنظم در گروه‌های متفاوت جای گرفتند، اما نشانگر AFLP به‌طور مشخص

تطابق بالایی است، به عبارتی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز تأیید شد. گونه‌هایی مانند عناب چنانچه فقط توسط تولیدمثل رویشی به بقای خود ادامه دهند، در معرض فرسایش ژنتیکی قرار خواهند گرفت. ارزیابی تنوع ژنتیکی به روش تکثیر گیاهان بستگی دارد. در گیاهانی که توسط تکثیر رویشی زیاد می‌شوند، تنوع بسیار کمی را طی نسل‌ها نشان می‌دهند و تغییرات ژنتیکی اندکی توسط تغییرات سوماکلونال در این گیاهان رخ می‌دهد (Rahimi et al., 2005). هرچند اطلاعات علمی اندکی از نحوه تکثیر این ژنوتیپ‌ها در دسترس می‌باشد، اما تفاوت عمده بین ژنوتیپ‌های مناطق مختلف و قرارگرفتن اکوتیپ‌های یک منطقه در گروه‌های مجزا می‌تواند ناشی از تکثیر زایشی در نسل‌های اولیه قبل از تفکیک و استقرار در مناطق مختلف و سپس تکثیر رویشی این ژنوتیپ‌ها در نواحی استقرار یافته باشد.

همان‌طور که ملاحظه می‌گردد این پژوهش در راستای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تفکیک ژنوتیپ‌های گیاه دارویی عناب با ابزار مولکولی بود و در نقطه مقابل این تحقیق، بررسی‌هایی براساس تکنیک‌هایی مولکولی در بسیاری از نقاط دنیا در انگشت‌نگاری و تفکیک ژرم‌پلاسم این گیاه وجود دارد. در همین راستا و با توجه به این‌که تاکنون هیچ پژوهش مولکولی بر روی جمعیت مذکور صورت نگرفته، بنابراین در شالوده بحث از مقایسه با دسته‌بندی انجام‌شده در سایر مطالعات اجتناب گردیده و بیشتر به نحوه تفکیک و قرابت ژنوتیپ‌های موجود پرداخته شده است.

این پژوهش در حقیقت بخشی از یک برنامه اصلاحی جهت دستیابی به ژنوتیپ‌های مطلوب از گیاه عناب بود

توجه می‌کند که توسط مؤلفه‌های قبلی بیان نشده است. برای خلاصه‌کردن داده‌های اطلاعات مولکولی و وضوح بیشتر می‌توان از تجزیه مختصات اصلی در ترکیب با خوشه‌بندی به صورت توأم استفاده کرد و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها را با استفاده از نمودار دو بُعدی متشکل از دو مؤلفه اول بررسی نمود. به‌ویژه هنگامی که ۲ مؤلفه اول بیش از ۲۵ درصد تغییرات کل داده‌ها را توجیه نمود این امر صادق است (Fabrikurang, 2007).

در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی، بهترین حالت این است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در سطح کل ژنوم داشته باشند تا بتوانند کل ژنوم را نمونه‌برداری کنند. بنابراین در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه به مؤلفه‌های بیشتری جهت توجیه تغییرات کل نیاز است. با توجه به این‌که در این بررسی تجزیه به مختصات اصلی بر روی داده‌های AFLP، دو مؤلفه اول تنها ۴۰ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کنند، بنابراین نشانگرهای AFLP حاصل از این پژوهش به اندازه کافی در ژنوم پراکنده‌اند (Talebibodaf et al., 2006). از طرفی کاهش اطلاعات به دو مؤلفه اصلی توانست اکثر ژنوتیپ‌ها را مطابق با تجزیه خوشه‌ای از هم جدا کند. همان‌گونه که در نمودار دو بُعدی حاصل از تجزیه مختصات اصلی مشاهده می‌گردد، تجمع ژنوتیپ‌های مربوط به گروه دوم یا قم در یک ناحیه مشخص از پلات کاملاً مشخص و گویاست. همچنین ژنوتیپ‌های دهنه لاریم و بهشهر از مازندران، به صورت مجزا از سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفته‌اند و بیشترین فاصله را با سایر ژنوتیپ‌ها دارند که کلیه این نتایج با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای همگام بوده و دارای

- Other Jujubes. International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton, Southampton, UK, 302 p.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*, 196: 80-83.
 - Becker, J. and Heun, M., 1995. Barley microsatellites, allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology*, 27: 835-854.
 - Bottini, M.J., Bustos, A., Jouve, N. and Poggio, L., 2002. AFLP characterization of natural population of *Berberis* in Patagonia, Argentina. *Journal of Plant Systematic and Evolution*, 231: 133-142.
 - Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep. *Plant Mol. Bio Rep*, 14: 19-21.
 - Fabrikiurang, S., 2007. Analysis of genetic diversity of Iranian Melons (*Cucumis melo* L.) using ISSR markers. Thesis of Biotechnology, Tarbiat Modares University, I.R.Iran. 123 p.
 - Khakdaman, H., Poormaidani, A. and Adnani, M., 2007. Study of genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) ecotypes. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 14: 202-214.
 - Li, J., Bi, H., Li, H., Li, Z. and Feng, J., 2008 a. Genetic analysis of *Zizyphus jujuba* 'Huizao' using ISSR markers. 1th International Jujube Symposium, China, 82 p.
 - Li, L., Peng, J.Y., Huang, R.H., Zheng, B.Q. and Bai, R., 2008b. The orthogonal optimization of SRAP amplification system in Chinese date. First International Jujube Symposium, China, 82 p.
 - Lu, J.I., Mao, Y., Shen, L., Peng, S.H. and Liu, M., 2005. Application of AFLP markers for identification of hybrids from open pollinated Dongzao (*Zizyphus jujuba*) progenies. *Acta Horticulturae Sinica*, 32: 680-683.
 - Maguire, T.L., Peakall, R. and Saenger, P., 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 388-398.
 - Peng, J.Y., Shu, H.R. and Peng, S.Q., 2002. To address the problem of intraspecific classification of *Zizyphus jujuba* using RAPD data. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 40: 84-89.
 - Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalsky, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
 - Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandele, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J.,

که برای اولین بار در کشور این امکان را فراهم نمود که نقش نشانگر AFLP در انگشت‌نگاری ژنتیکی جمعیت عناب کشور مورد بررسی قرار گرفته و شرایط آزمایشگاهی آن بهینه شود. پیشنهاد می‌شود از تکنیک AFLP در ارزیابی و شناسایی سایر توده‌های این گیاه و ارزیابی درون‌جمعیتی خصوصاً در مناطق عناب‌خیز استفاده شود. همچنین به منظور افزایش قابلیت این تکنیک، از آنزیم‌ها و آغازگرهای مختلف استفاده گردد. با توجه به اثبات کارایی این نشانگر در تفکیک و ارزیابی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان، پیشنهاد می‌گردد از این فن جدید و مطمئن به‌عنوان مکمل (نه جایگزین) روش‌های اصلاح کلاسیک در شناسایی دقیق‌تر ژنوتیپ‌های این گیاه و معرفی ارقام برتر از حیث مواد مؤثره دارویی، عملکرد و سایر صفات مطلوب و درنهایت به‌نژادی آن استفاده گردد. همچنین با توجه به ارزش دارویی ویژه این گیاه، پیشنهاد می‌گردد بررسی خصوصیات دارویی و عملکردی آن مورد مطالعه و آزمون قرار گیرد و با استفاده از همبستگی موجود بین نشانگرهای مولکولی با نشانگرهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی، به‌گزینش ارقام برتر اقدام گردد.

سپاسگزاری

از معاونت و مسئولان محترم بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران، به دلیل مساعدت در اجرای این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Anonymous., 2008. First International Jujube Symposium. China, 82 p.
- Azam-Ali, S., Bonkounon, E., Bowe, C., Dekock, C., Godara, A. and Williams, J.T., 2006. Ber and

- Wang, Y., Li, D., Sui, C., Zhao, A. and Du, X., 2008. Conservation and utilization of Chinese jujube germplasm resources. First International Jujube Symposium, China, 82 p.
- Wang, Y.K., Tian J.B., Wang, Y.Q., Sui, C.L., Li, D.K. and Huang, C.L., 2007. AFLP analysis of jujube cultivars and strains. Journal of Fruit Science, 24: 146-150.
- Wen, Y.F. and He, G., 2007. Genetic relationships among jujube cultivars suitable for cultivation in South China. Journal of Fruit Science, 24: 640-643.
- Wen, Y., He, G. and Wang, S., 2008. AFLP analysis of genetic relationship and discrimination on jujube germplasm resources. First International Jujube Symposium, China, 82 p.
- Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.
- Rahaei, M., Tabatabaei, A., Shahnejatebushehri, A., Abdemishani, S. and Melbuei, M.A., 2003. Study of genetic diversity in Canola (*Brassica napus* L.). Seed and Plant Improvement Journal, 19: 469-481.
- Rahimi, T., Tabatabaei, A., Sharifnabi, B. and Ghobadi, S., 2005. Evaluating genetic variation and relationships among some Iranian pomegranata (*Punica granatum* L.) using AFLP markers. Iranian Journal of Agriculture, 36: 1373-1379.
- Talebibodaf, M., Tabatabaei, A., Razmjoo, K.H. and Shirvan, B., 2006. Genetic variation within and among species of perennial grass using AFLP markers. Iranian Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 10: 29-38.

A study on genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) genotypes using molecular AFLP marker

R. Shahhoseini¹, A. Babaei^{2*}, M. Kazemi³ and R. Omidbaigi⁴

1- M.Sc., Horticultural Sciences Department, College of Agricultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.

2*- Corresponding author, Assist. Prof., Horticultural Sciences Department, College of Agricultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran. Email: arbabaei@modares.ac.ir

3- M.Sc., Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, I.R.Iran.

4- Prof., Horticultural Sciences Department, College of Agricultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran.

Received: 05.03.2012

Accepted: 01.07.2012

Abstract

Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) is one of the important medicinal plants belong to Rhamnaceae family. Jujube contains mucilage, vitamins, pectin, alkaloids, phenol compounds, and fatty acids. Therefore, it is important in the pharmaceutical industries. In addition to medicinal uses, the species has ornamental use as well. It has also been widely used in preventing soil erosion and desertification. This research was performed to evaluate genetic diversity of Iranian jujube genotypes using molecular AFLP marker. Twenty nine Jujube genotypes were selected from different parts of the country. Their molecular characteristics were assessed by 15 AFLP primers. Similarity matrix was generated using the Jaccard coefficient. Cluster analysis was carried out by UPGMA algorithm and Principle Coordinate Analysis. Twelve primers showed polymorphism. The primers produced 689 bands of which 44 bands showed polymorphism. Based on the dendrogram, the genotypes were divided to eight groups at 0.75 similarities. AFLP marker precisely separated the Qom, Isfahan and Khorasan groups. This resolution was very precise, so that Khorasan group was absolutely pure and separated from other groups. Cluster analysis result was confirmed by principal components analysis. Qom and Isfahan allocated in the same group. Therefore, the two genotypes may be considered as a common origin with high confidence. High efficiency of the applied marker in separation of genotypes was significant.

Key words: Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.), Genetic Variation, Molecular AFLP Marker.