نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۵۹۰-۵۸۳

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 10, No. 3, Fall 2012, p. 583-590

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های عناب ایران (*Ziziphus* spp.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

سمیه عباسی[۱] - سعید ملک‌زاده شفارودی[۲*] - کمال غوث[۳] - فرج ا... شهریاری[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۱۲

چکیده

عناب گیاه داروئی ارزشمندی است که در طب سنتی ایران جایگاه ویژه‌ای دارد. با تمام اهمیتی که گیاهان منطقه‌ای مانند عناب در اقتصاد و اشتغال‌زائی مناطق مختلف کشور دارند، در عرصه پژوهش و فناوری جزء گیاهان فراموش شده به حساب می‌آیند. با عنایت به اهمیت اقتصادی و داروئی این گیاه، اولین قدم برای برنامه‌های اصلاحی عناب، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ارقام مختلف آن است. در این پژوهش از ۳۴ اکوتیپ عناب که از هشت استان عناب‌خیز کشور جمع‌آوری شده‌اند، استفاده گردید. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD در گیاه عناب، ۱۵ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت که ۶ آغازگر در بین نمونه‌ها دارای چندشکلی مطلوبی بودند و در مجموع تعداد ۶۵ جایگاه تکثیر کردند که در این بین تعداد ۴۹ جایگاه (۷۵ درصد) چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر ۱۰/۸۳ و میانگین تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر ۸/۱ بود. گروه‌بندی اکوتیپ‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای و با استفاده از الگوریتم UPGMA انجام شد که نمونه‌ها به دو گروه اصلی در ضریب شباهت ۰/۸۲ تفکیک شدند. بیشترین شباهت ژنتیکی (۹۲ درصد) میان اکوتیپ‌های مازندران و گلستان و بیشترین تنوع در اکوتیپ‌های خراسان جنوبی مشاهده شد. قرابت اکوتیپ‌های خراسان جنوبی و اصفهان منشاء احتمالی مشترکی برای تنوع در این مناطق را نشان داد. نتایج این مطالعه حاکی از وجود تنوع ژنتیکی مناسب جهت بهره‌گیری در پروژه‌های به‌نژادی آتی بود.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم مولکولی، تجزیه خوشه ای، Jujube

مقدمه

عناب (*Ziziphus* sp.) به عنوان یک گیاه دارویی مهم به تیره Rhamnaceae تعلق دارد (۱) و از حدود ۷۷۰۰ سال پیش در چین کاشت می شده و از طریق جاده ابریشم به سایر نقاط از جمله هندوستان، ایران، افغانستان و آسیای میانه انتقال یافته است (۲). عناب از گیاهان بومی فلات ایران است و گرچه کشت آن در بیشتر استان‌های کشور به صورت پراکنده دیده می‌شود ولی به طور عمده در استان خراسان جنوبی، اصفهان، گلستان، مازندران، فارس، یزد، همدان و قزوین وجود دارد. این گیاه به عنوان یک محصول اقتصادی جایگاه ویژه‌ای را در میان محصولات کشاورزی خراسان جنوبی به خود اختصاص داده و سهم بزرگی را در اقتصاد کشاورزی این ناحیه دارا می‌باشد، به نحوی که امروزه درآمد هزاران خانوار روستائی در جنوب خراسان به تولید عناب وابسته است. با تمام اهمیتی که گیاهان منطقه‌ای مانند عناب در اقتصاد و اشتغال‌زائی مناطق مختلف کشور دارند، در عرصه پژوهش و فناوری جزء گیاهان فراموش شده به حساب می‌آیند (۵). با عنایت به اهمیت اقتصادی و داروئی این گیاه، اولین قدم برای برنامه‌های اصلاحی عناب، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ارقام مختلف آن است.

استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری برای شناسائی چندشکلی و مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان مطرح است. نشانگرهای مولکولی تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند، در سرتاسر ژنوم پراکنده هستند، دارای پیوستگی‌هایی با ژن‌های کنترل کننده صفات مهم کشاورزی هستند و می‌توانند تفاوت افراد را در سطح توالی نوکلئوتیدی ژنوم مشخص نمایند (۱۲ و ۲۲). در بین نشانگرهای مختلف، نشانگرهای RAPD به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی ژنوم، امکان غربال سریع و مؤثر توالی DNA بر اساس چندشکلی در تعداد زیادی مکان و عدم نیاز به مواد رادیواکتیو، در مطالعات ژنتیک جمعیت و تعیین تنوع، به طور

۱، ۲ و ۴ – به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: malekzadeh-s@um.ac.ir)
۳ – مدیریت جهاد کشاورزی سربیشه، سازمان جهاد کشاورزی خراسان جنوبی، سربیشه، بیرجند، ایران

گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۶). در این روش با انجام چند دوره PCR با آغازگرهای تصادفی می‌توان قطعاتی را یافت که برای افراد گیاهی یا جمعیت‌ها تمیز دهنده باشند (۱۵). به بیان دیگر یک قطعه مشخص که برای یک فرد تولید شده اما برای فرد دیگر تولید نشده است، بیانگر چندشکلی DNA است و می‌تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد (۶).

مطالعات بسیاری که بر پایه نشانگرهای RAPD صورت گرفته حاکیست که این نشانگر می‌تواند به طور مناسبی در شناسائی روابط خویشاوندی به کار رود. این روش به طور موفقیت آمیزی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی تعدادی از ارقام انگور، زردآلو، هلو، آلو، سیب و گلابی (۲۶) و همچنین دیگر گیاهان باغی مانند انار (۲۱)، بادمجان (۲۴)، فلفل (۷) و پنبه (۱۱) مورد استفاده قرار گرفته است.

استفاده از نشانگر RAPD در تعیین روابط خویشاوندی گونه‌های مختلف جنس *Ziziphus* نیز با موفقیت همراه بوده است (۱۰، ۱۴، ۱۷ و ۲۳). به طور مثال، پنگ و همکاران (۱۸)، رابطه ژنتیکی ۱۴ رقم Chinese jujube (*Ziziphus jujuba*) و یک گونه وحشی را به وسیله RAPD بررسی کردند. در مطالعه‌ای دیگر روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های *Ziziphus jujube* و *Ziziphus spinosa* با استفاده از داده‌های RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که *Z. jujuba* و *Z. spinosa* بایستی به عنوان دو گونه جداگانه در نظر گرفته شوند (۱۹). چند شکلی DNAی ژنومی از ۱۴ گونه Chinese Ziziphus، ۱۱ واریته .*Ziziphus jujuba* Mill و یک برون گروه نیز به وسیله RAPD تجزیه و تحلیل شدند و مشخص گردید که .*Z. jujuba* Mill و *Z. acidojujuba* بایستی به عنوان یک گونه و *Z. xiangchengensis* و *Z. montana* نیز به عنوان گونه‌ای دیگر محسوب شوند (۱۳).

در پژوهش حاضر نیز از نشانگر RAPD جهت ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی و روابط اکوتیپ‌های موجود در کلکسیون عناب ایران به منظور هدایت برنامه‌های آتی اصلاح عناب استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۳۴ اکوتیپ عناب (جدول ۱) که از هشت استان عناب خیز کشور شامل استان‌های لرستان، مازندران، گلستان، خراسان جنوبی و رضوی، اصفهان، قم و فارس جمع‌آوری و در محل دشت خاران شهرستان سربیشه کاشته شدند، استفاده گردید (این کلکسیون به همت آقای مهندس کمال غوث در مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان سربیشه–بیرجند تهیه شده است). برگ‌های تازه برای جلوگیری از تخریب احتمالی DNAی ژنومی توسط نوکلئازهای درون سلولی، به یخ و سپس به فریزر ۲۰– منتقل شدند. استخراج DNA به روش CTAB بر اساس روش زنگ و همکاران (۲۷) با اندکی تغییرات انجام شد.

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ های عناب کلکسیون موجود در سربیشه

ردیف	محل جمع‌آوری	کد
۱	ساری– مازندران	Sari 8
۲	کنگان سربیشه– خراسان جنوبی	Kangan 9
۳	نوغاب سربیشه– خراسان جنوبی	Noghab 10
۴	القور بیرجند– خراسان جنوبی	Alghur 11
۵	کلاله– گلستان	Kalale 12
۶	سبزوار– خراسان رضوی	Sabzevar 13
۷	عربخانه نهبندان– خراسان جنوبی	Arabkhane 14
۸	نوغاب سربیشه– خراسان جنوبی	Noghab 15
۹	بردسکن– خراسان رضوی	Bardaskan 18
۱۰	جویبار– مازندران	Jooybar 19
۱۱	درح سربیشه– خراسان جنوبی	Doroh 20
۱۲	کنگان سربیشه– خراسان جنوبی	Kangan 21
۱۳	درخش درمیان– خراسان جنوبی	Dorokhsh 22
۱۴	تجنود قائن– خراسان جنوبی	Tajnud 23
۱۵	سبزوار– خراسان رضوی	Sabzevar 25
۱۶	کوهپایه – اصفهان	Kouhpayeh 26
۱۷	درح سربیشه– خراسان جنوبی	Doroh 27
۱۸	آسفیچ سربیشه– خراسان جنوبی	Asphich 28
۱۹	کنگان سربیشه– خراسان جنوبی	Kangan 29
۲۰	قم– قم	Qom 30
۲۱	گیوک بیرجند– خراسان جنوبی	Giuk 31
۲۲	درح سربیشه– خراسان جنوبی	Doroh 32
۲۳	الیگودرز– لرستان	Aligoudarz 33
۲۴	کلکستان نوغاب– خراسان جنوبی	Kalkestan 34
۲۵	خواف– خراسان جنوبی	Khaf 35
۲۶	بیاضیه– اصفهان	Bayazieh 36
۲۷	خونیک بیرجند-– خراسان جنوبی	Khunik 37
۲۸	کنگان سربیشه– خراسان جنوبی	Kangan 38
۲۹	برزادران بیرجند– خراسان جنوبی	Borzaderan 39
۳۰	کشوک پائین– خراسان جنوبی	Kashuk 40
۳۱	اردستان – اصفهان	Ardestan 41
۳۲	برزادران بیرجند– خراسان جنوبی	Borzaderan 42
۳۳	دوستیران– فارس	Doostiran 43
۳۴	کنگان سربیشه– خراسان جنوبی	Kangan 44

به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNAی استخراج شده از نمونه‌های مورد بررسی از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. نمونه‌های DNA ژنومی که دارای کمیت و کیفیت بالا بودند برای PCR انتخاب شدند.

جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی ۱۵ آغازگر RAPD مورد آزمون

قرار گرفتند و از این تعداد شش آغازگر که الگوی نواری تکرارپذیر داشتند انتخاب و برای ارزیابی اکوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۶۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs- سیناژن)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ x)، ۲۰ پیکومول آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی (دکامر) و یک واحد آنزیم DNA تک‌پلیمراز (کوثر)، انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۴ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتیگراد و ۳۵ چرخه با ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در ۳۲ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله تکثیر نهایی با هشت دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بهینه‌سازی و انجام گردید. محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE۰/۵ x الکتروفورز شدند. از نشانگر اندازه جهت تعیین اندازه باندها استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید عکس‌برداری از ژل، توسط نور UV انجام پذیرفت.

امتیازدهی باندها بر اساس تصاویر به دست آمده انجام شد. وجود و عدم وجود باند با اعداد یک و صفر امتیازدهی شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب دایس توسط نرم‌افزار NTSYSpc Ver 2.02 (۲۰)، انجام گرفت. همچنین جهت تعیین میزان پلی‌مورفیسم در هشت جمعیت عناب ایران، از نرم‌افزار POPGEN3.2 (۲۵) استفاده گردید. داده‌های ورودی به این نرم‌افزار داده‌های صفر و یک بودند.

نتایج و بحث

شش آغازگر در مجموع تعداد ۶۵ جایگاه تکثیر کردند که در این بین تعداد ۴۹ جایگاه (۷۵٪) چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر ۱۰/۸۳ و میانگین تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر ۸/۱ بود. توانایی آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چندشکلی در بین اکوتیپ‌های عناب متغیر بود، در این میان آغازگر C دارای بیشترین تعداد باند چندشکل (۱۲ باند) و آغازگر O دارای کمترین تعداد باند چندشکل (۳ باند) بود (جدول ۲). نمونه‌ای از باندهای تکثیر یافته با استفاده از آغازگرهای A و C در شکل ۱ نشان داده شده است.

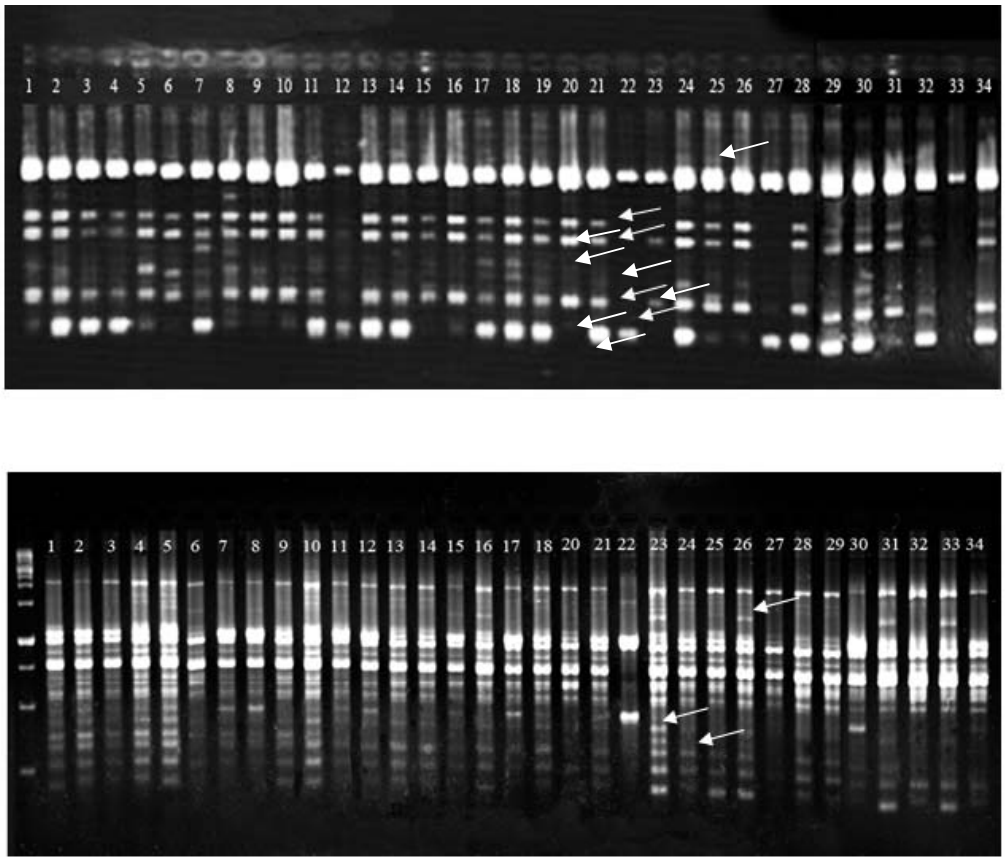
مقایسه درصد بالای چندشکلی (۷۵٪) در مطالعه حاضر با مطالعات صورت گرفته در جنس *Ziziphus* نکاتی را در بر داشت. پینگ و همکاران (۱۹)، درصد جایگاه‌های چندشکل در میان جمعیت *Z. spinosa* ۸۹ درصد و در جمعیت *Z. jujuba* را ۵۶ درصد گزارش کردند. پنگ و همکاران (۱۷) میزان چندشکلی در ۶۴ رقم از عناب چینی با استفاده از نشانگر RAPD را ۵۹/۵ درصد گزارش نمودند. بای و همکاران (۸)، نیز در مطالعات تنوع ژنتیکی میان ارقام عناب چینی با نشانگر RAPD کمبود چندشکلی را گزارش کردند، در حالیکه در مطالعه لی و همکاران (۱۳)، در مجموع ۹۲۱ باند RAPD که به وسیله آغازگر تصادفی تکثیر شدند ۹۱۹ (۹۹/۷۸ درصد) باند چندشکل بودند.

بنابراین بالا بودن درصد چندشکلی حاصل از شش آغازگر RAPD در میان ۳۴ اکوتیپ عناب ایران می‌تواند نشان‌دهنده بالا بودن سطح تنوع ژنتیکی باشد. دوانشی و همکاران (۹)، نیز نشان دادند که ژرم‌پلاسم Ziziphus از نظر ژنتیکی متنوع است و ژنوتیپ‌های ber (کُنار آفریقایی) که قبلاً بر اساس مورفولوژی مشابه گزارش شده‌اند از نظر ژنتیکی متفاوتند.

به منظور محاسبه اولیه میزان تنوع ژنتیکی میان نمونه‌ها از ماتریس شباهت ژنتیکی بر مبنای ضریب دایس (۱۶) استفاده شد. بر اساس داده‌های RAPD، شباهت ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۴۳ تا ۰/۹۲ متغیر بود و میانگین شباهت ژنتیکی بین تمام جفت نمونه‌ها ۰/۷۳ محاسبه گردید که حکایت از وجود تنوع ژنتیکی مناسب جهت بهره‌گیری در پروژه‌های به‌نژادی آتی دارد. سینگ و همکاران (۲۳)، نیز شباهت ژنتیکی در میان ۴۸ ژنوتیپ ber را در محدوده ۴۷/۶۲ تا ۸۸/۹۷ درصد گزارش نمودند و پیشنهاد کردند که می‌تواند یک پایه ژنتیکی گسترده برای مجموعه ژرم‌پلاسم ber باشد. جفت نمونه‌های کلاله (kalale12) و ساری (sari8) و همچنین کلکستان (kalkestan34) و کنگان (kangan38) بیشترین تشابه ژنتیکی را نسبت به هم (۰/۹۲) و نمونه‌های خونیک (khunik37) و عربخانه نهبندان (arabkhane14) کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۴۳) را دارا بودند.

جدول۲- اطلاعات به دست آمده توسط آغازگرهای دکامری تصادفی مورد استفاده در تکنیک RAPD

نام آغازگر	توالی	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی
A	5'-CCG GCC TTA G-3'	۱۰	۸	۸۰
B	5'-CCT GGG TCC A-3'	۱۳	۸	۶۱/۵
C	5'-GAG CAC CAG T-3'	۱۴	۱۲	۸۵
D	5'-TCA GCC AGC G-3'	۱۰	۹	۹۰
E	5'-CGG TGA CAT C-3'	۹	۹	۱۰۰
O	5'-CCT GGG CTT G-3'	۹	۳	۳۳/۳
میانگین		۱۰/۸	۸/۱	۷۵



شکل ۱- (الف) نمونه‌های عناب با استفاده از نشانگر A. (ب) نمونه‌های عناب با استفاده از نشانگر C. شماره چاهک‌ها مطابق با شماره اکوتیپ‌ها در جدول ۱ می‌باشد.

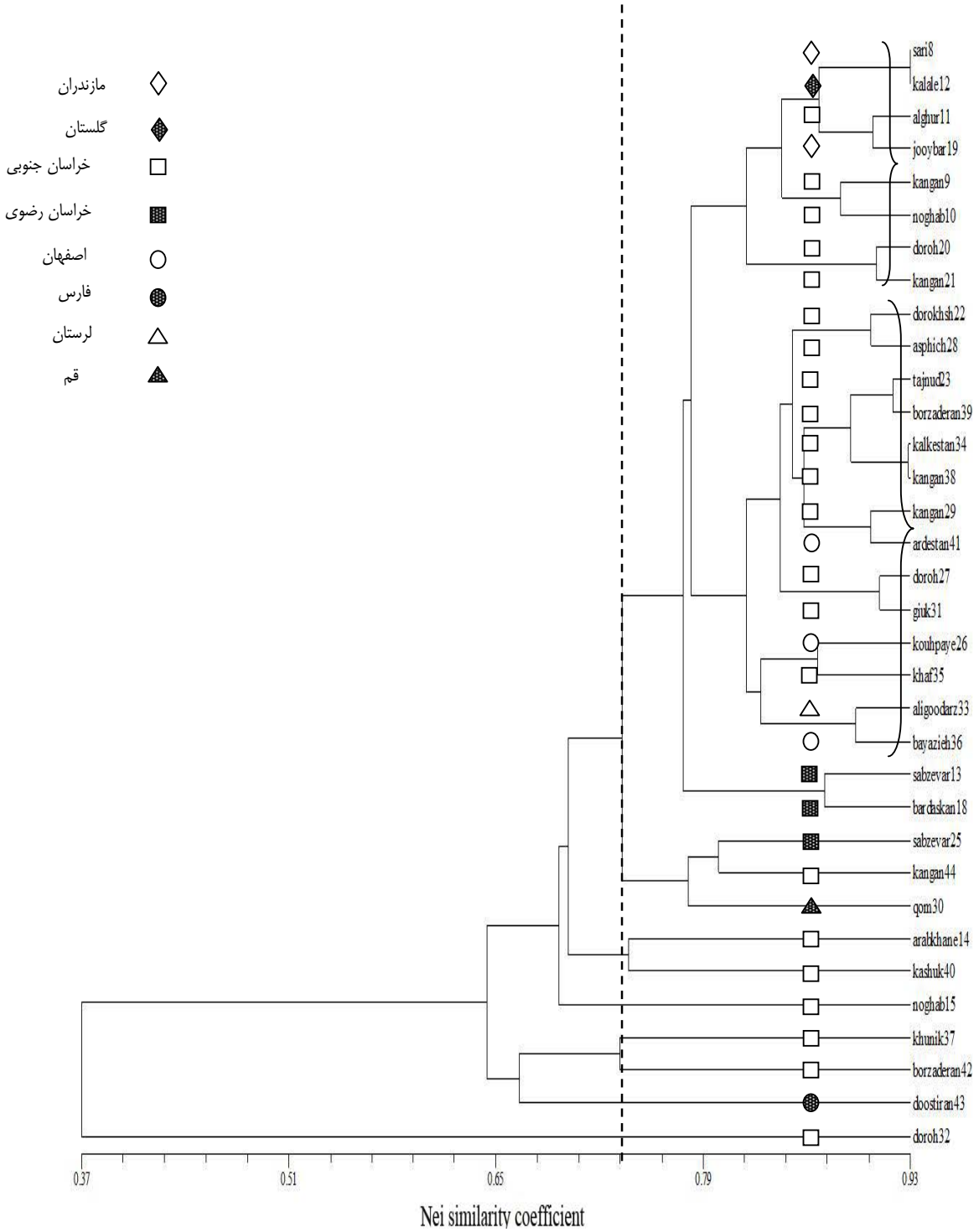
گروه‌بندی اکوتیپ‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای و با استفاده از الگوریتم UPGMA بر مبنای نشانگر مولکولی RAPD انجام گرفت. نتایج حاکی از وجود حداقل دو گروه اصلی در ضریب شباهت ۰/۸ بود (شکل ۲). گروه اول شامل اکوتیپ‌های ساری، کلاله، جویبار، نوغاب، القور، کنگان، درح بود و در گروه دوم نمونه‌های درخش، آسفیچ، تجنود، برزادران، کلکستان، کنگان، درح، گیوک،خواف، الیگودرز، اردستان، کوهپایه و بیاضیه قرار گرفت.

در نگاهی کلی، اکوتیپ‌های مازندران و گلستان به همراه خراسان جنوبی در گروه اول دسته‌بندی شدند و در گروه دوم نیز اکوتیپ‌های اصفهان و خراسان جنوبی قرار گرفتند. همچنین اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در تمام گروه‌ها حضور داشتند.

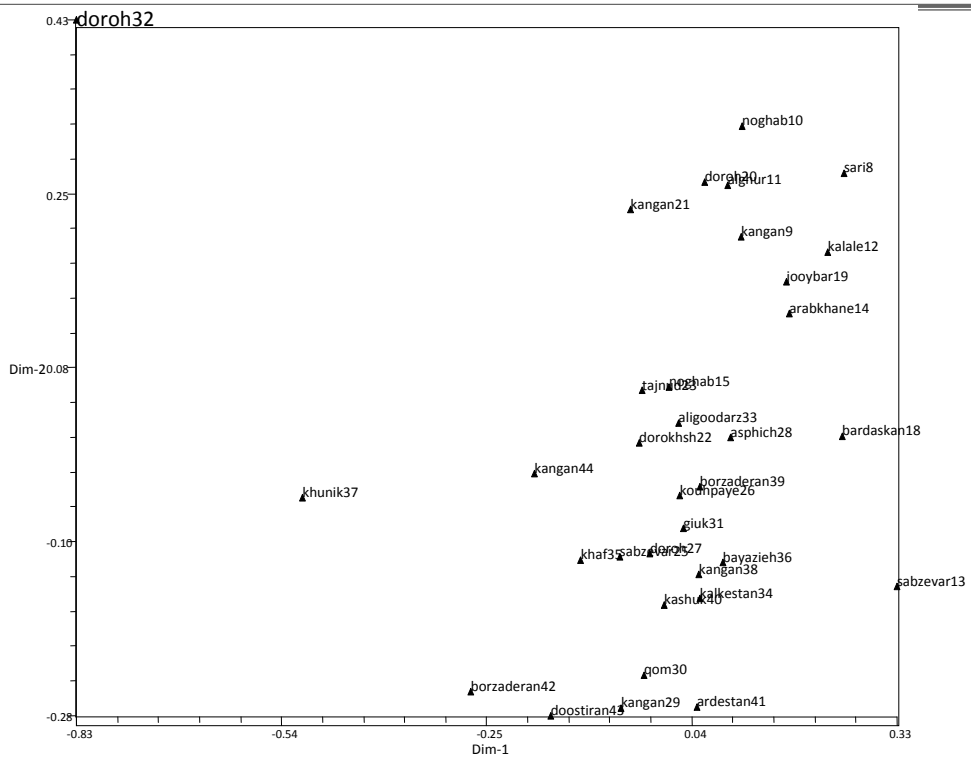
در تجزیه چندبعدی با استفاده از نرم‌افزار NTSYS نمودار دو بعدی MDS ترسیم گردید. تجزیه چندبعدی ۳۴ اکوتیپ عناب (شکل۳) نیز نشان داد اکوتیپ‌های خونیک (khunik37)، برزادران (borzaderan42) و درح (doroh32) در فاصله دورتری از سایر اکوتیپ‌ها قرار دارند. همچنین با توجه به پراکنش نمونه‌ها می‌توان گفت باز هم وجود دو گروه اصلی مشاهده شده و بیشترین تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های خراسان جنوبی وجود دارد. نتایج حاصل از این آنالیز مؤید نتایج تجزیه خوشه‌ای بود.

همچنین به منظور آنالیز روابط مولکولی جمعیت‌های عناب ایران میزان تنوع ژنتیکی بین هشت جمعیت از اکوتیپ‌های عناب ایران محاسبه شد و ماتریس شباهت با استفاده از ضریب نی (۱۶) و توسط نرم‌افزار POPGENE3.2 تعیین شد. بر این اساس تشابه ژنتیکی میان هر جفت از جمعیت‌ها بین ۰/۵۱ تا ۰/۹۲ متغیر بود. اکوتیپ‌های مازندران و گلستان کمترین اختلاف و اکوتیپ فارس بیشترین اختلاف را با بقیه اکوتیپ‌ها نشان داد (شکل ۴). با تجه به این دندروگرام، سه گروه شامل اکوتیپ‌های شمال (استان‌های گلستان و مارندران)، اکوتیپ فارس (استان فارس) و اکوتیپ‌های مرکزی– شرقی (استان‌های خراسان و اصفهان) بر مبنای این نشانگر قابل تفکیک بودند، اگرچه که تعداد اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده در گروه‌های شمال و فارس به دلیل تراکم کمتر و وفور ناچیزتر گونه‌های عناب در این مناطق، در مقایسه با منطقه خراسان جنوبی ارزیابی نتایج را کمی

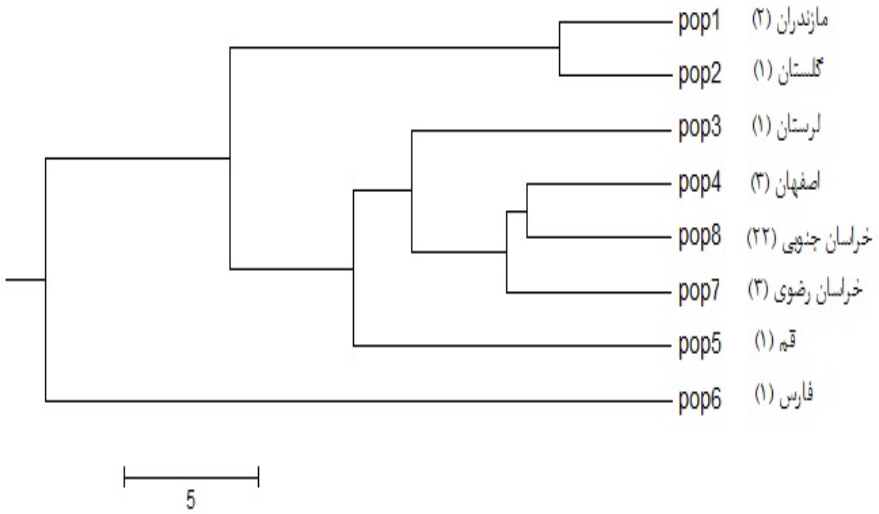
دشوار می‌کند؛ اما قرابت نمونه‌های اصفهان و خراسان جنوبی منشأ مشابهی را برای اکوتیپ‌های این مناطق نشان می‌دهد.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای ۳٤ اکوتیپ عناب ایران



شکل ۳. نمای دو بعدی پراکنش ۳٤ اکوتیپ عناب ایران بر اساس تجزیه چند بعدی



شکل٤- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار POPGENE3.2 برای ۸ جمعیت عناب ایران، اعداد داخل پرانتز تعداد نمونه‌ها در هر جمعیت می‌باشند.

در مجموع، نتایج حاصل از مطالعه نشانگر RAPD مشخص نمود دو گروه اکوتیپ‌های شمال و اصفهان با اکوتیپ‌های خراسان جنوبی قرابت بیشتری دارند، به نظر می‌رسد که این اکوتیپ‌ها تنوع خود را از تنوع موجود در اکوتیپ‌های خراسان جنوبی دریافت کرده‌اند و توانسته‌اند به عنوان هسته‌های احتمالی تنوع در ایران مطرح شوند. همچنین با توجه به دندروگرام حاصل و حضور اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در تمامی گروه‌ها و با توجه به اینکه خراسان جنوبی از دیرباز محل کشت عناب بوده است، به نظر می‌رسد این ناحیه می‌تواند به

عنوان مبدأ احتمالی پراکنش عناب در ایران مطرح شود. خاکدامن و همکاران (۳) نیز با بررسی‌های مورفولوژیک روی این گیاه، به این نتیجه رسیدند که گروه خراسانی یکی از مبادی اصلی و مرکز تنوع برای بسیاری از اکوتیپ‌ها می باشد. شایسته (۴) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های عناب ایران با استفاده از نشانگر ISSR نتیجه گرفت که نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای حاکی از حضور اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در همه دسته‌ها بوده و تنوع قابل مشاهده در خراسان جنوبی با تنوع حاکم بر کشور تا حدود زیادی مطابقت دارد به علاوه نمونه‌های استان‌های اصفهان و مازندران نیز تنوع مطلوبی را نشان دادند. باید توجه داشت که علی رغم تلاش گسترده برای جمع‌آوری نمونه‌ها از تمامی استان‌های کشور، نمونه‌های عناب موجود در فلور طبیعی منطقه در بسیاری از استان‌ها یافت نشد.

به طور کلی، با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد تکنیک RAPD می‌تواند به عنوان یک تکنیک مولکولی ساده مبتنی بر PCR و نسبتاً مطمئن و قابل اعتماد، در تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در گیاه عناب به کار رود. اگرچه بررسی مورفولوژیکی اکوتیپ‌های تحت بررسی و انطباق آن با نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی نیز بسیار مفید واقع خواهد شد. به علاوه استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر به ویژه نشانگرهای هم‌بارز برای گروه‌بندی اکوتیپ‌های مورد مطالعه و مقایسه آن با نتایج نشانگر RAPD و افزایش پراکنش نمونه‌های مورد مطالعه با تکمیل بیشتر کلکسیون کشور جهت بررسی بهتر جمعیت‌های عناب ایران پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱- ثابتی، ح. ۱۳۷۳. جنگلها، درختان و درختچه‌های ایران. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه یزد، یزد.

۲- حسین‌آوا، س. و ا. سیفی.۱۳۸۱. عناب. انتشارات فنی معاونت ترویج سازمان تات، تهران:۱۷.

۳- خاکدامن، ح.، ع. پور میدانی، و م. ادنانی. ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف عناب ایران با استفاده از تجزیه خوشه‌ای. فصل‌نامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱۴ شماره ۴، صفحه ۲۱۴-۲۰۲.

۴- شایسته، ه. ۱۳۸۹. بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های عناب ایران با استفاده از نشانگر ISSR. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.

۵- غوث، ک. ۱۳۸۸. عناب میوه فراموش شده. چاپ اول، انتشارات جهاد کشاورزی خراسان جنوبی. ۵۸۰ صفحه.

۶- فارسی، م. و ع. باقری، ۱۳۸۳. اصول اصلاح نباتات. چاپ چهارم، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد. ۳۸۰ صفحه.

7- 7-Adetula, O.A. 2006. Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs. African journal of biotechnology 5:120-122.

8- 8-Bai, R.X., J.Y. Peng, L. Li, Y. Zhang, B. Han and L.S. Zhang. 2009. An improved protocol suitable for polymorphism studies in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). Acta horticulturae 840: 97-106.

9- 9-Devanshi, A.K, A.K. Singh, P. Sharma, B. Singh, R. Singh and N.K. Singh. 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.

10- 10-Fu, J-X., C-M. Liu and J-H. Xie. 2007. Identification and classification of Ber cultivars based on ISSR and RAPD analysis. Acta horticulturae 764: 119-126.

11- 11-Khan, A.A., F.S. Awan, B. Sadia, R.M. Rana and I.A. Khan. 2010. Genetic diversity studies among colored cotton genotypes by using RAPD markers. Pak. J. Bot. 42(1): 71-77.

12- 12-Kumar, P., V.K. Gupta, A.K. Misra, D.R. Modi and B.K. Pandey. (2009) Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. Plant Omics Journal 2(4): 141-162

13- 13-Li, L., J-Y. Peng and R-X. Bai. 2009. Study on phylogenetic relationship of Chinese ziziphus. Acta horticulturae Sinica 36(4):475-480.

14- 14-Mengjun, L. and Z. Jin. 2003. RAPD analysis on the cultivars, strains and related species of Chinese Jujube. Acta Horticulturae 622: 477-484.

15- 15-Mondini, L., A. Noorani and M.A. Pagnotta. 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools, Diversity 1:19-35

16- 16-Nei, M. and W.H. Li. 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.

17- 17-Peng, J.Y., H.R. Shu, Z.X. Sun and S.Q. Peng. 2000a. RAPD Analysis of germplasm resources on Chinese date. Acta Hort. Sinica 23:171-176.

18- 18-Peng, J-Y., H-R. Shu and S-Q. Peng. 2002. To address the problem of infraspecific classification of *Ziziphus jujba* Mill. Using RAPD data. Acta Phytotaxonomica Sinica 40: 89-94.

19- 19-Ping, L., P. Jianying, P. Shiqi, Z. Junyi and D. Li. 2005. Study on Systematic Relationships of *Ziziphus jujuba* and *Ziziphus spinosa* Using RAPD Technique. Scientia Silvae Sinicae 41(2): 182-185.
20- 20-Rohlf, F.J. 1997. NTSYS-pc numerical taxonomy andmultivariate analysis system, *version 2.0*. Exeter Publications, N.Y.
21- 21-Sarkhosh, A., Z. Zamani, R. Fatahi and A. Ebadi. 2006. RAPD markers reveal polymophism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. Scientia Horticulturae 111:24-29.
22- 22-Semagn, K., Å. Bjørnstad, and M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plant. African Journal of Biotechnology 5(25):2540-2568.
23- 23-Singh, A.K., R. Singh, N.K. Singh. 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): 50-57.
24- 24-Singh, A.K., S. Kumar and G. Kalloo. 2006. Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. Current science 90(5): 711-716.
25- 25-Yeh, F.C, R-C. Yang, T.B.J. Boyle, Z-H. Ye and J.X. Mao. 1999. POPGENE the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
26- 26-Yu, H-P., J-G. Fang, M-Y. Zhang, G. Yang and X. Cao. 2009. Study on application of RAPD marker in cultivar identification of seven fruit crops. Acta Agriculturae Jiangxi 21(10).
27- 27-Zeng, J., Y.P. Zou, J.Y. Bai and H.S. Zheng. 2002. Preparation of total DNA from recalcitrant plant taxa. Acta Botanica Sinica 44:694-697.