



دانشگاه گورگان
فصلنامه علمی و پژوهشی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و هشتم، شماره دوم، ۱۴۰۰

۱۱۵-۱۳۰

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2021.17976.2669

مطالعه مولکولی اکوتیپ‌های مختلف عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.)

در منطقه خراسان جنوبی بر مبنای ژن‌های کلروپلاستی

مریم مودی^{۱*}، سید موسی موسوی کوهی^۱، شعله قلاسی مود^۲ و اختر ایوبی^۳

^۱استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران،

^۲استادیار گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

^۳دانشجوی دکترا، دانشکده علوم، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: عناب *Ziziphus jujuba* Mill. یکی از گیاهان باغی و دارویی مهم در ایران و متعلق به خانواده Rhamnaceae است. تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گونه *Z. Jujuba* در ایران در سال ۲۰۰۶ و در سال ۲۰۰۷ رده‌بندی درون جنس برای ۱۹ گونه توسط تجزیه هم‌زمان صفات ریخت‌شناختی و روش‌های مولکولی صورت گرفته است. هدف از این مطالعه انجام DNA بارکدینگ و تجزیه و تحلیل مولکولی اکوتیپ‌های متفاوت عناب با استفاده از دو ژن کلروپلاستی *rbcL* و *matK* است.

مواد و روش‌ها: برای این منظور تعداد ۲۵ اکوتیپ عناب از استان خراسان جنوبی و پنج استان دیگر کشور مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین دو جنس خویشاوند نزدیک از همین خانواده (*Sangoisorba* sp., *Rosa* sp.) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. خالص‌سازی (پالایش پروتئین و پلی‌ساکارید) با استفاده از روش دستی انجام شد. سپس ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و کیفیت DNA نیز با استفاده از نتایج الکتروفورز ژل آگاروز تخمین زده شد. ژن‌های کلروپلاستی از DNA استخراج شده با استفاده از تکنیک PCR تکثیر شدند. تمام توالی‌های حاصل از خوانش فوروارد و معکوس در این مطالعه برای تولید توالی نهایی با استفاده از نرم‌افزارهای مناسب سرهم شدند.

یافته‌ها: بارکد DNA هر گونه برای شناسایی سریع، دقیق و خودکار گونه‌ها انجام شد و تمام توالی به‌دست آمده از این مطالعه به NCBI (مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری) ارسال شد و ثبت گردید. نتایج نشان می‌دهد بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های عناب و دو نمونه از گروه خارجی وجود دارد و تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین اکوتیپ‌های مختلف عناب وجود ندارد و تفاوت‌های ریخت‌شناختی ناشی از شرایط بوم‌شناسی می‌باشد. اگرچه تحلیل داده‌های ترکیبی ژن‌ها بینش اطلاعاتی بیش‌تری نسبت به تحلیل جداگانه داده‌های توالی ارائه داد. طبق نتایج بیش‌ترین تنوع در اکوتیپ‌های خراسان جنوبی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به گستره شبکه‌های هاپلوטיפی، خراسان جنوبی می‌تواند به‌عنوان یکی از خاستگاه‌های اصلی عناب در ایران معرفی گردد. مطالعات پیشین کاملاً نتایج حاصله از این مطالعه را تأیید می‌کند. با این حال، با در نظر گرفتن اهمیت اقتصادی

* مسئول مکاتبه: maryammoudi@birjand.ac.ir

گیاهان عناب در جهان، ایران و به‌ویژه خراسان جنوبی استفاده از نمونه‌های بیش‌تر و ژن‌های بیش‌تر به‌خصوص ژن‌های هسته‌ای برای مطالعه دقیق‌تر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی این اکوتیپ‌ها پیشنهاد می‌شود. اگرچه برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر مطالعه بر روی تعداد گونه‌های بیش‌تر از مناطق مختلف ایران و استفاده از ژن‌های هسته‌ای پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های کلروپلاستی، عناب، DNA بارکدینگ، *rbcl matK*

مقدمه

جنس *Ziziphus jujuba* Mill. یکی از مهم‌ترین جنس‌های خانواده Rhamnaceae می‌باشد. این جنس حدود ۱۷۰ گونه دارد که همگی به‌طور عمده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنش یافته و تعداد کمی از آن‌ها در نواحی معتدل یافت می‌شوند (۲). اما با این‌حال به خوبی در خاک شور و در محیطی گرم و خشک رشد می‌کند و هم‌چنین در برابر سرما در فصل زمستان مقاوم است (۱۱). این گیاه بومی آسیای جنوب شرقی، مرکزی و قفقاز است، که در برخی از کشورها مانند چین و هند، افغانستان، پاکستان و ایران کشت شده و سپس به کشورهای اطراف دریای مدیترانه از جمله شمال سوریه، ایتالیا، فرانسه، اسپانیا و شمال آفریقا برده شده است. درخت عناب در ایران، عمدتاً در استان‌های خراسان، گلستان، مازندران، گیلان، فارس، اصفهان، یزد، کرمان، لرستان، همدان، تهران، قزوین و قم کشت می‌شود (۲۱). عناب گیاهی درختچه‌ای و خاردار است با برگ‌های براق و به رنگ سبز روشن، دارای گل آذین‌گرنزی و خوشه با گل‌های کوچک که تخمدان آن توسط دیسک‌های شهد ساز احاطه شده است (۲۰). درخت عناب برگ‌های خود را در فصل زمستان از دست می‌دهد و زمان گلدهی آن فصل بهار می‌باشد. ارقام مختلف عناب از نظر اندازه و ریخت‌شناسی متفاوت هستند. پس از ۳۰ سال، اکثر ارقام آن به طول ۴ الی ۵ متر با قطر تاج ۱/۷۶ متر رشد خواهند کرد و اکثراً از ۱ تا ۴ سال پس از کاشت میوه می‌دهند (۱۱). دو گونه *Ziziphus jujuba* Mill. and *Z. mauritiana* Lam. (synonym: *Z. jujuba* Lam. non-Mill.)

مهم‌ترین گونه‌های عناب خوراکی هستند. *Z. jujuba* Mill. گونه‌ای دیپلوئید است ($2n=2x=24$; genome size: 437.65 Mb) (۲۴ و ۲۵). این دو گونه گستردگی فراوانی در جهان دارند (۲۳). در حالی که برخی از گونه‌های دیگر این گیاه در مقیاس محلی‌تر کشت می‌شوند. با این‌حال، درخت‌های عناب محصولات نسبتاً کمی تولید می‌کنند، اگرچه تقاضا برای تولید و مصرف باعث شده در بسیاری از مناطق به فکر بومی کردن درخت این میوه ارزشمند باشند (۲).

میوه درخت عناب مغذی بوده و خواص دارویی بسیاری دارد. از نظر شیمیایی، عناب حاوی ۸۳-۸۱ درصد رطوبت، ویتامین‌ها (به ویژه ویتامین ث)، قندها (۲۲ درصد؛ گالاکتوز، فروکتوز و گلوکز)، اسیدهای آلی (اسید سیتریک، مالونیک و اسیدهای مالیک)، مواد معدنی (کلسیم، فسفر، پتاسیم و آهن)، اسیدهای آمینه (۸ درصد؛ گلوتامین، پرولین، سرین و آسپارژین)، فیبر (۱/۳ درصد) و فلاونوئیدها می‌باشد (۵ و ۱۹). علاوه بر مصارف دارویی، از این درختچه در جلوگیری از فرسایش خاک و بیابان‌زایی بسیار استفاده شده است (۳۰). عناب یکی از محبوب‌ترین درختان بومی کشت شده در چین بوده و بیش‌تر از ۳۰۰۰ سال است که برای مصارف خوراکی و پزشکی استفاده شده و به‌طور گسترده‌ای در فرهنگ سنتی چین ریشه دوانده است (۱۷).

تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گونه *Z. jujuba* در ایران با استفاده از تجزیه خوشه‌ای توسط خاکدامن و همکاران (۲۰۰۷)، بررسی شد. تجزیه واریانس داده‌ها از مطالعه صفات ریخت‌شناختی ۲۹ اکوتیپ،

ژن‌های کلروپلاستی که به‌طور معمول در مطالعات تبارزایی استفاده می‌شود عبارتند از: ژن کربوکسیلاز ریبولوزی فسفات، ژن *Maturase k* و *trnL-F*. شناسایی گونه‌ای برای ماینوتورینگ و حفاظت تنوع زیستی در مقیاس بزرگ ضروری است (۶). هدف اصلی بارکدینگ DNA تایید گونه‌های شناخته شده توسط مقایسه توالی‌های ژنومی آن‌ها با مقایسه توالی‌ها با توالی‌های بارکد مرجع^۵ و تسهیل شناسایی گونه‌های جدید است (۱۳ و ۳۴). در عصر پس‌ژنومی، زیست‌شناسان مولکولی مفهوم DNA بارکدینگ را به‌عنوان استاندارد جهانی برای شناسایی زیستی معرفی کردند. این فناوری بر استفاده از نواحی استاندارد از DNA به‌عنوان شناسه‌ای برای شناسایی دقیق گونه‌هایی با منشأ زیستی استوار است (۲۲). بارکدینگ DNA یک روش مطالعه با کارایی بالا برای شناسایی گونه‌ها است که می‌تواند در نمونه‌هایی که دارای توالی DNA کوتاه قابل‌اعتماد یا حتی گونه‌هایی که DNA به شدت تخریب شده دارند، مثل نمونه‌های موجود در غذاهای فرآوری شده، نمونه‌های هرباریومی و بقایای فسیلی، استفاده شود. به هر حال برخی پژوهشگران استفاده از آن را برای شناسایی تا حد خانواده تصدیق کرده‌اند اما شناسایی در حد جنس یا گونه را معتبر نشمده‌اند (۳۶). مطالعات زیادی بر بارکدینگ گیاهان انجام شده که نواحی استاندارد ژنومی را در گروه‌های مختلف گیاهی با این هدف که وسیله‌ای سریع، دقیق و خودکار برای شناسایی با استفاده از نواحی استاندارد DNA به‌عنوان یک شناسه پیدا کنند مورد آزمون قرار داده است (۱۳ و ۱۴).

Chase و همکاران (۲۰۰۵) استفاده از دو گزینه؛ یکی ترکیب سه ناحیه *rpoB*، *rpoC1*، *matK* برای پروتکل استاندارد بارکدینگ تمام گیاهان خشکی و

تفاوت‌های معنی‌داری در صفات ریختی مانند زاویه شاخه‌ها با تنه، تعداد خارها در شاخه، طول شاخه، شکل برگ، طول دم‌برگ، طول برگ، عرض برگ و رنگ برگ نشان داد. فقط طول بزرگ‌ترین خار در شاخه تفاوت معنی‌داری نشان نداد. مقایسه مقادیر میانگین، تغییرات بارزی در بین اکوتیپ‌ها نشان داد. بر اساس نتایج پژوهشگران یادشده تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای بین اکوتیپ‌ها در صفات ریخت‌شناختی وجود دارد. بر اساس مطالعات پیشین و با در نظر گرفتن تفاوت‌های بین گونه‌ای، به نظر می‌رسد انجام مطالعه مولکولی و بارکدینگ DNA قادر است، وجود یا عدم وجود اختلافات ژنتیکی را روشن‌تر کند.

ابزارهای مولکولی بسیاری تاکنون برای مطالعه تبارزایی و ساختار جمعیتی و روابط ژنتیکی بین عناب و عناب وحشی استفاده شده است. در سال ۲۰۰۶ رده‌بندی درون جنس برای ۱۹ گونه توسط تجزیه هم‌زمان صفات ریخت‌شناختی و روش‌های مولکولی بر پایه rDNA هسته‌ای، *internal transcribed spacers*، *26S rDNA* و *trnL-F intergenic spacer* پلاست انجام شد (۲۰). از سال ۲۰۰۰، پژوهش‌های زیادی بر روابط ژنتیکی بین ارقام مختلف عناب و یا عناب وحشی با استفاده از نشانگرهای مولکولی شامل ^۱AFLP، ^۲SRAP، ^۳SSR، ^۴RAPD تمرکز داشته است (۹ و ۱۷).

داده‌های مولکولی استفاده شده در سیستماتیک گیاهی از دو منبع ناشی می‌شود: DNA کلروپلاست (cpDNA) و DNA ریبوزومی هسته (۳۱). DNA کلروپلاست در تحلیل تبارزایی گیاهان بیش‌تر از سایر داده‌ها استفاده شده است. استفاده از cpDNA به‌صورت وسیعی بازنگری شده است (۲۷). برخی از

- 1- Amplified fragment length polymorphisms
- 2- Sequence-related amplified polymorphisms
- 3- Simple sequence repeats
- 4- Random amplified polymorphic DNA

5- Reference libraries of barcode sequences

داده‌های مولکولی DNA برای نمونه‌های جمع‌آوری شده، انجام شد. هدف از این مطالعه مولکولی گونه‌های عناب جمع‌آوری شده به منظور تعیین فاصله ژنتیکی بین آن‌ها و همچنین دستیابی به شبکه‌های هاپلوتایپی بین اکوتیپ‌های مورد نظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مجموعه ۲۵ نمونه تازه *Z. jujuba* متعلق به نواحی مختلف خراسان جنوبی و استان‌های گلستان، فارس، اصفهان، مازندران، خراسان رضوی و قم که در باغ گیاه‌شناسی سریشه خراسان جنوبی کشت و نگهداری شده است و دو جنس از خانواده *Rosaceae* (*Sangoisorba* sp., *Rosa* sp) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. تمام نمونه‌ها پس از خشک کردن در هرباریوم دانشگاه بیرجند نگهداری شد (جدول ۱).

دوم ناحیه trnH-psbA spacer را پیشنهاد کردند (۴).

Newmaster و همکاران (۲۰۰۸) برای شناسایی خانواده Myristicaceae، ژن‌های *matK* و *trnH-psbA* را پیشنهاد دادند (۲۶). سرانجام Hollingsworth و همکاران (۲۰۰۹) در کنسرسیوم بارکدینگ حیات (CBOL) ژن‌های *rbcL* و *matK* را به عنوان هسته مرکزی در DNA بارکدینگ گیاهان خشکی پیشنهاد کردند (۱۶). در این بررسی بارکدینگ گونه‌های جنس *Cymbidium* در تایلند انجام شده است. بارکدینگ نواحی *trnH-psbA* و *matK rpoC1 rpoB* از هر گونه برای شناسایی سریع، دقیق و اتوماتیک گونه‌ها در گیاهانی که فاقد گل بوده یا ویژگی‌های مورفولوژیکی ناقصی داشته یا نابالغ بودند، انجام شد. در این مطالعه، آزمایش‌هایی به منظور دریافت روابط بین ۲۵ اکوتیپ مختلف *Z. jujuba* با استفاده از

جدول ۱- لیست گونه‌های مطالعه شده و شماره ورود به بانک ژن در NCBI.

Table 1. List of studied Taxa and the Gene Bank Accession Numbers in NCBI.

نمونه Samples	موقعیت Location	شماره ورود Voucher Number	شماره ورود در بانک ژن Gene Bank Accession Number	
			<i>rbcL</i>	<i>matK</i>
1 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	درح سریشه (استان خراسان جنوبی) Doroh Sarbisheh 1 (South Khorasan Province)	DSSKH1	MF574650	MF574623
2 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کلاله چشمه (استان گلستان) Kolaleh cheshmeh aghsoo (Golestan Province)	KHG	MF574651	MF574624
3 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کوشک بیرجند (استان خراسان جنوبی) Kashouk Birjand (South Khorasan Province)	KBSKH	MF574652	MF574625
4 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	انبرستان سبزوار ۱ (استان خراسان رضوی) Anbarestan Sabzevar 1 (Razavi Khorasan Province)	ASRKH	MF574653	MF574626
5 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	گزیک درمیان (استان خراسان جنوبی) Gazik Darmian (South Khorasan Province)	GDSKH	MF574654	MF574627
6 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کازرون شیراز (استان فارس) Kazeroun Shiraz (Fars Province)	KSF	MF574655	MF574628
7 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	القور بیرجند (استان خراسان جنوبی) Alghour Birjand (South Khorasan Province)	ABSKH	MF574656	MF574629
8 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	اردستان (استان اصفهان) Ardestan (Esfahan Province)	AE	MF574657	MF574630
9 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	دوراهی سریشه (استان خراسان جنوبی) Doroh Sarbisheh 2 (South Khorasan Province)	DSSKH2	MF574658	MF574631
10 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	مقام ساری (استان مازندران) Mogham Sari (Mazandaran Province)	RSM	MF574659	MF574632

ادامه جدول ۱-۱

Continue Table 1.

نمونه Samples	موقعیت Location	شماره ورود Voucher Number	شماره ورود در بانک ژن Gene Bank Accession Number	
			<i>rbcL</i>	<i>matK</i>
11 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	تاجنود قائن (استان خراسان جنوبی) Tajnood Ghaein (South Khorasan Province)	TGHSKH	MF574660	MF574633
12 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کنگان سریشہ ۲ (استان خراسان جنوبی) Kangan Sarbisheh 2(South Khorasan Province)	KSSKH2	MF574661	MF574634
13 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	جویبار (استان مازندران) Joibar (Mazandaran Province)	JM	MF574662	MF574635
14 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	نوغاب (استان خراسان جنوبی) Noghab (South Khorasan Province)	NSKH	MF574663	MF574636
15 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کنگان سریشہ ۱ (استان خراسان جنوبی) Kangan Sarbisheh 1(South Khorasan Province)	KSSKH1	MF574664	MF574637
16 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	عربخانه نهبندان (استان خراسان جنوبی) Arabkhaneh Nehbandan (South Khorasan Province)	ANSKH	MF574665	MF574638
17 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	گیوک بیرجند (استان خراسان جنوبی) Gook Birjand (South Khorasan Province)	GBSKH	MF574666	MF574639
18 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کنگان سریشہ (استان خراسان جنوبی) Kangan Sarbisheh (South Khorasan Province)	KSSKH	MF574667	MF574640
19 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	انبرستان سبزوار ۲ (استان خراسان رضوی) Anbarestan Sabzevar 2(Razavi Khorasan Province)	ASRKH2	MF574668	MF574641
20 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	قم (استان قم) Qom (Qom Province)	GG	MF574669	MF574642
21 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	کوهپایه (استان اصفهان) Kouhpaieh (Esfahan Province)	KE	MF574670	MF574643
22 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	بیاضه (استان اصفهان) Baiazieh (Esfahan Province)	BE	MF574671	MF574644
23 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	شارضا (استان اصفهان) Shahreza (Esfahan Province)	SE	MF574672	MF574645
24 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	آسفیج (استان خراسان جنوبی) Asfij Sarbisheh (South Khorasan Province)	ASSKH	MF574673	MF574646
25 <i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	درخش درمیان (استان خراسان جنوبی) Dorokhsh Darmian (South Khorasan Province)	DDSKH	MF574674	MF574647
26 <i>Rosa</i> sp. (Outgroup1)	هرباریوم دانشگاه بیرجند Herbarium of University of Birjand	RH1	MF574675	MF574648
27 <i>Sangoisorba</i> sp. (Outgroup2)	هرباریوم دانشگاه بیرجند Herbarium of University of Birjand	SH1	MF574676	MF574649

با غلظت ۱۰ میکرومول)، در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود. انکوباسیون مخلوط واکنش برای ژن *rbcL* در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه انجام شد و چرخه حرارتی زیر به منظور تکثیر استفاده شد: ۳۳ سیکل واسرشت‌سازی برای ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه آنلینگ اتصال در دمای ۵۵ درجه، یک دقیقه طول‌سازی در دمای ۷۲ درجه و ۵ دقیقه طول‌سازی نهایی در ۷۲ درجه. همچنین برای ژن *mtak* انکوباسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و تکثیر با چرخه حرارتی: ۳۴ سیکل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۲۰ ثانیه آنلینگ در دمای ۵۲ درجه، ۵۰ ثانیه طول‌سازی در دمای ۷۲ درجه و ۵ دقیقه طول‌سازی نهایی در ۷۲ درجه. DNA تکثیر شده با الکتروفورز ژل آگاروز سنجیده و سپس بازیابی شد و با استفاده از سیستم خالص‌سازی Promega^۴ طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شد.

محصولات PCR خالص‌سازی شده برای توالی‌یابی به شرکت MacroGen، کره جنوبی فرستاده شد. تمام توالی‌های DNA به دست آمده برای این مطالعه کدون‌های توقف مورد بررسی قرار گرفت و سپس به مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) ارسال شد. کد دسترسی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. جستجوی توالی‌های نوکلئوتیدی در پایگاه NCBI BLAST (ابزار پایه‌ای برای جستجوی برهم نهی‌های موضعی^۵) برای بررسی شباهت توالی‌ها انجام شد. تمام توالی‌های DNA که در این مطالعه به دست آمد، با توالی‌های پایگاه داده NCBI مقایسه شد. بیش‌تر توالی‌ها query coverage بیش از ۹۰ درصد (با مقدار E-value برابر با صفر) نشان دادند. تمام توالی‌های حاصل از خوانش فوروارد و معکوس در

استخراج DNA و PCR و توالی‌یابی: روش CTAB^۱ آن‌گونه که قبلاً توسط Wang و همکاران (۲۰۰۴) تشریح شده است با تغییرات جزئی استفاده شد (۴۱). طی استخراج DNA برای نمونه‌هایی که DNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی مناسب نبود، خالص‌سازی (پالایش پروتئین و پلی‌ساکارید) با استفاده از روش دستی انجام شد. سنجش کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز در ژل ۰/۸ درصد (حجمی/ وزنی) آگاروز انجام شد. سپس ژل در معرض ولتاژ ۷۰ قرار گرفت و با استفاده از اتیدیوم بروماید^۲ برای ۳۰ تا ۴۵ دقیقه (بسته به غلظت اتیدیوم بروماید) رنگ‌آمیزی شده و در زیر نور لامپ فرابنفش^۳ مشاهده شد و سپس با DNA لدر استاندارد (100 bp DNA ladder, Promega) مقایسه شد. کیفیت DNA نیز با استفاده از نتایج الکتروفورز ژل آگاروز تخمین زده شد. باندهای مشخص و شفاف بدون هرگونه اسمیر در اطراف، نشانه قابل اعتمادی از کیفیت خوب DNA محسوب می‌شود.

برای ژن *mtak* جفت پرایمر استفاده شده، شامل 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTAC-3' و 5'-ACCCAG GAG-3' به عنوان پرایمر فوروارد و 5'-ATGTACACCACAAAC-3' و 5'-GTAAAATCAAGTCCACCACG-3' به عنوان پرایمر معکوس بود. برای ژن *rbcL* توالی پرایمر فوروارد به صورت 5'-ATGTACACCACAAAC-3' و پرایمر معکوس 5'-GTAAAATCAAGTCCACCACG-3' بود (۳).

برای تکثیر ژن‌ها، مخلوط واکنش حاوی حدود ۱۰-۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۵ میکرولیتر بافر واکنش dNTPs (هر یک ۲،۵ mM)، ۲/۰ تگ پلیمرز و ۱ میکرولیتر از هر کدام پرایمر الیگونوکلئوتیدی (هر یک

4- Wizard® PCR Preps DNA Purification System
5- Basic Local Alignment Search

1- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
2- Ethidium bromide
3- Ultra Violet

تعیین احتمال پسین کلادها مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این جهت تجزیه و تحلیل شبکه haplotype، نرم‌افزار NETWORK v. 5.0.0.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل توالی‌ها: توالی ژن *rbcL* از ۲۵ اکوتایپ *Z. jujuba* و دو جنس از خانواده Rosaceae به‌عنوان گروه خارجی به‌دست آمد. توالی‌های همتراز شده شامل ۵۲۹ نوکلئوتید بود؛ ۴۷۸ کاراکتر در میان تمام تاکسون‌ها حفاظت شده بودند، ۵۱ کاراکتر متغیر بودند و ۲۸ مورد از نظر پارسیمونی حاوی اطلاعات بود. اریب $R = 7/1$ Transition/Transversion تخمین زده شد. فراوانی نوکلئوتید $\%A = 26.1$ ، $\%T = 30.2$ ، $\%C = 20.7$ و $\%G = 23.1$ بود. الگوی جایگزینی و برآورد نرخ‌ها، مدل Kimura 2-parameter بود (۳۷). توالی ژن *matK* نیز از ۲۵ اکوتایپ *Z. jujuba* و دو جنس از خانواده Rosaceae به‌عنوان گروه خارجی کسب شد. توالی‌های همتراز شامل ۷۹۳ کاراکتر نوکلئوتیدی بودند که ۶۳۵ کاراکتر حفاظت شده بودند، ۱۵۸ مورد متغیر بودند و ۱۱۲ مورد در میان همه تاکسون‌ها از نظر پارسیمونی حاوی اطلاعات بود. اریب تقریبی $R = 8/0$ Transition/Transversion بود. فراوانی نوکلئوتید $\%A = 29.5$ ، $\%T = 36.5$ ، $\%C = 17.5$ و $\%G = 16.5$ بود. الگوی جایگزینی و نرخ پارامترها مدل Tamura 3-parameter بود (۳۷). در این مطالعه دو مارکر از نواحی مختلف کلروپلاست استفاده شد. یکی از ژن‌های مورد استفاده در این مطالعه *rbcL* بود. ناحیه *rbcL* یکی از نشانگرهایی است که به‌طور گسترده‌ای برای مطالعات فیلوژنتیک استفاده شده است.

این مطالعه برای تولید توالی نهایی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ver. 7.0.2 سرهم شدند (۱۲). همتراز کردن توالی‌هایی که در این مطالعه به‌دست آمد و نیز توالی‌های بازیابی شده از NCBI با استفاده از CLUSTAL X انجام شد (۴۰).

تحلیل توالی‌های DNA: قطعات DNA اختصاصی تکثیر شده نمونه‌های مورد مطالعه توالی‌یابی شدند و توالی‌ها به NCBI ارسال شد (جدول ۱). اطلاعات مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزارهای PAUP * 4.0 و MEGA6 دوباره به‌صورت دستی همتراز شد (۳۵-۳۹). برای تعیین مدل بهینه، بهترین مدل تحلیل پیشینه احتمال (ML) با استفاده از MEGA6 برای ساختن درخت ML، Tamura 3-parameter تخمین زده شد. روش ML برای پیدا کردن درخت بهینه با جستجوی اکتشافی (heuristic) در PAUP * 4.0، با مبادله انشعاب TBR و ۱۰ تکرار افزودن توالی تصادفی انجام شد. سطوح حمایت با ۵۰۰ تکرار بوت استرپ (BP) با استفاده از الگوریتم TBR مبادله انشعاب برای ۱۰ تکرار به‌صورت تصادفی در هر تکرار بوت استرپ تخمین زده شد. تحلیل پیشینه احتمال برای هر ژن با استفاده از PAUP * 4.0 و MEGA 6 انجام شد. استنباط بیزین با استفاده از MrBayes 3.0 (۱۸) برای محاسبه احتمال‌های پسین با مدل بهینه تکامل توالی‌ها تعیین شده از LRTs انجام شد. MrBayes با ۱ در ۱۰۶ نسل زنجیره مارکوف اجرا شد. بازبینی گرافیکی log likelihood درخت در این نمونه نشان داد که در حدود ۱۰۰،۰۰۰ نسل، حالت ثابت به‌دست آمده است و بنابراین، اولین ۱۰۰،۰۰۰ نسل (۱۰۰۰ درخت انتخاب شده) به‌عنوان سوزانده شده کنار گذاشته شد و از ۹۰۰،۰۰۰ نسل باقی‌مانده (۹۰۰۰ درخت نمونه) در تمام تجزیه و تحلیل‌های پس از آن استفاده شد. درخت اجماع اکثریت از ۹۰۰۰ درخت باقیمانده محاسبه شد و برای

استفاده از نسخه ۶ نرم‌افزار MEGA مورد آزمایش قرار گرفت. گونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف برای شناسایی سریع، دقیق و خودکار گونه‌ها انجام شد. توالی‌ها به پایگاه داده GenBank ارسال شد. اعداد دسترسی GenBank در جدول ۱ ذکر شده است. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل Tamura انجام شد (۳۸). تمام جایگاه‌های حاوی وقفه و داده‌های گم شده حذف شدند. مجموعاً ۴۵۲ جایگاه در مجموعه داده نهایی وجود داشت. تجزیه و تحلیل تکاملی در MEGA6 انجام شد (۳۹). نتایج نشان داد که بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های عناب و دو نمونه از گروه خارجی وجود دارد. به جز استان فارس، هیچ فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مختلف استان‌ها وجود ندارد. میانگین فاصله‌های ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مختلف عناب جمع‌آوری شده در استان‌های مختلف و گروه خارجی در جدول‌های ۲ و ۳ نمایش داده شده است. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل Tamura Maximum Composite Likelihood انجام شد (۳۸). تمام جایگاه‌های حاوی وقفه و داده‌های گم شده حذف شدند. مجموعاً ۷۸۱ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشت. تجزیه و تحلیل تکاملی در MEGA6 انجام شد. از سوی دیگر، نتایج بر اساس ژن *matK* نشان داد که بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های عناب و دو نمونه گروه خارجی وجود دارد (۰/۲). بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های عناب مربوط به استان اصفهان و گلستان (۰/۰۲) و کم‌ترین مقدار متعلق به استان خراسان رضوی و قم (۰/۰۰) می‌باشد. نتایج جدول ۳ نشان داد که ژن *rbcL* در مقایسه با *matK* برای تشخیص روابط بین اکوتیپ‌ها قابلیت کم‌تری دارد.

تاریخ تکامل با استفاده از روش بیشینه احتمال (ML) و تحلیل بیزین بررسی شد. تجزیه و تحلیل ML نشان داد که تمام اکوتیپ‌ها در مقایسه با گروه

این ژن در بیش از ۵۰۰۰ گونه گیاهی توالی‌یابی شده است (۲۹). این ژن در منطقه تک کپی بزرگ ژنوم کلروپلاست واقع شده و زیرواحد بزرگ ریبولوز ۱ و ۵ بی‌فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز (RUBISCO)، یک آنزیم فتوسنتزی حیاتی، را کدگذاری می‌کند (۳۲). برای درک روابط در سطح خانواده و بالاتر، *rbcL* هم‌چنان اولین انتخاب است، اما در قابلیت کاربرد آن در سطح جنس یا گونه محدودیت وجود دارد. در این مطالعه، ناحیه *rbcL* شامل ۵/۲٪ PIC^۱ است. بنابراین، نتایج نشان داد که این ژن برای تشخیص روابط بین اکوتیپ‌ها مناسب نیست. از سوی دیگر، ناحیه *matK* حاوی ۱۴/۱٪ PIC بود. این ژن یک پروتئین (*maturase*) را کد می‌کند که در پیرایش اینترون‌های گروه II رونوشت‌های RNA دخیل است (۸ و ۴۳). این ژن در منطقه بزرگ تک‌کپی از ژنوم کلروپلاست واقع شده است. با توجه به این‌که در منطقه‌ای بسیار محافظت شده قرار دارد می‌توان آن را به آسانی تکثیر کرد. توالی‌های *matK* می‌تواند درخت فیلوژنتیکی را ایجاد کند که با وضوح و حمایت درخت‌های به‌دست آمده از *atpB* *rbcL* و S18 قابل مقایسه است (۱۵ و ۳۳). استفاده از توالی *matK* به عنوان بارکد برای اولین فرآیند شناسایی بسیار کارآمد بود. در این مطالعه، *matK* حاوی PIC بیش‌تر از *rbcL* بود و نتایج بهتری نشان داد.

تحلیل مولکولی

تحلیل فیلوژنتیک بر اساس نواحی *matK* & *rbcL* استخراج DNA و بارکدینگ DNA با دو ناحیه استاندارد در تمام نمونه‌های مورد مطالعه موفق بوده است. بارکد DNA هر گونه برای شناسایی سریع، دقیق و خودکار گونه‌ها انجام شد. فاصله‌های ژنتیکی برای توالی‌های دو منطقه استاندارد به‌عنوان بارکد، با

داده‌ها برای تجزیه و تحلیل قوی‌تر فیلوژنی ترکیب شدند (۴۲).

بر طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه توسط برنامه‌های Modeltest و MEGA6 مشخص گردید که بهترین مدل برای تحلیل تحلیل بیشینه احتمال برای داده‌های توالی کلروپلاست، Tamura 3-parameter می‌باشد. برای ساخت درخت ML توسط MEGA6، بهترین مدل با استفاده از این نرم‌افزار برآورد شد. بهترین مدل برای تحلیل بیشینه احتمال برای داده‌های توالی کلروپلاست، Tamura 3-parameter بود. درخت ML و BI با یکدیگر مطابقت داشتند. با این حال در تحلیل بیزین، حمایت (PP) کلادها مقادیر بالاتری نسبت به مقادیر بوت استرپ در تحلیل ML نشان دادند. نتایج نشان داد یکی از کلادها دارای احتمال پسین قوی (PP=100%) بود که مربوط به اکوتیپ‌های استان اصفهان است. علاوه بر این، اکوتیپ‌های مقام (مازندران)، کنگان (خراسان جنوبی، سربیشه) و درخش و گزیک (خراسان جنوبی) کلادهایی تک‌نیا تشکیل دادند (pp=100%). از سوی دیگر اکوتیپ‌ها از گیوک و عربخانه (خراسان جنوبی) کلاد تک‌نیایی با pp بیش از ۸۰ درصد تشکیل دادند. در مجموع، با توجه به نتایج، تفاوت ژنتیکی قابل‌توجهی در بین اکوتیپ‌ها مشاهده نشد از یک منظر این امر می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که تمام تفاوت‌های مورفولوژیکی نتیجه شرایط زیست‌محیطی و جغرافیایی است. اگرچه ژنوم کلروپلاست، وراثت مادری دارد بنابراین تنها با استفاده از ژنوم کلروپلاست بیان این موضوع نمی‌تواند با قاطعیت بیان شود و برای به‌دست آوردن نتایج دقیق‌تر مطالعه با استفاده از ژن‌های هسته‌ای پیشنهاد می‌گردد.

خارجی یک کلاد با پشتیبانی بسیار بالا (بوت‌استرپ ۱۰۰٪) ایجاد می‌کنند. با این حال، در میان آن‌ها تمایز وجود نداشته و وضعیت پارافیلیتیک داشتند (شکل‌های ۱ و ۲). این بدان معنی است که تمام تغییرات مورفولوژیک مربوط به شرایط محیطی متفاوت است. تحلیل بیزین (BI) با استفاده از MrBayes 3.0 برای محاسبه احتمالات پسین کلادهای حاصل با مدل تکاملی بهینه توالی‌ها تعیین شده از LRTs انجام شد. برای BI مدل F81 + G به عنوان بهترین مدل تکاملی توالی‌ها در Modeltest 3.7 شناسایی شد (۲۸). نتایج تحلیل بیزین (BI) مشابه با تحلیل ML بود.

تحلیل داده‌های توالی کلروپلاست: تحلیل داده‌های ترکیبی ژن‌ها بینش اطلاعاتی بیش‌تری نسبت به تحلیل جداگانه داده‌های توالی ارائه داد. با این حال، در این آنالیز هم، کلادهای پارافیلیتیک مشاهده شد. اگرچه نتیجه بهتر از تجزیه و تحلیل با هر نشانگر پلاستید به‌صورت جداگانه بود. برای پیدا کردن تطابق بین درخت‌ها از هر منطقه، تست توصیف شده به‌عنوان تمایز تضاد طول (ILD)^۱ اجرا شد (۷). از آزمون pH بین داده‌های کلروپلاست، p-value برابر با ۰/۰۱ به‌دست آمد که ناهمگونی معنی‌داری را نشان داد. با این حال، با توجه به مشاهده حساسیت بالای این آزمون آماری در سایر مطالعات، به‌نظر می‌رسد تست همگنی پارتیشن در مقایسه داده‌های هسته‌ای و کلروپلاستی به طرز مفرطی حساس باشد. از تحلیل داده‌های ترکیب ژن‌ها، در مقایسه با تحلیل جداگانه درختی با روابط روشن‌تر حاصل شد که پشتیبانی بر فرض ما است که آزمون همگنی پارتیشن گاهی اوقات به‌ویژه برای مجموعه داده‌های بزرگ نتایج غیرقابل اطمینانی نشان می‌دهد. واضح است که این ناسازگاری‌ها به‌علت مسائل فنی مانند سیگنال فیلوژنتیک و هموپلازی است. بنابراین، مجموعه

جدول ۲- میانگین فاصله بین ژنتیکی اصلاح نشده (kimura-2 parameter) بین اکوتیپ‌های مختلف *Z. jujuba* و گروه خارجی از فلات ایران بر اساس ۶۰۰ جفت باز ژن *rbcL*.

Table 2. Average distance between uncorrected genetics (kimura-2 parameter) between different *Z. jujuba* ecotypes and the foreign group of the Iranian plateau based on 600 pairs of open *rbcL* genes.

	خراسان جنوبی Southern Khorasan	گلستان Golestan	خراسان رضوی Khorasan Razavi	فارس Fars	اصفهان Esfahan	مازندران Mazandaran	قم Qom	گروه خارجی ۱ و ۲ Foreign groups 1 and 2
خراسان جنوبی Southern Khorasan								
گلستان Golestan	0.00							
خراسان رضوی Khorasan Razavi	0.00	0.00						
فارس Fars	0.01	0.01	0.01					
اصفهان Esfahan	0.00	0.00	0.00	0.01				
مازندران Mazandaran	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00			
قم Qom	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00		
گروه خارجی ۱ و ۲ Foreign groups 1 and 2	0.08	0.08	0.08	0.10	0.08	0.08	0.08	

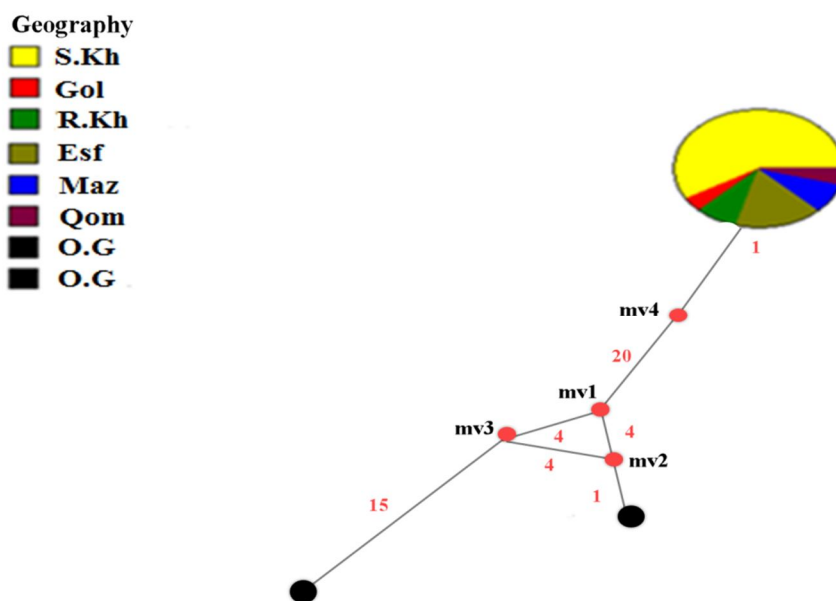
جدول ۳- میانگین فاصله‌های ژنتیکی اصلاح نشده (kimura-2 parameter) بین اکوتیپ‌های مختلف *Z. jujuba* و گروه خارجی از فلات ایران بر اساس قطعه ۸۰۰-۱۰۰۰ جفت باز از *matK*.

Table 3. The average of uncorrected genetic distances (kimura-2 parameter) between different *Z. jujuba* ecotypes and the foreign group of the Iranian plateau based on the 1000-800 pairs of open pairs of *matK*.

	خراسان جنوبی Southern Khorasan	گلستان Golestan	خراسان رضوی Khorasan Razavi	فارس Fars	اصفهان Esfahan	مازندران Mazandaran	قم Qom	گروه خارجی ۱ و ۲ Foreign groups 1 and 2
خراسان جنوبی Southern Khorasan								
گلستان Golestan	0.01							
خراسان رضوی Khorasan Razavi	0.01	0.01						
فارس Fars	0.01	0.01	0.01					
اصفهان Esfahan	0.01	0.02	0.01	0.01				
مازندران Mazandaran	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01			
قم Qom	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01		
گروه خارجی ۱ و ۲ Foreign groups 1 and 2	0.20	0.21	0.20	0.21	0.21	0.20	0.20	

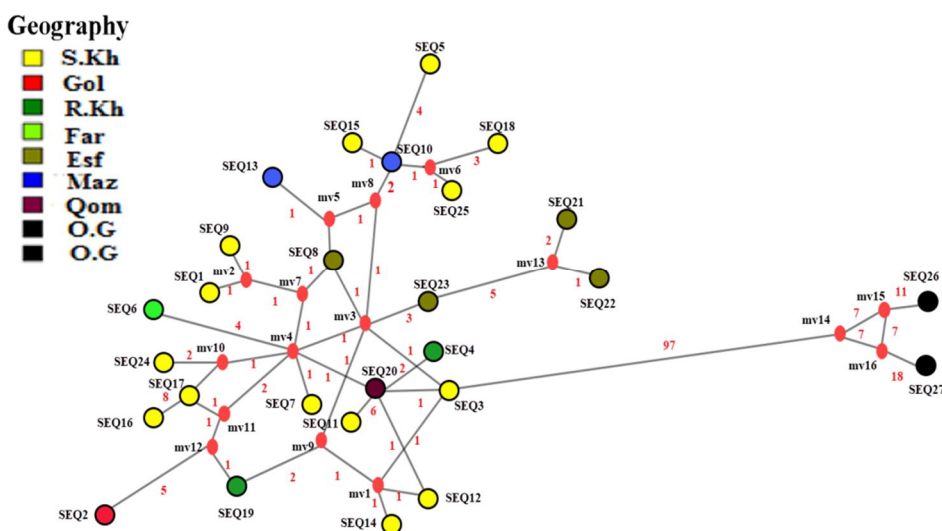
عناصیب از مناطق مختلف و دو گروه خارجی از خانواده Rosaceae مشاهده شد (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصل از ژن *matK* تفاوت‌های درون اکوتیپی در برخی استان‌ها به‌ویژه در خراسان جنوبی، مازندران و خراسان رضوی نشان داده شد (شکل ۲). تمام نمونه‌های اصفهان با هم ارتباط نزدیک داشتند. نتایج به دست آمده از شبکه‌های هاپلوتایپی بیش‌ترین تنوع را در میان اکوتیپ‌های مختلف متعلق به مناطق مختلف استان خراسان جنوبی نشان داد. تجزیه و تحلیل شبکه نشان داد که هاپلوتیپ خراسان جنوبی به احتمال زیاد هاپلوتایپ اجدادی عناصیب ایران است.

شبکه‌های هاپلوتایپی در مطالعات جمعیتی گونه‌ها یا در سطوح پایین‌تر از گونه، اهمیت بسیار زیادی دارند، به‌ویژه آن‌ها که برآورد پارامترها بر اساس nested clade analysis مانند شبکه، مانند NETWORK v. 5.0.0.0 نرم‌افزار انجام می‌شود. برای رسم شبکه هاپلوتایپی استفاده شد. این شبکه بر اساس توالی‌های *matK* و *rbcL* بازسازی شد (شکل‌های ۱ و ۲). شبکه‌های Median joining ساخته شده برای هاپلوتایپ‌ها بر اساس *rbcL* نشان داد که بین نمونه‌های مختلف از مناطق مختلف جدایی وجود ندارد. تفکیک عمده، بین نمونه‌های



شکل ۱- شبکه متصل به هاپلوتیپ‌ها از توالی *rbcL* استنباط می‌شود. گره‌ها با فرکانس هاپلوتیپ متناسب هستند و طول شاخه‌ها با تعداد جهش‌ها متناسب است. نقاط قرمز نشان‌دهنده بردارهای میانه نظری معرفی شده توسط نرم‌افزار شبکه هستند. (S.Kh: خراسان جنوبی، Gol: گلستان، R. Kh: خراسان رضوی، Esf: اصفهان، Maz: مازندران، Qom: قم، O.G: گروه خارجی ۱ و ۲).

Fig. 1. Median-joining network of the haplotypes inferred from *rbcL* sequences. Nodes are proportional to haplotypes frequencies and branches length is proportional to the number of mutations. The red dots represent theoretical median vectors introduced by the network software. (S. Kh: South Khorasan, Gol: Golestan, R. Kh: Razavi Khorasan, Esf: Esfahan, Maz: Mazandaran, Qom: Qom, O.G: Outgroup 1 & 2).



شکل ۲- شبکه متصل‌کننده هاپلوتیپ‌هایی که از توالی *matK* استنباط می‌شوند. گره‌ها با فرکانس هاپلوتیپ متناسب هستند و طول شاخه‌ها با تعداد جهش‌ها متناسب است. نقاط قرمز نشان‌دهنده بردارهای میانه نظری معرفی شده توسط نرم‌افزار شبکه هستند. (S.Kh: خراسان جنوبی، Gol: گلستان، R.Kh: خراسان رضوی، Far: فارس، Esf: اصفهان، Maz: مازندران، Qom: قم، گروه خارجی ۱ و ۲).

Fig. 2. Median-joining network of the haplotypes inferred from *matK* sequences. Nodes are proportional to haplotypes frequencies and branches length is proportional to the number of mutations. The red dots represent theoretical median vectors introduced by the network software. (S. Kh: South Khorasan, Gol: Golestan, R. Kh: Razavi Khorasan, Far: Fars, Esf: Esfahan, Maz: Mazandaran, Qom: Qom, O.G: Outgroup 1 & 2).

شناختی اکوتیپ‌ها دارد و بنابراین اکوتیپ‌ها با توجه به منشأ جغرافیایی آن‌ها جدا شده‌اند. اکوتیپ‌های مناطق مختلف به دلیل داشتن منشأ یکسان و تغییرات در ویژگی‌های ریخت‌شناسی نهال‌ها پس از انتقال و کشت در شرایط جدید متعلق به یک گروه هستند.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، اطلاعات مولکولی، جزئیات کاملی از اکوتیپ‌های مختلف *Z. jujuba* را به عنوان یک گیاه مهم از نظر دارویی و اقتصادی در ایران به‌ویژه خراسان جنوبی ارائه می‌دهد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد با وجود ویژگی‌های ریخت‌شناختی متفاوت در اکوتیپ‌های *Z. jujuba* تفاوت ژنتیکی چندانی بین نمونه‌ها وجود ندارد و توالی‌های به دست آمده ارتباط ژنتیکی نزدیک آن‌ها را نشان می‌دهند. گرچه برای دستیابی به نتایج با دقت بیشتر نیازمند به مطالعه تعداد گونه‌های بیشتر از مناطق مختلف ایران و استفاده از ژن‌های هسته‌ای می‌باشد. که با توجه به اهمیت گیاه عناب به عنوان گیاه دارویی و باغی ارزشمند در ایران برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد. با توجه به نتایج شبکه هاپلو تایپی و مطالعات قبلی، خراسان جنوبی می‌تواند به عنوان منبع گیاهان عناب در ایران محسوب شود. با این حال، با در نظر گرفتن اهمیت اقتصادی گیاهان عناب در جهان، ایران و به‌ویژه خراسان جنوبی استفاده از نمونه‌های بیشتر و ژن‌های بیشتر به خصوص ژن‌های هسته‌ای برای مطالعه دقیق‌تر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی این اکوتیپ‌ها پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی به شماره ابلاغیه ۱۳۹۵/د/۱۱۵۴۶ مورخ ۱۳۹۵/۷/۶ و با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه بیرجند انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود. هم‌چنین از باغ گیاهشناسی سریشه که در تهیه نمونه‌های گیاهی همکاری داشته‌اند، کمال تشکر را داریم.

خاکدامن و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه خود خاطرنشان کردند که سه گروه اصلی اصفهان، مازندران و خراسان را می‌توان اکوتیپ‌های مختلف عناب در نظر گرفت (۲۱). نتایج حاصل از مطالعه حاضر از فاصله‌های ژنتیکی و تحلیل شبکه‌های هاپلو تایپ به ویژه براساس ژن *matK* تأیید می‌کند که خراسان جنوبی و اصفهان می‌تواند به عنوان گروه‌های اصلی عناب در ایران مورد توجه قرارگیرد. مطالعه دیگری بر روی تنوع ژنتیکی ۳۴ اکوتیپ مختلف *Z. jujuba* در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD انجام شده است (۱). نتایج آن‌ها نشان‌دهنده حضور اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در همه گروه‌ها بود و با توجه به این‌که خراسان جنوبی مرکز کشت عناب بوده است، این امر می‌تواند به دلیل این واقعیت باشد که این استان منشأ احتمالی توزیع عناب در ایران است. بررسی ژنتیکی ژنوتیپ‌های عناب با استفاده از نشانگر AFLP توسط شاه‌حسینی و همکاران (۲۰۱۲) انجام شده است (۳۰). نتایج آن‌ها نشان داد که عناب را می‌توان به سه گروه اصلی قم، اصفهان و خراسان تقسیم کرد. گروه خراسان، گروهی جداگانه است. در مطالعه‌ای که گاست و همکاران (۲۰۱۴) در ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD انجام دادند، نشان داده شد که تنوع عناب کل کشور در تنوع اکوتیپی خراسان جنوبی خلاصه شده است (۱۰). در مطالعه حاضر، توالی‌های *Z. jujuba* ایران برای اولین بار در GenBank ارائه شده است. اگرچه نشانگرهای مولکولی مختلف (ژن‌های کلروپلاست) از مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج به دست آمده نتایج پژوهش‌های قبلی را تأیید می‌کنند. این امر بدین معنی است که اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در همه گروه‌ها دیده می‌شود، بنابراین این منطقه می‌تواند به عنوان منشأ احتمالی پراکنش عناب در ایران در نظر گرفته شود. از سوی دیگر، توالی‌های DNA آن‌ها از مناطق مختلف تفاوت نداشت. در واقع، اقلیم منطقه تأثیرات مهمی بر ویژگی‌های ریخت

منابع

1. Abbasi, S., Malekzadeh shafaroudi, S., Ghos, K. and Shahriari, F. 2012. Study of genetic diversity of *Ziziphus jujube* ecotypes in Iran using RAPD. Iranian. J. Field Crop. Res. 10: 3. 583-590. (In Persian)
2. Akhter, C., Dar, G.H. and Khuroo, A.A. 2013. *Ziziphus jujuba* Mill. subsp. *spinosa* (Bunge) Peng, Li & Li: a New Plant Record for the Indian Subcontinent. Taiwan. 58: 2. 132-135.
3. CBOL, P.W.G. 2009. A DNA barcode for land plants. PNAS USA. 106: 12794-12797.
4. Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P. and Haidar, N. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philos. Trans. R. Soc. B. 360: 1889-1895.
5. Chen, J., Liu, X., Li, Z., Qi, A., Yao, P., Zhou, Z., Dong, T.T.X. and Tsim, K.W.K. 2017. A Review of Dietary *Ziziphus jujuba* Fruit (Jujube): Developing Health Food Supplements for Brain Protection. Evid. Based Complement Alternat. Med. 1-10.
6. Desalle, R. and Amato, G. 2004. The expansion of conservation genetics. Nat. Rev. Genet. 5: 702-712.
7. Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. and Bult, C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. Syst Biol. 44: 4. 570-572.
8. Freudenstein, J.V. and Senyo, D.M. 2008. Relationships and evolution of *matK* in a group of leafless orchids (Corallorhiza and Corallorhizinae; Orchidaceae: Epidendroideae). Am. J. Bot. 95: 4. 498-505.
9. Fu, P.C., Zhang, Y.Z., Ya, H.Y. and 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 DOI: 10.7717/peerj.1735.
10. Ghost, K., Malekzadeh Shafaroudi, S., Rashed Mohassel, M.H., Akbari, M.R. and Razavi, S.H. 2014. Grouping jujubes of Iran based on quantitative characteristics and ISSR and RAPD markers. Crop. Breed. J. 30: 1. 173-190.
11. Grygorieva, O., Abrahamová, V., Karnatovská, M., Bleha, R. and Brindza, J. 2014. Morphological characteristic of fruit, drupes and seeds genotypes of *Ziziphus jujuba* Mill. Potravinarstvo Slovak. J. Food Sci. 8: 1. 306-314.
12. Hall, A.T. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis performer windows 95/98/NT. Nucleic Acid Symp., Oxford Journals. 41: 95-98.
13. Hebert, P.D., Ratnasingham, S. and Dewaard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. Biol. 270: 1. 96-99.
14. Herbert, P.D.N. and Gregory, T.R. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. Syst. Biol. 54: 5. 852-859.
15. Hilu, K.W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Savolainen, V. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. Am. J. Bot. 90: 1758-1776.
16. Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S. and Van Der Bank, M. 2009. A DNA barcode for land plants. PNAS USA. 106: 12794-12797.
17. Huang, J., Yang, X., Zhang, C., Yin, X., Liu, S. and Li, X. 2015. Development of chloroplast microsatellite markers and analysis of chloroplast Diversity in Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and wild jujube (*Ziziphus acidojujuba* Mill.). PloS One. 10: 9. 1-14.
18. Huelsenbeck, J. and Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. J. Bioinform. 17: 754-755.
19. Ivanisova, E., Grygorieva, O., Abrahamová, V., Schubertova, Z., Terentjeva, M. and Brindza, J. 2017. Characterization of morphological parameters and biological activity of jujube fruit (*Ziziphus jujuba* Mill.). J. Berry. Res. 7: 4. 249-260.
20. Islam, M.B. and Sim Mons, M.P. 2006. A thorny dilemma: testing alternative intergeneric classification within *Ziziphus* (Rhamnaceae). Syst. Bot. 3: 826-842.

21. Khakdaman, H., Pourmeidani, A. and Adnani, S.M. 2007. Study of genetic variation in Iranian jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) ecotypes. Iran. J. Genet. Plant Breed. 14: 202-214. (In Persian)
22. Kumar, A., Mahadani, P., Kishore, R., Loyanganba Meitei, A. and Singh, D. R. 2016. DNA Barcoding of Indian Orchids. - ICAR- National Research Center for Orchid, Technical Bulletin. 48, India.
23. Liu, M. 2006. Chinese jujube: Botany and horticulture. Hort Rev. 32: 229-298.
24. Liu, M. and Wang, M. 2009. Germplasm resources of Chinese jujube. China Forestry Publication House, Beijing, Pp: 1-56.
25. Liu, M., Zhao, J., Cai, Q., Liu, G., Wang, J. and Zhao, Z. 2014. The complex jujube genome provides insights into fruit tree biology. Nat Commun. 5: 5315.
26. Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, A.J. and Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. Mol. Ecol. Resour. 8: 480-490.
27. Olmstead, R.G. and Palmer, J.D. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. Am. J. Bot. 81: 205-1224.
28. Posada, D. and Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DN substitution. J. Bioinform. 14: 9. 817.
29. Sanderson, M.J. 2003. Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants. Am. J. Bot. 90: 6. 954-956.
30. Shahhoseini, 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. Iran. J. Genet. Plant Breed. 20: 1. 55-68.
31. Small, R.L., Cronn, R.C. and Wendel, J.F. 2004. L. A. S. Johnson Review No. 2. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. Aust Syst Bot. 17: 145-170.
32. Soltis, D.E. and Soltis, P.S. 1998. Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Boston, Pp: 297-348.
33. Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M.E., Albach, D.C. and Zanis, M. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. Bot. J. Linn. Soc. 133: 4. 381-461.
34. Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA and the bar code of life. Bioscience. 53: 2-3.
35. Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
36. Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C. and Valentini, A. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic Acids Res. 35:e14. doi:10.1093/nar/gkl938.
37. Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol. Biol. Evol. 9: 678-687.
38. Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. PNAS USA. 101: 11030-11035.
39. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
40. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25: 24. 4876-4882.
41. Wang, H.Z., Wang, Y.D., Zhou, X.Y., Ying, Q.C. and Zheng, K.L. 2004. Analysis of genetic diversity of 14 species of Cymbidium based on RAPDs and AFLPs. Acta. Biol. Exp. 37: 6. 482-486.

42. Wendel, J.F., Schnabel, A. and Seelanan, T. 1995. Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). PNAS. 92: 280-284.

43. Wolf, K.H., Morden, C.W. and Palmer, J.D. 1992. Function and Evolution of a minimal plastid genome from nonphotosynthetic parasitic plant. PNAS. 89: 22. 10648-10652.