



بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام زیتون ایران با استفاده از نشانگرهای RAPDs

لیلا متقی^۱، سید مهدی حسینی مزینانی^۲، حمید جباری^۳

چکیده

ارقام زراعی زیتون ایران که تحت یک نام معرفی می‌گردند، دارای تنوع در درون خود هستند. در این بررسی در مرحله اول، تنوع مولکولی ۴۶ نمونه درخت زیتون از ۱۰ رقم با ۲۰ آغازگر RAPD بررسی شد. ۵۳/۱٪ کل نوارها چندشکل بودند. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYS و SPSS آنالیز گردید. در مرحله دوم، نمونه‌های کاملاً مشابه حذف گردید. مجدداً این ارقام با ۲۰ آغازگر RAPD بررسی شدند. از تعداد کل باندها، ۷۹/۵٪ کل باندها چندشکل بودند. از روش‌های مختلف برای محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه کلاستر استفاده شد. بهترین کلاستر بر اساس ماتریس تشابه Dice و روش UPGMA به دست آمد. میانگین ضرایب تشابه به روش Dice، نشان‌دهنده وجود تنوع کم در بین ارقام است. در تجزیه به مختصات اصلی، ارقام به خوبی از هم تفکیک شدند. مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای، نتایج بررسی مورفولوژیک را تا حد زیادی تأیید کرد. به طور کلی انجام یک آزمایش مولکولی در ادامه طبقه‌بندی مورفولوژی ضروری به نظر می‌رسد. در مرحله اول استفاده از نشانگرهای RAPD برای بررسی اولیه مطالعات مورفولوژی مطلوب به نظر می‌رسد. در ادامه این مطالعه می‌توان با استفاده از نشانگرهای دیگر همین نتایج را تأیید نمود و چه بسا بتوان آن را دقیق‌تر ارزیابی نمود.

واژه‌های کلیدی: زیتون، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، روش UPGMA، تجزیه خوشه‌ای

۱- دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پاکدشت، ایران

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تحقیقات زیست فناوری، تهران، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه زراعت و اصلاح نباتات، تهران، ایران

* مکاتبه کننده: (mottaghi_leila@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: تابستان ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: زمستان ۱۳۸۹

مقدمه

بسیاری از صفات ریخت‌شناسی - زیست‌شناسی تحت تأثیر شرایط محیطی، سن درختان، سیستم پرورش و مرحله فنولوژیکی گیاهان قرار می‌گیرند، اما شناسایی گیاهان براساس صفات ریخت‌شناسی مرحله اصلی طبقه‌بندی ژرم پلاسما همه گیاهان از جمله زیتون است. از طرفی، روش‌های مولکولی به صورت یک روش تکمیلی قادرند ما را در تشخیص دقیق‌تر صفات و طبقه‌بندی گیاهان کمک نمایند. روش‌های مولکولی متفاوتی برای تشخیص ارقام مختلف گیاهان وجود دارد. اولین نشانگر^۳ مولکولی برای تشخیص ارقام، RAPD^۴ بود. برای مثال تنوع ژنتیکی ارقام گیاه لاله عباسی هم با استفاده از این روش بررسی شد (Ibtesam, 2009). از تکنیک RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما و شناسایی ارقام زیتون استفاده شده است (La Mantia et al., 2006)، (Sheidai et al., 2007). روش RAPD نشان داده است که شناسایی چندشکلی^۴ ژنتیکی در زیتون، در جمعیت‌های متنوع که از ارقام مشابه از نظر ریخت‌شناسی تشکیل شده‌اند، نیز مقدور است (Samaee et al., 2004). هدف از این تحقیق دسته‌بندی مولکولی ارقامی است که از نظر مورفولوژیکی به طور اولیه دسته‌بندی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

با توجه به موارد ذکر شده در جدول ۱ توسط تیم تحقیقاتی زیتون و احتمال وجود تنوع درون ارقام مورد بررسی از هر رقم حداقل سه نمونه انتخاب شد.

امروزه ایران با دارا بودن ۱۰۰۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت زیتون و تولید بیش از ۳۰۰۰ تن روغن در سال به عنوان یکی از کشورهای پرورش‌دهنده زیتون در جهان محسوب می‌شود. ذخایر ژنی زیتون ایران یکی از ذخایر ژنی مهم جهان می‌باشد. تشخیص و حفظ واریته‌های مختلف زیتون ایران، مطالعات ژنتیکی بر روی آنها را طلب می‌کند. یکی از برنامه‌های مهم وزارت جهاد کشاورزی، افزایش سطح زیر کشت زیتون در ایران است. برای رسیدن به این هدف، از طریق ریشه‌دار کردن قلمه‌های ارقام مختلف زیتون، نهال زیتون تولید می‌گردد. برای توسعه سطح زیر کشت، از ارقام مختلف زیتون موجود در کشور قلمه‌گیری شده و قلمه‌ها ریشه‌دار می‌شوند، سپس نهال‌های تولیدشده به مناطق مختلف کشور برای احداث باغ زیتون ارسال می‌گردد. یکی از مشکلات اجرای این طرح، عدم شناسایی دقیق ارقام زیتون ایران و در نتیجه عدم یکنواختی در احداث باغ‌های زیتون کشور است. برای حل این مشکل ابتدا لازم و ضروری است که ارقام زیتون موجود در کشور به طور دقیق شناسایی شده و سپس نسبت به تکثیر آنها اقدام گردد. شناسایی ارقام به دو روش صورت می‌گیرد: ریخت‌شناسی^۱ و مولکولی^۲. ارقام زیتون ایران با استفاده از صفات ریخت‌شناسی توسط تیم تحقیقاتی زیتون به سرپرستی دکتر سیدمهدی حسینی مزینانی در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک گروه‌بندی شده‌اند (Hosseini-Mazinani et al., 2004). گرچه

۳- Marker

۴- Polymorphism

۱- Morphological

۲- Molecular

Operon ست C، RAPD از شرکت Technologies Alameda California توسط شرکت طوبی نگین تهیه شد (جدول ۴). جهت بررسی کیفی و نیمه کیفی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز و اکرلامید استفاده شد. به دلیل کیفی بودن داده‌ها، نخست جدول صفر و یک تشکیل شد. طول محصول PCR با استفاده از سایز مارکر استاندارد اندازه‌گیری گردید. در این آزمایش از سایز مارکر GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus از شرکت Fermentas استفاده شد که بر روی ژل اکرلامید شش درصد ۱۴ باند تولید می‌کرد. اندازه باندهای این نشانگر از بالا به پایین به این ترتیب بود: ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۳۱، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ و ۱۰۰ جفت باز مشخص شده که فاصله طی شده هر باند روی ژل با لگاریتم اندازه آن رابطه خطی دارد یادآوری می‌شود که باندهای یک شکل که در تمام افراد تکثیر شده بودند، از تجزیه حذف شدند. یکی از مهم‌ترین اهداف این تحقیق گروه‌بندی افراد یا ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات نشانگری بود. ماتریس داده‌ها که در آن ردیف‌ها، نماینده ژنوتیپ‌ها و ستون‌ها نماینده نشانگرها بودند در نرم‌افزار NTSYS pc-2.02e مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بعد از آنالیز داده‌ها از طریق آنالیز خوشه‌ای، نمونه‌های مشابه از روی کلاسترهای بدست آمده، حذف گردید و تعداد نمونه‌ها به ۱۷ عدد تقلیل یافت. همه مراحل ذکر شده بار دیگر روی این نمونه‌ها انجام شد.

مواد گیاهی جهت استخراج DNA شامل سرشاخه‌های جوانی است که دارای برگ‌های جوان بود. نمونه‌های برگ‌ی پس از برداشت و ثبت شماره درخت در نایلون گذاشته شد و در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

روش‌های مختلف استخراج DNA جهت گزینش بهترین و آسان‌ترین روش بررسی شدند. در نهایت بهترین روش، دوپیل و دوپیل^۱ (۱۹۸۷) معروف به CTAB، مورد استفاده قرار گرفت.

جهت یکنواخت کردن شرایط آزمایش برای نمونه‌های مورد بررسی و همچنین جلوگیری از ایجاد آلودگی، یک مخلوط اصلی تهیه شد. در این مخلوط متناسب با مقدار نمونه‌ها، کلیه مواد لازم برای واکنش PCR را مطابق جدول دو به ویالی که برای این منظور تهیه شده است، اضافه شد و مواد مورد استفاده شامل بافر PCR، MgCl₂، dNTPs، آغازگر، آب دوبار تقطیر و در نهایت آنزیم بود. حجم نهایی به ازاء هر نمونه ۲۵ میکرولیتر بود. در این آزمایش از دستگاه ترموسایکلر Techne Gradient (Model FTGRAD 5D) استفاده شد. برنامه چرخه‌های دمایی مورد استفاده شامل ۹۴ درجه واسرشتی، ۳۶ درجه اتصال، ۷۲ درجه طویل شدن طی ۳۵ سیکل و ۹۴ درجه واسرشتی اولیه و در نهایت ۷۲ درجه طویل شدن (جدول ۳).

۲۰ برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام زیتون ایران (روغنی و گلوله) و براساس بررسی‌های قبلی (Samaee et al., 2004) از ۲۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی با توالی تصادفی از سری آغازگرهای OPC استفاده شد. آغازگر ۱۰ الیگونوکلئوتیدی

۱- Doyle and Doyle

نتایج

برای استخراج DNA مناسب جهت آزمایش PCR از روش دوپیل و دوپیل (۱۹۸۷) معروف به CTAB، مورد استفاده قرار گرفت.

به نظر می‌رسد که یک رابطه خطی بین پیچیدگی ژنوم و میانگین تعداد باندهای مشاهده شده برای هر آغازگر وجود دارد (جدول پنج)، ولی آزمایش‌ها نشان داده‌اند که در ژنوم‌های بزرگ تعداد باندها مستقل از پیچیدگی ژنوم است و محصول نهایی واکنش توسط رقابت بین مواد اولیه تعیین می‌گردد نه تعداد مکان‌هایی که برای اتصال آغازگر در اختیار هستند و حتی میزان کم اتصال آغازگر به رشته DNA هدف نیز برای این کار کافی است.

از این تعداد، ۱۸ آغازگر چندشکلی نشان داده و باندهای واضح و تکرارپذیر تولید کردند (شکل ۶). در قسمت اول آزمایش، ۴۶ نمونه درخت زیتون مورد بررسی قرار گرفتند، که از هر رقم چندین درخت به عنوان تکرار در نظر گرفته شد و با ۱۰ آغازگر RAPD بررسی شد و در مجموع ۳۵۰ باند قابل نمره‌دهی بر روی ژل اکرلامید مشاهده شد. از تعداد کل باندها ۱۸۶ باند (۵۳/۱٪ کل باندها) چند شکل بودند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار NTSYS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در کلاستر بندی شباهت تکرار نمونه‌ها نشان داده شد. بدین ترتیب برای آنالیز مرحله دوم، تعداد نمونه‌ها به ۱۸ عدد تقلیل یافت و با ۲۰ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۲۰۰ باند قابل نمره‌دهی بر روی ژل اکرلامید مشاهده گردید، که از میان آنها ۱۵۹ باند (۷۹/۵٪ کل باندها) چند شکل بودند. میانگین تعداد باندها برای هر آغازگر، ۱۱/۱ بود و به طور متوسط هر آغازگر نه باند چند شکل نشان داد. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرها متفاوت بود. بیشترین تعداد

قطعات مربوط به آغازگر OPC11 و OPC19 بود. شکل یک نمودار مربوط به تعداد باندهای تکثیری را نشان می‌دهد. میزان چندشکلی در بین آغازگرها از ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای OPC3, OPC5, OPC8 تا ۶۲ درصد برای آغازگرهای OPC6, OPC14 متغیر بود (شکل ۲). برای تجزیه و تحلیل، تنها از باندهایی که در محدوده ۴۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بودند، استفاده شد، چون نمره‌دهی به صورت چشمی صورت می‌گرفت، برای کم‌شدن خطا، عمل نمره‌دهی سه بار به صورت جداگانه انجام گرفت.

نمره‌دهی باندها براساس وجود و عدم وجود به صورت صفر و یک صورت گرفت و سپس نتایج به برنامه Excel منتقل شد. قبل از انجام تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی باید ماتریس تشابه تشکیل شود. براساس این ماتریس، بیشترین میزان تشابه ژنتیکی ۹۴٪ و کمترین میزان تشابه ژنتیکی ۰/۰۱٪ بدست آمد. میانگین ضریب تشابه برای این باندها ۰/۴۹ به دست آمد.

به دلیل اینکه در این تحقیق به روش‌های مختلف ماتریس تشابه حاصل شده و همچنین با چندین روش تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت، برای مشخص شدن رابطه میزان همبستگی بین دندروگرام‌های حاصل با همدیگر از آزمون T-Student استفاده شد. در این تحقیق برای دستیابی به بهترین دندروگرام از روش‌های مختلف محاسبه ماتریس تشابه و روش‌های مختلف تجزیه کلاستر استفاده شد. معیار انتخاب دندروگرام خوب، مقدار همبستگی کوفنتیکی است که به خوبی ارقام را از هم تفکیک کند. جدول ۶ ضرایب همبستگی کوفنتیک مربوط به دندروگرام‌های به دست آمده از

گرفت. به طور کلی در این تحقیق از ۱۰ رقم زیتون که اکثراً در شمال و بعضی در جنوب ایران کشت می‌شوند، استفاده شد. برای استخراج DNA مناسب جهت آزمایش PCR از سه روش استفاده شد. استخراج DNA به روش دلاپورتا جواب قابل قبولی نداد و DNA با کیفیت مناسب استخراج نشد. در روش CTAB، از برگ‌های تازه چیده شده، DNA با کیفیت خوبی استخراج شد، اما از برگ‌های نگهداری شده در دمای 20°C و 70°C - درجه حتی برای مدت کمتر از یک ماه، DNA با کیفیت خوبی استحصال نشد و در اکثر موارد حتی با وجود تغییرات در مراحل استخراج، DNA مناسب به دست نیامد. گرچه کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش تای-جین کنگ چه از برگ‌های تازه زیتون و چه از برگ‌های نگهداری شده در 20°C و 70°C - درجه (با اعمال تغییراتی جزئی در مراحل شستشو) بسیار خوب بود، اما در نهایت بهترین روش مورد استفاده قرار گرفت.

در تحقیقات قبلی انجام شده روی زیتون میزان تشابه بین ۰/۲۹ - ۰/۹۷ متغیر بوده است (Perri et al., 2002). برای انتخاب بهترین کلاستر از دو معیار استفاده شد: (۱) ضریب همبستگی کوفنتیک و (۲) قدرت جداسازی ارقام.

در دندروگرام حاصل (شکل سه) اگر دندوگرام در نقطه ۰/۴۵ قطع گردد، در مجموع دو کلاستر حاصل می‌شود. در کلاستر اول ۱۱ نمونه قرار گرفت، که شامل کلیه ارقام روغنی و در رقم گلوله I و گلوله VI هستند. در ضمن ارقام گلوله II و گلوله IV و گلوله V نیز در کلاستر دوم قرار گرفته‌اند. شایان ذکر است که در بررسی‌های ریخت‌شناسی، در بین ۱۰ رقم

روش‌های مختلف را نشان می‌دهد. با انجام آزمون t-student معنی‌دار بودن ضرایب بررسی شد.

در این جدول مشاهده می‌شود که همه ضرایب همبستگی کوفنتیک در سطح ۱٪، معنی‌دار هستند. در مجموع ضرایب همبستگی دندروگرام‌های حاصل از روش تجزیه کلاستر UPGMA بالاتر از بقیه روش‌ها بود. روش محاسبه تشابه ژنتیکی دایس از بقیه روش‌ها بهتر بوده است. کلاستر بدست آمده با ضریب تشابه دایس و با روش تجزیه کلاستر UPGMA، در شکل ۳ آورده شده است.

در این تحقیق از این تجزیه به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد. به دلیل اینکه در این آزمایش داده‌ها کیفی بودند و مقادیر یک و صفر را به خود می‌گرفتند، بنابراین به جای تجزیه مولفه‌های اصلی از تجزیه مختصات اصلی استفاده شد. تجزیه مختصات اصلی (Principle Coordinate Analysis)، با ماتریس به دست آمده با روش دایس انجام گرفت. نمودار دو بعدی و سه بعدی حاصل، در شکل چهار و پنج آورده شده است. در مورد کل باندها، مؤلفه اول، دوم و سوم به ترتیب ۲۲/۱، ۱۵/۲ و ۸/۴ درصد تغییرات را دربر می‌گرفتند، آنچه مشخص است، این است که در این تجزیه ژنوتیپ‌ها به گروه‌های مشخصی تفکیک شد.

در مطالعاتی که تا کنون صورت گرفته است، ۱۰ رقم سنتی زیتون ایران به بیش از ۳۰ رقم گروه‌بندی شده‌اند. این تقسیم‌بندی‌ها مورد تأیید محققین مرکز تحقیقات زیتون کورد و با نیز قرار گرفته است.

بحث و نتیجه‌گیری

این تحقیق در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام

موجود در ارقام گلوله بسیار بیشتر از ارقام روغنی مورد بررسی است.

۳- با شناخت فواصل ژنتیکی بین ارقام مختلف زیتون، زمینه را برای آزمایشات اصلاح نژاد هموار خواهد نمود.

۴- برای تفکیک بهتر ارقام، استفاده از مارکرهای دیگر نظیر AFLP و SSR پیشنهاد می شود.

۵- تعداد نمونه‌های بیشتر از کلیه نقاط جغرافیایی ایران، پراکنش و منشأ ارقام را بهتر توضیح می دهد.

۶- مقایسه ارقام ایرانی با ارقام خارجی، پراکندگی ژنتیکی ارقام زیتون را در دنیا به خوبی ترسیم خواهد کرد.

سنتی منطقه شمال ایران، رقم گلوله از متنوع ترین ارقام می باشد. قابل ذکر است که رقم گلوله III نسبت به سایر ارقام گلوله در کلاستر جداگانه قرار گرفته است، به طوری که گلوله III درخت شماره ۵۰۲ تفاوت بسیار زیادی را با سایر ارقام نشان می دهد. همان طور که نتایج نشان می دهد این بررسی، مطالعات مورفولوژی روی همین ارقام را تأیید می نماید.

در پایان می توان اشاره کرد که:

- ۱- مطالعات مولکولی RAPD در حد قابل قبولی بررسی های ریخت شناسی را تأیید می کند.
- ۲- اگر چه جمعیت ارقام گلوله در شمال کشور نسبت به ارقام روغنی بسیار کمتر است، اما تنوع

جدول ۱- ارقام زیتون مورد بررسی

نام رقم	شماره درخت	محل (باغ) جمع آوری
گلوله I	۳۰۳	باغ مطهری گیلوان
گلوله I	۳۱۳	باغ مطهری گیلوان
گلوله I	۳۱۷	باغ مطهری گیلوان
گلوله I	۱۱۵۸	باغ اتکاء منجیل
گلوله I	۱۱۳۶	باغ بابا گل شریفی هرزیل
گلوله I	۱۱۳۹	باغ ناصر سمیعی هرزیل
گلوله I	۱۱۴۷	باغ ناصر سمیعی هرزیل
گلوله II	۳۹۳	باغ اتکاء منجیل
گلوله II	۳۸۷	باغ اتکاء منجیل
گلوله II	۳۸۹	باغ اتکاء منجیل
گلوله II	۳۹۱	باغ اتکاء منجیل
گلوله III	۳۷۴	باغ اتکاء منجیل
گلوله III	۵۰۱	باغ اتکاء منجیل
گلوله III	۵۰۲	باغ اتکاء منجیل
گلوله IV	۴۹۳	بیژن سالمیر چگنی بهرام آباد
گلوله IV	۴۹۷	عیسی سالمیر چگنی بهرام آباد
گلوله V	۱۱۱۷	باغ علی نظری منجیل
گلوله V	۱۱۱۸	باغ علی نظری منجیل
گلوله V	۱۱۲۲	باغ علی نظری منجیل

ادامه جدول ۱

نام رقم	شماره درخت	محل (باغ) جمع آوری
گلوله V	۱۱۶۰	باغ اتکاء منجیل
گلوله VI	۳۱۶	باغ مطهری گیلوان
روغنی I ^۱	۱۰۴۷	باغ تحقیقات رودبار
روغنی I ^۱	۲۱۰	باغ حاج غلام سلیمانی بهرام آباد
روغنی I	۱۰۴۸	باغ تحقیقات رودبار
روغنی I	۱۰۴۹	باغ تحقیقات رودبار
روغنی I	۱۰۵۰	باغ تحقیقات رودبار
روغنی I	۳۶۷	باغ اتکاء منجیل
روغنی I	۳۷۶	باغ اتکاء منجیل
روغنی I	۳۱۸	باغ مطهری گیلوان
روغنی I	۳۲۱	باغ مطهری گیلوان
روغنی I	۳۲۰	باغ مطهری گیلوان
روغنی II	۲۰۹	باغ حاج غلام سلیمانی بهرام آباد
روغنی II	فدک ۱۳-درخت ۱۹،۱۴،۹	مزرعه فدک قم
روغنی III	۱۱۲	غلام گل میرزایی و خمان
روغنی III	۱۲۳	میزای گل میرزایی و خمان
روغنی III	۱۱۹	حسین باقری و خمان
روغنی IV	۳۳۲	باغ مطهری گیلوان

جدول ۲ - میزان و غلظت نهایی مواد مورد نیاز برای انجام یک واکنش PCR (آنزیم، بافر و MgCl₂ مورد استفاده متعلق به شرکت سیناژن می باشد).

غلظت نهایی	به ازای هر نمونه (میکرو لیتر)	نوع ماده
۱X	۲/۵	۱۰-PCR bufferX
۰/۲mM	۰/۵	dNTP
۱/۵mM	۰/۷۵	MgCl ₂
۱۰-PM	۱	Primer
-	۱۵	Strile Double Distilled Water
۱U	۰/۲۵	Taq
۲۵ng/ml	۵	DNA
	۲۵	حجم کل

جدول ۳- چرخه‌های دمایی مورد استفاده در واکنش PCR

نام مراحل	دما (C°)	زمان	تعداد چرخه
واسرشتی	۹۴	۵'	۱
واسرشتی	۹۴	۱'	
اتصال	۳۶	۱'	۳۵
طویل شدن	۷۲	۲'	
طویل شدن	۷۲	۱۰'	۱

جدول ۴- آغازگرهای استفاده شده و تعداد باندهای تکثیر شده

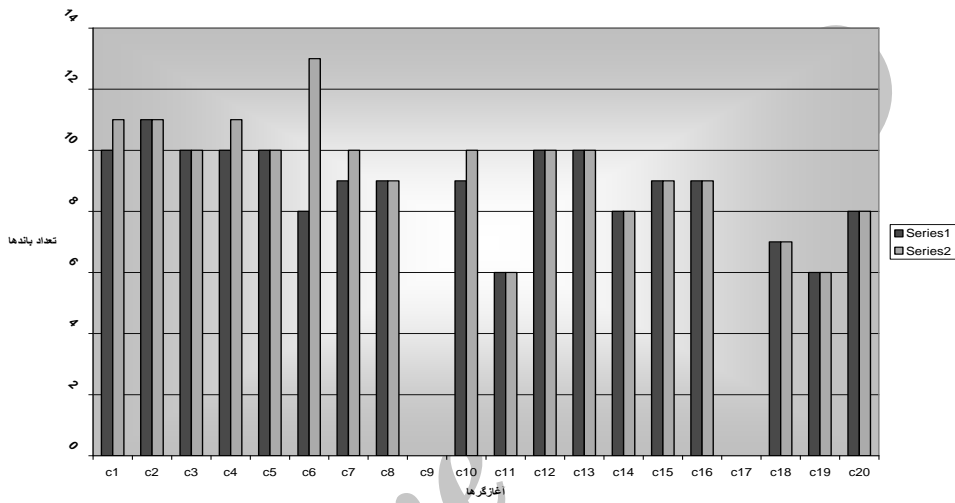
ردیف	آغازگر	توالی آغازگر	تعداد باندهای تکثیر شده	تعداد باندهای چندشکل	تعداد باندهای یک شکل	درصد چندشکلی
۱	C-01	5'-TTC GAG CCA G-3'	۱۱	۱۰	۱	۹۱
۲	C-02	5'-GTG AGG CGT C-3'	۱۱	۱۱	۰	۱۰۰
۳	C-03	5'-GGG GGT CTT T-3'	۱۰	۱۰	۰	۱۰۰
۴	C-04	5'-CCG CAT CTA C-3'	۱۱	۱۰	۱	۹۱
۵	C-05	5'-GAT GAC CGC C-3'	۱۰	۱۰	۰	۱۰۰
۶	C-06	5'-GAA CGG ACT C-3'	۱۳	۸	۵	۶۲
۷	C-07	5'-GTC CCG ACG A-3'	۱۰	۹	۱	۹۰
۸	C-08	5'-TGG ACC GGT G-3'	۹	۹	۰	۱۰۰
۹	C-09	5'-CTC ACC GTC C-3'	۰	۰	۰	۰
۱۰	C-10	5'-TGT CTG GGT G-3'	۱۰	۹	۱	۹۰
۱۱	C-11	5'-AAA GCT GCG G-3'	۸	۶	۲	۷۵
۱۲	C-12	5'-TGT CAT CCC C-3'	۱۲	۱۰	۲	۸۳
۱۳	C-13	5'-AAG CCT CGT C-3'	۱۱	۱۰	۱	۹۱
۱۴	C-14	5'-TGC GTG CTT G-3'	۱۳	۸	۵	۶۲
۱۵	C-15	5'-GAC GGA TCA G-3'	۱۰	۹	۱	۹۰
۱۶	C-16	5'-CAC ACT CCA G-3'	۱۴	۹	۵	۶۴
۱۷	C-17	5'-TTC CCC CCA G-3'	۰	۰	۰	۰
۱۸	C-18	5'-TGA GTG GGT G-3'	۹	۷	۲	۷۸
۱۹	C-19	5'-GTT GCC AGC C-3'	۷	۶	۱	۸۶
۲۰	C-20	5'-ACT TCG CCA C-3'	۱۰	۸	۲	۸۰

جدول ۵- ماتریس تشابه ژنتیکی بین ارقام مورد بررسی و ضرایب تشابه بدست آمده بر اساس فرمول دایس

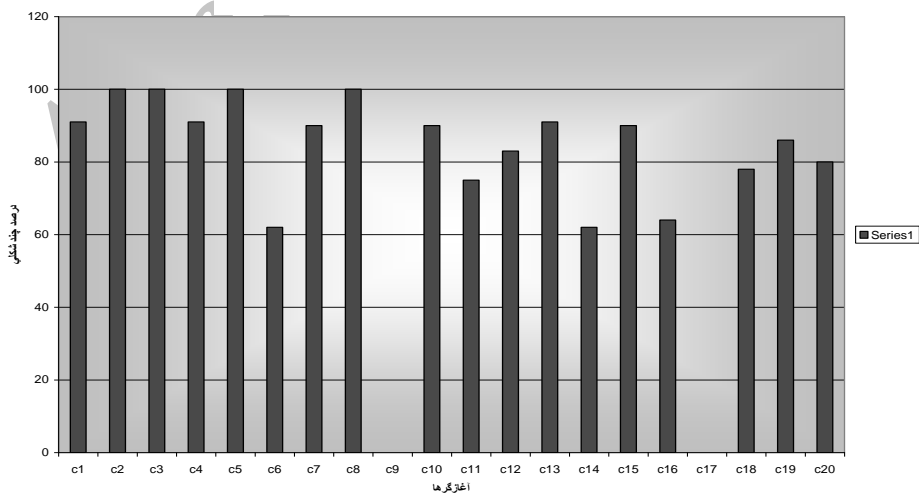
	گلونه I -	گلونه I-۳۱۷	گلونه II -	گلونه II -	گلونه III	گلونه -IV	گلونه V	گلونه VI	روغنی I'	روغنی I	روغنی -II	روغنی II	روغنی -III	روغنی III	روغنی IV	روغنی IV	
	۳۰۳		۳۹۱	۳۸۷	۵۰۲-	۱۱۱۷	۱۱۶۰-	۳۱۶-	۱۰۴۷-	۳۲۱-	-۲۰۹	۹-۱۳	۱۱۲		۳۳۰-	۳۳۱-	
						۴۹۷											
											گلخانه						
گلونه I-۳۰۳																	
گلونه I-۳۱۷	0.79																
گلونه II-۳۹۱	0.52	0.52															
گلونه II-۳۸۷	0.31	0.37	0.63														
گلونه III-۵۰۲	0.00	0.02	0.03	0.62													
گلونه III-۳۷۴	0.26	0.36	0.47	0.40	0.06												
گلونه IV-۴۹۷	0.40	0.45	0.62	0.45	0.03	0.49											
گلونه V-۱۱۱۷	0.51	0.58	0.61	0.51	0.02	0.44	0.69										
گلونه V-۱۱۶۰	0.37	0.46	0.54	0.53	0.04	0.48	0.57	0.63									
گلونه VI-۳۱۶	0.53	0.55	0.52	0.42	0.02	0.36	0.49	0.58	0.54								
روغنی I'-۱۰۴۷	0.66	0.62	0.52	0.26	0.01	0.31	0.41	0.46	0.39	0.62							
روغنی I-۳۲۱	0.67	0.64	0.61	0.33	0.01	0.36	0.52	0.56	0.43	0.67	0.86						
روغنی II-۲۰۹-گلخانه	0.53	0.53	0.57	0.36	0.25	0.46	0.46	0.60	0.52	0.58	0.63	0.78					
روغنی II-درخت-۹-۱۳	0.51	0.59	0.47	0.27	0.00	0.35	0.44	0.45	0.44	0.54	0.60	0.61	0.56				
روغنی III-۱۱۲	0.67	0.67	0.48	0.23	0.01	0.29	0.49	0.49	0.38	0.62	0.77	0.75	0.63	0.63			
روغنی III-۱۱۹	0.65	0.65	0.48	0.24	0.01	0.28	0.47	0.48	0.32	0.62	0.77	0.75	0.61	0.59	0.94		
روغنی IV-۳۳۰	0.52	0.59	0.51	0.40	0.02	0.44	0.51	0.57	0.56	0.51	0.60	0.63	0.67	0.56	0.55	0.56	
روغنی IV-۳۳۱	0.64	0.62	0.55	0.32	0.02	0.33	0.41	0.50	0.44	0.56	0.72	0.73	0.55	0.57	0.75	0.74	0.64

جدول ۶- ضریب همبستگی کوفتیک مربوط به دندروگرام‌های به دست آمده با روش‌های مختلف

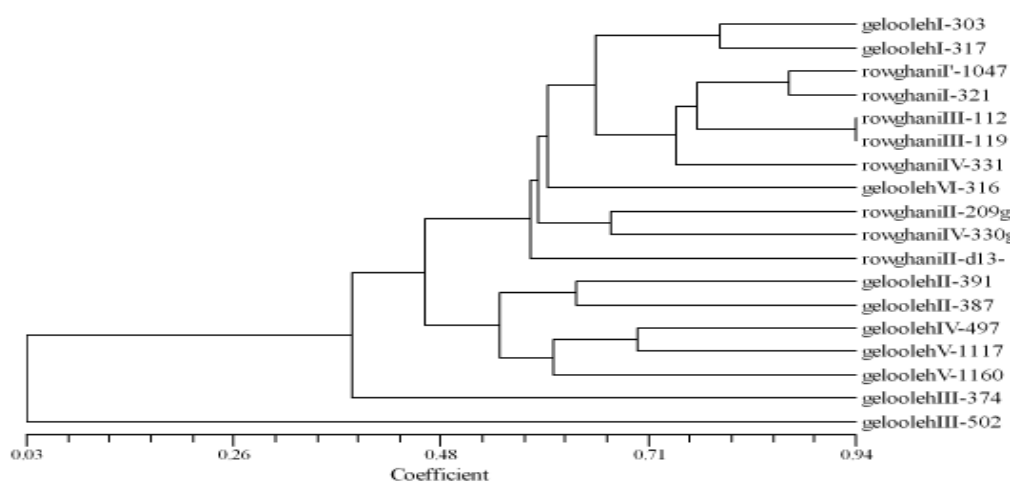
Single	Complete	WPGMA	UPGMA	
۰/۸۹	۰/۸۶	۰/۹۴	۰/۹۴	دایس
۰/۸۷	۰/۸۸	۰/۹۳	۰/۹۴	جاکارد
۰/۶۵	۰/۷۹	۰/۸۱	۰/۸۳	تطابق ساده



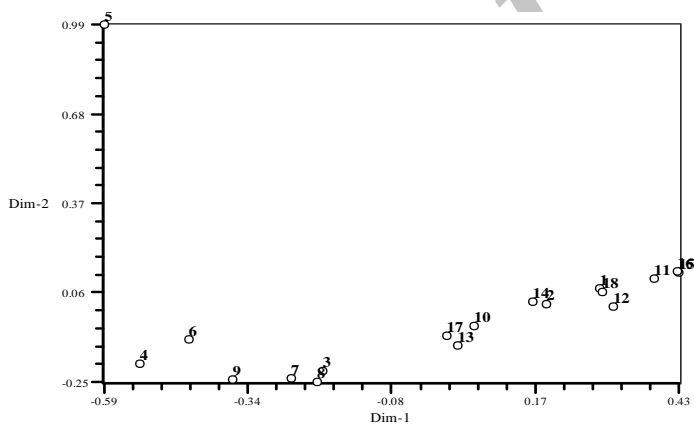
شکل ۱- نمودار مربوط به تعداد باندهای تکثیر شده و باندهای چندشکل بزاء هر آغازگر



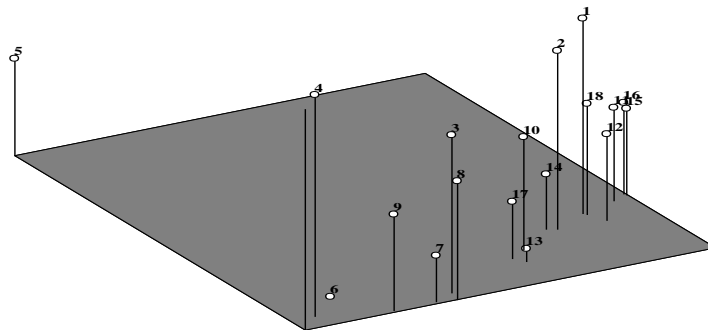
شکل ۲- نمودار درصد چند شکلی برای آغازگرها



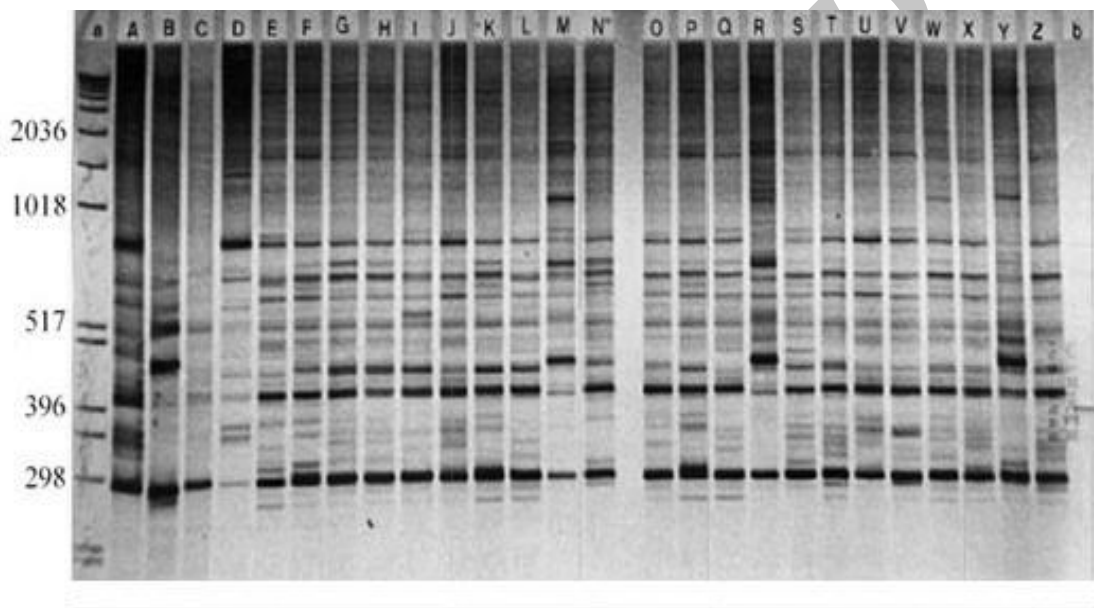
شکل ۳- دندروگرام حاصل از روش UPGMA و ضریب تشابه دایس برای ۱۸ ژنوتیپ زیتون



شکل ۴- نمودار دو بعدی مربوط به تجزیه مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه دایس برای ۱۸ رقم زیتون مورد استفاده



شکل ۵- نمودار مربوط به تجزیه مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه دایس برای ۱۸ رقم زیتون مورد استفاده



شکل ۶- ژل مربوط به برخی از نمونه‌ها

منابع

- Bautista,R., F.M.Canovas, and M.G.Claros. 2002. Genomic evidence for a repetitive nature of the RAPD polymorphisms in *Olea europaea* (Olive-tree). *Eupytica*. 130:185-190
- Bautista,R., R.Crespillo, F.M.Canovas, and M.G.Claros. 2003. Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Eupytica*. 129:33-41
- Belaj,A., I.Trujillo, R.De la Rosa, L.Rallo, and M.J.Gimenez. 2001. Polymorphism and discrimination capacity of random amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Soc. Acta. Hort. Sci.* 126(1):64-71
- Belej,A., I.Trujillo, and L.Rallo. 2002. RAPD's analysis support the autochthon origin of olive cultivars. *Acta. Hort. ISHS*. 83-86

- Besnard, G., Ph.Baradat, D.Chevalier, A.Tagmount, and A.Berville.** 2001. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 48(2):165-182
- Chowdhury, A.K., P.Srinives, P.Tongpamnak, P.Saksoong, and P.Chatwachirawong.** 2002. Genetic relationship among exotic soybean introductions in Thailand: consequence for varietal registration. *Science Asia*. 28:227-239
- Dhanaraj, A.L., E.V.V.Bhaskara Rao, K.R.M.Swamy, M.G.Bhat, D.Theertha Prasad, and S.N.Sondur.** 2002. Using RAPDs to assess the diversity in indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) germplasm. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77:41-47
- Doyle, J.J., and J.L.Doyle.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*. 19:11-15
- Ergulen, E., T.Ozkaya M., S.Ulger, and N.Ozilbey.** 2002. Identification of some Turkish olive cultivars by using RAPD-PCR technique. *Acta. Hort. ISHS*. 91-95
- Fernández, M., A.Figueiras, and C.Benito.** 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet*. 104(5):845-851
- Garcia, M.G., M.Ontivero, J.C.DiazRicci, and A.Castagnaro.** 2002. Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Theor. Appl. Genet*. 1061-1067
- Grati Kamoun, N., N.Oazzani, and A.Trigui.** 2002. Characterizing isozymes of some Tunisian olive cultivars. *Acta. Hort. ISHS*. 137-140
- Hosseini-Mazinani, S.M., S.M.Samaee, H.Sadeghi, and J.M.Caballero.** 2004. Evaluation of Olive Germplasm in Iran on the Basis of Morphological Traits: Assessment of 'Zard' and 'Rowghani' cultivars. *Acta. Hort. ISHS*. 634 pp
- Ibtesam, H.** 2009. Genetic Variation among *Bougainvillea glabra* Cultivars (Nyctaginaceae) Detected by Rapd Markers and Isozymes Patterns. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(1): 63-71
- Kahangi, E.M., M.A.Lawton, and C.A.C.Y.Kumar.** 2002. RAPD profiling of some banana varieties selected by small-scale farmers in Kenya. *Horticultural Science and Biotechnology*. 71:393-398
- Khadari, B., C.Breton, N.Moutier, J.P.Roger, G.Besnard, A.Berville, and F.Dosba.** 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet*
- La Mantia, M., J.Guerin, M.Sedgley, and E.Barone.** 2006. Identification of olive (*Olea europaea* L.) genotypes using SSR and RAPD markers. *Actes Editions, Rabat*
- Liang, C., and S.Yamaguchi.** 2002. Genetic diversity and phylogeny of tea plant (*Camellia sinensis*) and its related species and varieties in the section Tea genus *Camellia* determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77:729-732

- Manuela, M., and C. Gouveia.** 2005. Genetic diversity in *Hemileiavastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, 97(2), pp. 396–404
- Perri, E., A. Palopoli, and M. Pellegrino.** 2002. The use of RAPD markers for the study of olive germplasm from Apulia and Basilicata. *Acta. Hort. ISHS.* 87-90
- Prakash, D. P., P. N. Swamy, and S. N. Sondur.** 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 77:287-293
- Resta, P., A. Godini, R. Mariani, and M. Palasciano.** 2002. Use of AFLP to characterize Apulian olive cultivars. *Acta. Hort. ISHS.* 73-77
- Rotondi, A., M. Magli, C. Ricciolini, and L. Baldoni.** 2003. Morphological and molecular analysis for the characterization of a group of Italian olive cultivars. 132:129-137
- Samaee, S. M., Z. S. Shobbar, H. Ashrafi, S. M. Hosseini-Mazinani, and M. Sheidai.** 2004. Molecular Characterization of Olive Germplasm in Iran by Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): correlation with phenotypic studies. *Acta. Hort. ISHS.* 623
- Schiloro, E., S. Predieri, and A. Bertaccini.** 2001. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis to detect genetic variation in *Pyrus* species. *Plant Molecular Biology Reporter.* 4:271-278
- Sheidai, M., S. Vaezi-Joze, Z. H. Shahriari, Z. Noormohammadi, H. Parsian, and F. Farahanei.** 2007. Study of Genetic Diversity in Some Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars by Using RAPD Markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences; Issue: 17; pp: 2972-2975; Vol: 10*
- Simioniuc, D., R. Uptmoor, W. Friedt, and F. Ordon.** 2002. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding.* 121:429-435