

تنوع ژنتیکی کلون‌های زیتون ارقام زرد و روغنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

Genetic Diversity Among Olive Clones of Zard and Rowghani Cultivars Using Microsatellite Markers

فائزه جمشیدی جم^۱، ولی ربیعی^۲، حسین جعفری^۳، رضا فتوت^۴ و مهدی طاهری^۵

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳ و ۵- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۷

چکیده

جمشیدی جم، ف، ربیعی، و، جعفری، ح، فتوت، ر. و طاهری، م. ۱۳۹۳. تنوع ژنتیکی کلون‌های زیتون ارقام زرد و روغنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۳۴۵-۳۲۷.

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی کلون‌های ارقام زرد و روغنی زیتون، ابتدا صفات مورفولوژیک ۲۹ کلون از این دو رقم شامل شانزده صفت کمی و نوزده صفت کیفی مورد بررسی قرار گرفت، سپس از نشانگرهای ریزماهوره جهت بررسی دقیق‌تر این کلون‌ها و تعیین میزان چندشکلی آن‌ها استفاده شد. با استفاده از ۱۸ نشانگر، در مجموع ۵۲ آلل تکثیر شد که ۴۶ آلل چند شکل بودند. متوسط تعداد آلل در هر لوکوس ۲/۹۴۴ و بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب در محدوده ۰-۰/۹۳۱ و ۰-۰/۷۸۱-۰/۱۲۸ به دست آمد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۳۶۶ و بیشترین مقدار در جایگاه GAPU89 بود. میزان PIC رابطه مستقیمی با تعداد آلل و میزان تنوع در هر جایگاه داشت. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد در حد تشابه ۵۷ درصد کلون‌های مورد مطالعه را به پنج گروه تفکیک کرد. تجزیه واریانس مولکولی، تنوع معنی‌داری را درون و بین ارقام زرد و روغنی نشان داد (به ترتیب ۵۸ و ۴۲ درصد). به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که بین و درون کلون‌های ارقام زرد و روغنی مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود دارد که می‌تواند به دلیل وجود تفاوت‌های واقعی و یا مشکلات ناشی از نام گذاری اشتباه این کلون‌ها باشد. با توجه به اهمیت این ارقام، آگاهی از تفاوت‌های ژنتیکی و انجام مطالعات مورفولوژیک دقیق می‌تواند در تشخیص این ارقام و کلون‌های زرد و روغنی در مراحل اولیه رشد نهال‌ها، جهت احداث و توسعه باغ‌های یکنواخت، اهداف به‌نژادی و به‌گزینی کلون‌ها مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: زیتون، ارقام ایرانی، صفات مورفولوژیک، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهوره.

مقدمه

مورفولوژیکی برای توصیف و شناسایی ژرم پلاسما زیتون در بسیاری از کشورهای زیتون خیز مفید بوده است (Taamalli et al., 2006؛ Ataei et al., 2004؛ Cantini et al., 1999). با این حال تشخیص و تمایز ارقام بر اساس ارزیابی‌های مورفولوژیکی با توجه به تأثیر شرایط محیطی، نیاز به مشاهدات گسترده گیاهان بالغ و نیاز به افراد آموزش دیده ماهر محدود می‌شود (Noormohammadi et al., 2007)، بنابراین نشانگرهای مولکولی ابزارهای مکملی برای روش‌های مورفولوژیکی در شناسایی دقیق و مطمئن ژنوتیپ‌ها هستند (Omrani-Sabbaghi et al., 2007). تعیین هویت دقیق کلون‌ها، ارقام یا گونه‌های گیاهی به خصوص گیاهانی که دارای تکثیر رویشی هستند مانند درختان زیتون از اهمیت فراوانی برخوردار است. ابهامات زیادی در مورد نام ارقام در همه کشورهای تولیدکننده زیتون وجود دارد. ممکن است نامی یکسان به ارقام مختلف داده شده باشد (هم نام Homonym) و یا ممکن است یک رقم در مناطق یا کشورهای مختلف با نام‌های متفاوت (مترادف Synonym) خوانده شود (Torkzaban et al., 2010). ریز ماهواره‌ها نشانگرهای بسیار مناسبی برای انگشت‌نگاری و آشکار کردن تنوع ژنتیکی در ارقام زیتون هستند (Rallo et al., 2000؛ Cipriani et al., 2002؛ Diaz et al., 2006؛ Khadari et al., 2003

زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. یک گیاه مخصوص مناطق نیمه گرمسیری است و از هزاران سال پیش توسط بشر شناخته شده است. درخت زیتون در اقلیم مدیترانه‌ای با آب و هوای معتدل و زمستان‌های ملایم رشد و نمو می‌کند (Mohammadi and Vakili, 2007). زیتون به عنوان مهم‌ترین محصول تولیدکننده روغن در منطقه مدیترانه به شمار می‌رود و یک گونه دیپلوئید و دگر گرده‌افشان است (Belaj et al., 2003). به دلیل طولانی بودن مرحله نونهالی، مشکلات مرتبط با دست‌ورزی درخت، همچنین سطح پیچیدگی ژنتیکی گونه‌ها با ۴۶ کروموزوم ($n = 23$) و در دسترس نبودن اطلاعات ژنتیکی، اصلاح هدفمند زیتون نسبتاً مشکل است (Omrani-Sabbaghi et al., 2007). با در نظر گرفتن درجه بالای تنوع و پراکنش وسیع زیتون در ایران ذخیره ژنتیکی آن می‌تواند یکی از غنی‌ترین و مهم‌ترین ذخایر ژنی در میان کشورهای زیتون‌خیز جهان باشد (Torkzaban et al., 2010). با وجود این که تعداد زیادی از ارقام زیتون در ایران در حال رشد است، اما گزارش‌های اندکی از ویژگی‌های مورفولوژیکی، سیتولوژیکی و مولکولی این توده‌ها وجود دارد (Samaee et al., 2003؛ Hosseini-Mazinani and Samaee, 2004؛ Sheidai et al., 2010). استفاده از نشانگرهای

شهرستان طارم انتخاب شد. انتخاب درختان به عنوان ارقام زرد و روغنی با توجه به نظر کارشناسان و باغداران بومی منطقه انجام شد. لازم به ذکر است که همه درختان انتخابی به صورت رویشی تکثیر شده بودند.

بررسی صفات مورفولوژیک: برای انجام این بررسی شانزده صفت کمی و نوزده صفت کیفی مورفولوژیک انتخاب شدند و سپس بررسی‌های لازم بر اساس دستورالعمل شورای بین‌المللی روغن زیتون (Barranco *et al.*, 2000) (IOOC) و دستورالعمل ارائه شده توسط مؤسسه ثبت و گواهی بذر و نهال (Anonymous, 2007) بر روی برگ، گل، میوه و هسته درختان انتخابی انجام شد، به جز کلون‌های زرد ۱۱ و ۱۳ که طی دو سال متوالی به دلیل عدم باردهی امکان اندازه‌گیری صفات مورد نظر میسر نشد. برآورد میانگین صفات کمی با اندازه‌گیری شاخص مورد نظر در ۴۰ برگ، میوه و هسته در هر درخت تعیین شد. برای اندازه‌گیری شاخص‌های مربوط به گل آذین تعداد چهار شاخه به صورت تصادفی در چهار جهت درخت انتخاب شده و شاخص‌های مورد نظر روی این چهار شاخه بررسی شدند. صفات کمی مورد مطالعه شامل طول برگ، پهنای برگ، نسبت طول به پهنای برگ، طول میوه، قطر میوه، نسبت طول به قطر میوه، طول هسته، قطر هسته، نسبت طول به قطر هسته، وزن تر میوه، وزن تر گوشت میوه، وزن تر هسته،

Noormohammadi *et al.*, 2009؛ Belaj *et al.*, 2004a). در پژوهشی سه رقم زیتون کارولئا، کوراتینا و فرانتیو در مناطق مرکزی و جنوبی ایتالیا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی شد. نتایج نشان داد که کارولئا یک رقم پلی کلونال است در حالی که کوراتینا و فرانتیو احتمالاً یک مونوکلون هستند (Muzzalupo *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر ۱۳۰ درخت از مناطق مختلف اروپا با چهارده نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه پروفایل آللی مختلفی از ارقامی که به عنوان مترادف در نظر گرفته می‌شدند به دست آمد و وجود نمونه‌های هم نام یا نامگذاری اشتباه در کلکسیون ژرمپلاس زیتون مورد مطالعه گزارش شد (Lopes *et al.*, 2004). با توجه به این که ارقام زرد و روغنی از ارقام مهم موجود در کشور هستند و این ارقام از یکنواختی درون رقم برخوردار نیستند، در پژوهش حاضر تلاش شد تا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تنوع ژنتیکی بین این دو رقم مهم و کلون‌های آن‌ها در شهرستان طارم (استان زنجان) مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به منظور انجام این بررسی پانزده کلون رقم زرد و چهارده کلون رقم روغنی از ایستگاه تحقیقات زیتون گیلوان (شهرستان طارم، استان زنجان) و نقاط دیگر

UDO99-012، UDO99-017، UDO99-024،
 UDO99-025، UDO99-027، UDO99-035،
 UDO99-043 (Cipriani et al., 2002)،
 GAPI59، GAPI71B، GAPI72،
 GAPI89، GAPI101، GAPI108،
 GAPI103A (Carriero et al., 2002) انجام
 شد. واکنش PCR با استفاده از مواد تهیه شده از
 شرکت سیناژن و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر
 شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR 10X،
 ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۴ میکرولیتر
 مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs)، ۰/۲ میکرولیتر
 آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ میکرولیتر
 از هر آغازگر و ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و
 ۱۰/۸ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر انجام
 شد. برنامه گرمایی PCR شامل یک چرخه
 واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه
 سانتی‌گراد و سپس تعداد ۳۸ چرخه شامل
 واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه
 سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها
 به رشته DNA در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به
 مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه
 سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک
 چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد
 به مدت ۸ دقیقه بود. محصولات PCR با مقدار
 ۱۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و پس
 از ۵ دقیقه گرم کردن در دمای ۹۵ درجه
 سانتی‌گراد و سرد کردن در یخ، مقدار
 ۱۱ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک ژل
 آکرلامید ۸٪ بارگذاری شد و جهت نمایان

نسبت گوشت به میوه، وزن خشک گوشت،
 تعداد گل آذین در شاخه و درصد روغن و
 صفات کیفی مورد مطالعه شامل طول گل آذین،
 تعداد گل در گل آذین، شکل میوه، تقارن A
 میوه، موقعیت بزرگ‌ترین قطر میوه، نوک میوه،
 قاعده میوه، پستانک، تعداد عدسک‌ها، اندازه
 عدسک‌ها، مکان شروع تغییر رنگ میوه، شکل
 هسته، تقارن A هسته، تقارن B هسته، موقعیت
 بزرگ‌ترین قطر هسته، نوک هسته، قاعده هسته،
 سطح هسته، تعداد شیارهای هسته اندازه‌گیری
 شد.

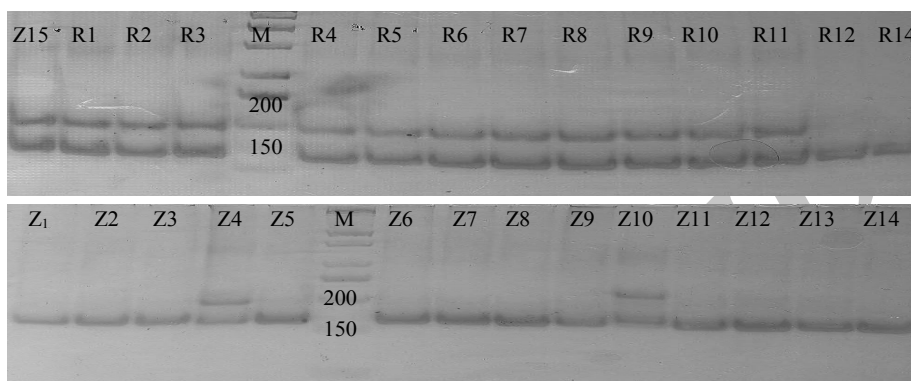
استخراج DNA: نمونه‌ی برگ‌ی جوان از
 درختان انتخاب شده تهیه و بلافاصله به نیتروژن
 مایع برای انجام مراحل بعدی تحقیق
 منتقل شدند. استخراج DNA ژنومی از
 برگ‌های جوان با روش ورابی و همکاران
 (Vrohbi et al., 1996) با اندکی تغییرات انجام
 شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با
 استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و
 دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. نمونه‌های
 DNA برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای
 پلیمرز (PCR) در حدود غلظت ۲۵ ng/μl
 رقیق شد.

سنجش ریز ماهواره‌ها: واکنش زنجیره‌ای
 پلیمرز (PCR) با استفاده از ۱۸ نشانگر
 اختصاصی زیتون UDO99-006، UDO99-
 007، UDO99-009، UDO99-011

هر نشانگر به صورت وجود یا عدم وجود باند (یک برای مشاهده آلل و صفر در صورت عدم مشاهده آلل) امتیازدهی شد (شکل ۱).

کردن قطعات DNA در ژل از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: الگوی نواری به دست آمده از واکنش PCR نمونه‌ها برای



شکل ۱- الگوی چند شکلی نشانگر GAPU108 روی ژل اکریلامید ۸٪ رنگ آمیزی شده با نیترات نقره
Fig. 1. Polymorphism pattern of primer GAPU 108 on 8% polyacrylamide gel staining with silver nitrate

استفاده شد. لازم به ذکر است که جهت انجام تجزیه واریانس مولکولی کلون‌های مورد مطالعه بر حسب رقم به دو گروه زرد و روغنی تقسیم شدند. محتوای اطلاعات چند شکلی ریز ماهواره‌ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2 P_i^2 P_j^2$$

که در آن P_i فراوانی I امین آلل، P_j فراوانی ز امین آلل و k تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی است.

تجزیه خوشه‌ای داده‌ها به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد (Sneath and Sokal, 1973) و ضریب کوفنتیکی به منظور تعیین میزان برآزش ماتریس تشابه با دندروگرام حاصله با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998) انجام شد. به منظور محاسبه تعداد آلل‌ها، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص تثبیت ژنی، فراوانی آلل‌ها، شاخص اطلاعاتی شانون، احتمال یکسانی و تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها (AMOVA) از نرم‌افزار GeneAlex 6.41 (Peakall and Smouse, 2006)

نتایج و بحث

کلون‌های ارقام زرد و روغنی زیتون و محل نمونه‌برداری آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. مکان‌های ریزماهواره مورد بررسی، تعداد آبل به دست آمده، تعداد آبل مؤثر،

هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص اطلاعاتی شانون، محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص تثبیت ژنی و احتمال یکسانی محاسبه شده برای ۱۸ مکان ریز ماهواره مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- کلون‌های ارقام زرد و روغنی زیتون و محل نمونه‌برداری آن‌ها
Table 1. Clones of Zard and Rowghani olive cultivars and their sampling locations

Name of location	نام محل	Number of trees	شماره درختان
Olive Research Station of Guilvan	ایستگاه تحقیقات زیتون گیلوان	Zaer 1-10	زرد ۱ تا ۱۰
Agrucyltural Services Center of Dastjerdeh	مرکز خدمات کشاورزی دستجرده	Zard 11-13	زرد ۱۱ تا ۱۳
Zehtaran Village	روستای زهر آباد	Zaed 14	زرد ۱۴
Olive Research Station of Guilvan	ایستگاه تحقیقات زیتون گیلوان	Zard 15	زرد ۱۵
Olive Research Station of Guilvan	ایستگاه تحقیقات زیتون گیلوان	Rowghani 1-9	روغنی ۱ تا ۹
Agricultural Service Center Dastjerdeh	مرکز خدمات کشاورزی دستجرده	Rowghani 10 and 11	روغنی ۱۰ و ۱۱
Village Dastjerdeh	روستای دستجرده	Rowghani 12 and 13	روغنی ۱۲ و ۱۳
Village Zahtrabad	روستای زهر آباد	Rowghani 14	روغنی ۱۴

مطالعه و همچنین تعداد ژنوتیپ‌ها و موقعیت آن‌ها وابسته است (Lopes *et al.*, 2004). به طوریکه عمرانی صباغی و همکاران (Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007)، نورمحمدی و همکاران (Noormohammadi *et al.*, 2009)، دلارزا و همکاران (De la Roza *et al.*, 2002)، بلاج و همکاران (Belaj *et al.*, 2004a)، زاهر و همکاران (Zaher *et al.*, 2011)، لویز و همکاران (Lopes *et al.*, 2004) و مزالوپو و همکاران (Muzzalupo *et al.*, 2010) به ترتیب تعداد متوسط ۸/۵۷، ۴/۲، ۵/۷، ۵/۲، ۲/۴، ۹/۶ و ۴/۴ آبل در هر جایگاه را گزارش کردند.

با استفاده از ۱۸ نشانگر ریزماهواره در ۲۹ کلون زرد و روغنی مورد مطالعه در مجموع ۵۲ آبل تکثیر شد که ۴۶ آبل چند شکل بودند. تعداد آبل‌های آشکار شده به ازای هر لوکوس در کلون‌های دو رقم مورد مطالعه از ۲ تا ۶ متغیر و دارای میانگین ۲/۹۴۴ بود. بیشترین تعداد آبل مؤثر در جمعیت کل مربوط به جایگاه GAPU89 و کمترین مقدار مربوط به جایگاه UDO99-043 بود (جدول ۲). هر چه تعداد آبل‌های مشاهده شده و مؤثر بیشتر باشد نشان دهنده تنوع بیشتر در جمعیت مورد مطالعه است. به طور کلی تنوع در میانگین تعداد آبل به دست آمده در هر جایگاه به تنوع در مکان‌های مورد

جدول ۲- پارامترهای محاسبه شده برای کلون‌های ارقام زرد و روغنی زیتون در ۱۸ جایگاه ریزماهواره

Table 2. Values of calculated parameters for clones of Zard and Rowghani olive cultivars in 18 microsatellite loci

جایگاه ریزماهواره Locus	تعداد آلل‌های مختلف Na	تعداد آلل‌های مؤثر Ne	هتروزیگوسیتی مورد انتظار He	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Ho	شاخص اطلاعاتی شانون I	میزان اطلاعات پلی مورفیک PIC	شاخص ثبیت ژنی F	احتمال یکسانی PI	قدرت تفکیک D
GAPU108	3	1.597	0.374	0.483	0.615	0.310	0.291-	0.45	0.55
GAPU59	2	1.708	0.414	0.586	0.605	0.328	-0.415	0.43	0.57
GAPU103A	3	1.198	0.165	0.179	0.346	0.156	-0.081	0.71	0.29
UDO99-007	2	1.859	0.462	0.034	0.655	0.355	0.925	0.40	0.60
UDO99-011	2	1.787	0.441	0.655	0.632	0.344	-0.487	0.41	0.59
GAPU71B	3	2.187	0.543	0.759	0.927	0.481	-0.398	0.27	0.73
UDO99-012	3	2.346	0.574	0.690	0.949	0.472	-0.202	0.26	0.74
UDO99-017	2	1.533	0.348	0.448	0.532	0.287	-0.289	0.49	0.51
UDO99-024	3	1.809	0.447	0.621	0.728	0.373	-0.388	0.38	0.62
GAPU72	4	2.441	0.590	0.448	1.043	0.527	0.241	0.23	0.77
UDO99-006	3	1.150	0.130	0.103	0.290	0.125	0.205	0.76	0.24
UDO99-009	3	1.898	0.473	0.690	0.756	0.371	-0.457	0.36	0.64
UDO99-035	3	2.204	0.546	0.103	0.859	0.444	0.811	0.31	0.69
UDO99-027	2	1.708	0.414	0.517	0.605	0.328	-0.248	0.43	0.57
GAPU101	3	1.997	0.499	0.370	0.866	0.446	0.258	0.30	0.70
UDO99-043	2	1.147	0.128	0.000	0.251	0.120	1.000	0.77	0.23
UDO99-025	3	2.074	0.518	0.786	0.806	0.416	-0.517	0.33	0.67
GAPU89	6	2.558	0.781	0.931	1.589	0.711	-0.193	0.084	0.916
Mean	2.944	1.956	0.436	0.469	0.727	0.366	-0.044	0.41	0.59

Na: Number of different alleles; Ne: Number of effective alleles; He: Expected heterozygosity; Ho: Observed heterozygosity; I: Shannon's information index; PIC: Polymorphism information content; F: Gene fixing index; PI: Probability of identity; D: Discrimination power

هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار در این شش مکان به علت وجود آلل‌های نول است. وجود آلل‌های نول نتیجه توالی پلی مورف در نقاط حاشیه‌ای لوکوس در اثر جهش‌های نقطه‌ای یا حذف/اضافه است (Jones and Arden, 2003). مقدار PIC محاسبه شده بین ۰/۷۱۱-۰/۱۲۰ در ۱۸ جایگاه ریز ماهواره متغیر بود. مقادیر بالای این شاخص بیانگر چند شکلی بالا و وجود آلل‌های نادر در یک جایگاه ژنی است (Dolati Bane *et al.*, 2010). مقادیر PIC بالاتر از ۰/۵ مثل GAPU72 نشانگرهای Informative (حاوی اطلاعات) هستند در حالیکه جایگاه‌های با مقادیر PIC بالاتر از ۰/۷ مثل GAPU89 برای نقشه یابی ژنتیکی مناسب هستند (Bandelj *et al.*, 2004). منفی شدن شاخص تثبیت ژنی (F) نشان‌دهنده بالاتر بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به قابل انتظار است که با توجه به دگرگرده افشان بودن زیتون و همچنین رابطه عکس بین میزان هتروزیگوسیتی و تعداد آلل مؤثر با احتمال یکسانی و بالا بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مورد آن‌ها می‌توان منفی بودن شاخص تثبیت ژنی را توجیه کرد. کمترین مقدار احتمال یکسانی که نشان‌دهنده تنوع حداکثر کلون‌های مورد مطالعه و قدرت تمایز بالای نشانگرها است، مربوط به نشانگرهای GAPU89، GAPU72، UDO99-012 و GAPU71B بود و نشانگر UDO99-043

در ارتباط با اندازه آلل‌های تولید شده، تقریباً همه نشانگرهای مورد استفاده، نوارهای مطابق با اندازه مورد انتظار در زیتون تولید نمودند. برخی از نشانگرهای مورد استفاده مثل GAPU89، GAPU71B، GAPU101 ناحیه ژنومی را تکثیر کردند که این مورد توسط عمرانی-صبغی و همکاران (Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007) نیز گزارش شده است، که می‌تواند ناشی از وجود نواحی تکرار شونده در ژنوم باشد که اغلب در یوکاریوت‌ها یافت می‌شود (Devos *et al.*, 1995). میانگین هتروزیگوسیتی موردانتظار (He) ۰/۴۳۶ و مشاهده شده (Ho) ۰/۴۶۹ بود (جدول ۲). میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در گروه زرد ۰/۳۷۲ و در گروه روغنی ۰/۵۷۱ به دست آمد (جدول ۳). بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نشانگر GAPU89 (۰/۹۳۱) و کمترین آن در مکان‌های UDO99-043 و UDO99-007 (به ترتیب ۰ و ۰/۰۳۴) به دست آمد. مکان‌های GAPU89 و GAPU72 بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (به ترتیب ۰/۷۸۱ و ۰/۵۹۰) و نشانگر UDO99-043 کمترین مقدار (۰/۱۲۸) را نشان دادند (جدول ۲). اگر مقایسه‌ای بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار انجام شود آشکار می‌شود که در اکثر مکان‌ها به جز شش مکان مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار بیشتر است. احتمالاً کمتر بودن

جدول ۳- میانگین پارامترهای محاسبه شده برای کلون‌های ارقام زرد و روغنی زیتون به تفکیک گروه

Table 3. Means of calculated parameters for clones of Zard and Rowghani olive cultivars in separated groups

رقم	تعداد کلون	تعداد آلل‌های مختلف	تعداد آلل‌های مؤثر	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	شاخص شانون	احتمال یکسانی
Cultivar	Number of clones	Na	Ne	He	Ho	I	PI
Zard	15	2.778	1.709	0.370	0.372	0.629	0.47
Rowghani	14	2.500	1.761	0.380	0.571	0.600	0.49

Na: Number of different alleles; Ne: Number of effective alleles; He: Expected heterozygosity; Ho: Observed heterozygosity; I: Shannon's information index; PI: Probability of identity.

مختلف مورد آزمون قرار گرفت و در نهایت روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای گروه‌بندی استفاده شد. ضریب کوفنتیکی به منظور برآزش ماتریس تشابه و دندروگرام حاصله ($r = 0.96$) محاسبه شد، که بیانگر کارایی روش مورد استفاده برای تجزیه خوشه‌ای بود. شکل ۲ دندروگرام حاصل برای کل جمعیت مورد مطالعه را نشان می‌دهد. دندروگرام حاصل در حد تشابه ۵۷ درصد پس از جدا کردن کلون‌های زرد ۱۰ و روغنی ۱۳ در دو گروه مجزا، کلون‌های باقیمانده را در سه گروه جای داد.

در جدول ۵ اختلافات مورفولوژیک در بین دو رقم زرد و روغنی و کلون‌های انتخابی این ارقام به وضوح قابل مشاهده است.

کلون زرد ۱۰ دارای هسته بیضوی، نوک برجسته، قاعده برجسته و میوه‌های بیضوی با وزن متوسط بود و دارای ریزش زیادی در هنگام رسیدن میوه بود. کلون روغنی ۱۳ دارای هسته کروی، نوک گرد، قاعده تخت و میوه‌های گرد و درشت و درصد روغن در ماده

بیشترین مقدار احتمال یکسانی برابر با ۰/۷۷ را دارا بود که نشان از توانایی پایین این مکان در جداسازی کلون‌ها دارد. از این نشانگرها می‌توان در مطالعات آتی جهت شناسایی ارقام و کلون‌های زیتون زرد و روغنی استفاده کرد. توانایی این نشانگرها در تمایز ارقام توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Noormohammadi *et al.*, 2007; Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007; Ipek *et al.*, 2012; Khadari *et al.*, 2007).

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تفاوت معنی‌داری بین دو رقم زرد و روغنی و درون این ارقام نشان داد. به طوری که ۴۲ درصد تنوع ژنتیکی بین دو رقم و ۵۸ درصد درون این ارقام به دست آمد (جدول ۴). سطح بالای واریانس ژنتیکی درون ارقام می‌تواند به دلیل نامگذاری اشتباه یا وجود هم‌نام‌ها در ارقام تکثیر شده به روش رویشی از گیاهان مادری باشد (Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007).

برای گروه‌بندی کلون‌ها روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای بر اساس چندین ضریب تشابه

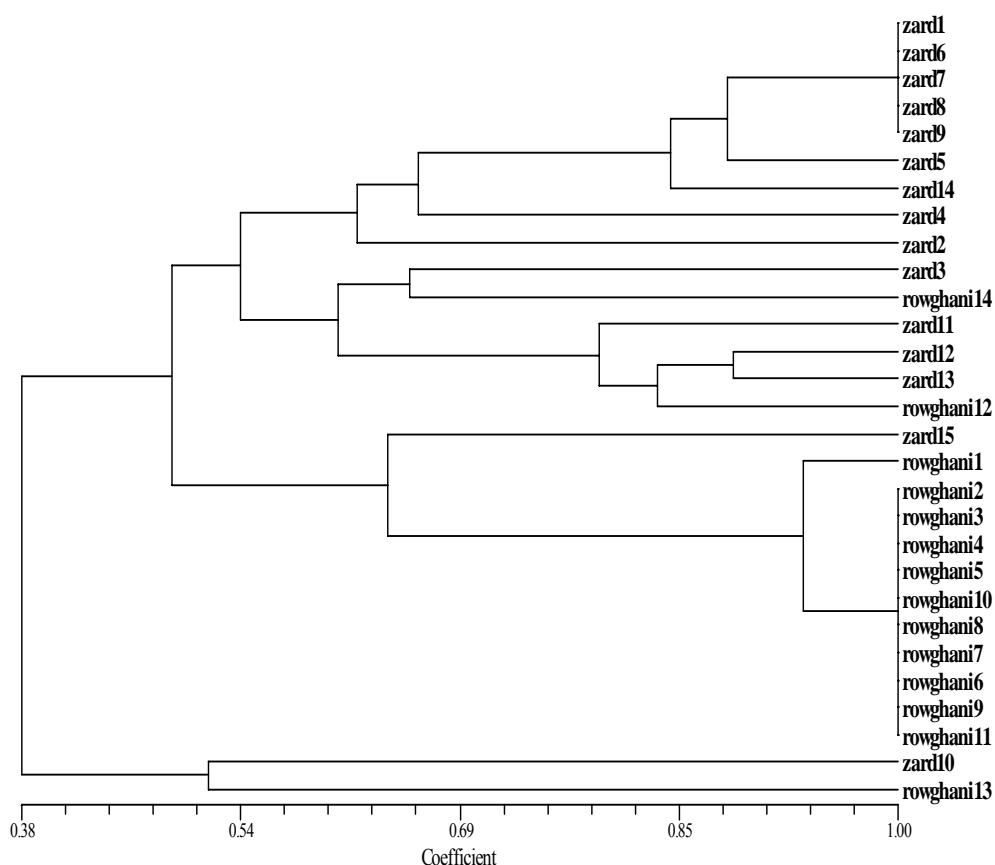
جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی کلون‌های دو گروه زرد و روغنی زیتون بر اساس داده‌های مولکولی

Table 4. Analysis of molecular variance of clones of two groups of Zard and Rowghani olive based on molecular data

S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	واریانس تخمینی Est. var.	درصد تنوع Variation (%)	احتمال P-value
Among groups	بین گروه‌ها	1	66.045	66.045**	4.164	42	0.010
Within groups	درون گروه‌ها	27	154.886	5.737**	5.737	58	0.010
Total	کل	28	220.931	-	9.901	100	

** : Significant at 1% probability level.

** : معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی کلون‌های ارقام زرد و روغنی زیتون، با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد

Fig. 2. Dendrogram of clones of Zard and Rowghani olive cultivars using UPGMA method based on Jaccard similarity coefficients

جدول ۵ - برخی صفات مورفولوژیک اندازه گیری شده در کلون‌های انتخابی زرد و روغنی زیتون
Table 5. Some morphological traits measured in clones of Zard and Rowghani olive cultivars

Clone	Oil (code)	FFW (g)	FLFW (g)	FDW (g)	LWF	BF (code)	AF (code)	FF (%)	FL (mm)	FW (mm)	SCCF (code)	FN (code)	FS (code)	PMF (code)	SL (code)	NL (code)
Zard1	2	4.60	3.87	1.53	1.29	1	2	84.10	23.32	18.07	2	1	2	2	1	2
Zard2	2	5.57	4.69	1.36	1.25	2	2	83.97	23.49	18.78	2	1	1	2	1	2
Zard3	3	4.26	3.65	1.04	1.11	1	2	85.68	20.64	18.54	3	1	1	2	1	2
Zard4	4	3.86	3.14	1.11	1.47	1	2	81.33	24.29	16.54	3	1	2	3	2	2
Zard5	3	4.43	3.73	1.34	1.32	2	2	84.14	24.21	18.36	3	1	1	2	2	2
Zard6	2	4.34	3.66	1.41	1.28	1	2	84.37	22.83	17.88	2	1	1	2	1	2
Zard7	2	5.00	4.26	1.70	1.29	1	2	85.20	23.28	18.10	2	1	1	2	1	1
Zard8	4	4.93	4.19	1.61	1.29	1	2	84.98	23.52	18.22	2	1	1	3	1	2
Zard9	2	4.86	4.12	1.70	1.25	2	2	84.81	22.48	17.93	2	1	1	3	1	2
Zard10	3	3.27	2.79	0.98	1.41	2	2	85.32	22.30	15.76	3	1	1	2	1	2
Zard12	1	2.30	1.71	0.89	1.32	1	2	74.34	21.81	16.54	2	2	1	2	2	2
Zard14	2	3.81	3.19	0.91	1.32	2	2	83.72	21.66	16.39	2	1	1	2	2	2
Zard15	3	2.64	2.13	0.75	1.29	1	2	80.68	20.39	15.83	2	3	1	3	1	1
Rowghani1	4	4.48	3.81	1.66	1.48	2	1	85.04	24.96	16.88	3	2	2	3	2	2
Rowghani2	3	4.52	3.81	1.66	1.42	2	1	84.29	24.72	17.37	3	2	2	3	2	2
Rowghani3	4	4.60	3.79	1.72	1.39	2	1	84.56	24.66	17.76	3	2	2	3	2	2
Rowghani4	3	4.50	3.83	1.76	1.44	2	1	85.11	24.72	17.21	3	1	1	2	2	2
Rowghani5	3	4.28	3.66	1.73	1.44	2	1	85.51	24.69	17.16	3	1	2	3	2	2
Rowghani6	4	4.29	3.72	1.56	1.40	1	2	86.71	24.03	17.13	3	1	1	2	2	2
Rowghani7	4	4.40	3.72	1.47	1.42	2	1	84.54	24.97	17.54	3	1	2	3	2	2
Rowghani8	3	4.56	3.92	1.73	1.43	2	1	85.96	25.05	17.56	3	2	2	2	1	2
Rowghani9	4	4.21	3.60	1.62	1.47	2	1	85.51	24.40	16.59	3	1	2	2	1	2
Rowghani10	2	3.59	2.83	1.07	1.49	2	1	70.65	21.05	14.13	3	1	1	2	1	1
Rowghani11	2	3.15	2.65	0.74	1.37	1	1	76.74	18.89	13.80	3	1	1	2	1	2
Rowghani12	2	3.83	3.17	0.81	1.36	2	1	82.76	23.36	17.15	3	2	1	2	1	2
Rowghani13	2	5.64	4.88	1.65	1.15	1	2	86.52	23.36	20.32	3	3	1	2	2	2
Rowghani14	3	4.72	3.96	1.62	1.38	2	1	83.89	23.37	16.93	2	1	2	3	2	2

FFW: Fruit Fresh Weight; FLFW: Flesh Fresh Weight; FDW: Fruit Dry Weight; LWF: Length/Width of Fruit; BF: Base of Fruit; AF: Apex of Fruit; FF: Flesh/Fruit; FL: Fruit Length; FW: Fruit Width; SCCF: Start of Color Change; FN: Fruit Nipple; FS: Fruit Symmetry; PMF: Position of Maximum Transfer Diameter of Fruit; SL: Size of Lenticels; NL: Number of Lenticels.

Table 5. Continued

Clone	تعداد	طول	تعداد	طول	قطر	طول به	شکل هسته	وزن	طول	قطر	قاعده	نوک	تقارن	تقارن	سطح	تعداد	موقعیت
	گل آذین در شاخه	گل آذین	گل در گل آذین	برگ	برگ	قطر برگ	(طول/قطر)	هسته	هسته	هسته	هسته	هسته	موقعیت A	موقعیت B	بذر	شیارها	قطر هسته
	INN	INL (code)	NFI (code)	LL (mm)	LW (mm)	LWL (mm)	LWE	EFW (g)	EL (mm)	EW (mm)	BE (code)	AE (code)	ESA (code)	ESB (code)	ESU (code)	NOG (code)	PME (code)
Zard1	20.00	2	2	57.83	13.17	44.6	1.66	0.73	15.07	9.09	3	1	1	1	2	2	2
Zard2	16.25	1	1	53.45	9.99	53.8	1.53	0.88	15.48	10.10	1	2	2	1	3	3	3
Zard3	30.00	3	3	67.30	13.38	50.6	1.31	0.61	12.11	9.25	3	2	2	1	3	3	2
Zard4	22.25	3	2	55.81	11.06	50.8	2.08	0.72	17.03	8.21	2	1	2	2	2	2	3
Zard5	12.00	2	1	52.03	11.69	44.8	1.76	0.70	15.78	8.99	1	1	1	1	3	3	3
Zard6	16.75	2	1	55.30	13.82	40.2	1.75	0.68	15.27	8.73	1	1	1	1	2	2	3
Zard7	30.50	2	1	57.26	13.44	42.9	1.68	0.74	15.37	9.15	1	1	2	1	3	3	3
Zard8	24.75	2	1	57.21	12.82	44.9	1.71	0.74	15.56	9.11	1	1	1	1	3	3	3
Zard9	16.00	2	1	57.45	13.40	43.1	1.62	0.74	15.00	9.28	1	1	1	1	3	3	3
Zard10	31.75	1	2	57.74	12.24	47.5	1.96	0.48	14.51	7.43	2	1	2	1	2	2	3
Zard12	17.50	1	2	55.33	11.30	49.1	1.72	0.59	14.44	8.39	2	1	2	1	3	2	2
Zard14	9.75	2	1	61.97	12.92	48.2	1.81	0.62	15.00	8.33	3	1	2	1	2	2	2
Zard15	17.50	2	1	55.03	11.40	48.8	1.65	0.51	13.63	8.26	3	2	2	2	3	2	3
Rowghani1	26.25	3	3	59.87	13.11	4.10	2.03	0.67	17.62	8.69	2	1	2	1	2	2	3
Rowghani2	22.75	2	2	64.24	15.60	41.6	1.94	0.71	16.99	8.79	2	1	2	1	2	3	3
Rowghani3	32.00	2	3	59.18	13.37	44.7	2.03	0.81	17.65	8.71	2	1	2	1	2	2	3
Rowghani4	29.75	2	2	59.10	13.90	43.2	1.95	0.67	16.99	8.71	2	1	1	1	3	3	3
Rowghani5	24.50	2	2	63.13	15.07	42.3	1.95	0.62	16.48	8.46	2	1	2	1	2	2	3
Rowghani6	26.25	2	2	55.23	11.90	46.9	1.98	0.57	16.19	8.18	2	1	1	1	3	2	3
Rowghani7	31.00	3	3	59.76	13.47	44.7	2.05	0.68	17.23	8.41	2	1	2	1	2	2	3
Rowghani8	26.25	2	3	61.30	14.10	43.9	1.98	0.64	16.82	8.52	2	1	1	1	3	2	3
Rowghani9	22.00	2	2	58.56	13.20	44.7	2.08	0.61	17.16	8.26	2	1	2	1	2	2	2
Rowghani10	12.50	1	2	49.16	11.59	44.4	1.98	0.76	17.15	8.68	3	1	2	2	3	2	2
Rowghani11	13.75	2	1	54.63	13.27	41.5	1.68	0.50	12.82	7.64	3	2	1	1	3	2	2
Rowghani12	28.25	2	3	59.70	11.50	50.3	1.80	0.66	15.37	8.54	3	2	1	1	3	3	2
Rowghani13	14.75	2	2	62.13	12.87	48.7	1.38	0.76	13.38	9.69	1	2	1	1	3	3	2
Rowghani14	14.75	2	1	55.59	12.25	46.0	1.93	0.76	16.77	8.73	2	1	2	1	3	2	3

INN: Inflorescence Number; INL: Inflorescence Length; NFI: Number of Flowers/Inflorescence; LL: Leaf Length; LW: Leaf Width; LWL: Length/ Width of Leaf; LWE: Length/Width of Endocarp; EFW: Endocarp Fresh Weight; EL: Endocarp Length; EW: Endocarp Width; BE: Base of Endocarp; AE: Apex of Endocarp; ESA: Endocarp Symmetry in position A; ESB: Endocarp Symmetry in position B; ESU: Endocarp Surface; NOG: Number of Grooves; PME: Position of Maximum Transfer Diameter of Endocarp.

اصلی بود که زیر گروه اول شامل کلون‌های زرد ۱۵ و زیر گروه دوم شامل کلون‌های روغنی ۱، ۱۱، ۹، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۵، ۳، ۴، ۳ و ۲ بود. کلون‌های موجود در این زیر گروه نیز با استفاده از ۱۸ نشانگر مورد استفاده پروفایل آللی یکسانی نشان دادند و هیچ گونه چند شکلی ژنتیکی در این کلون‌ها دیده نشد. این گروه دارای میوه‌های بیضوی و کشیده، قاعده برجسته و گرد، هسته تخم مرغی و بیضوی شکل که تقارن هسته در این گروه در موقعیت A به صورت متقارن و تا حدی متقارن بودند. در این گروه کلون‌های روغنی ۳ دارای وزن بیشتر و زرد ۱۵ دارای وزن کمتر نسبت به سایر کلون‌ها بودند. با توجه به نتایج تفکیک خوبی بین دو رقم زرد و روغنی انجام شد، ولی در بعضی موارد کلون‌های مختلف با نام مشابه سطح پایینی از تشابه ژنتیکی را نشان دادند و در گروه‌های متفاوت و دور از هم قرار گرفتند که تفاوت در مکان‌های ریزماهواره دلیل جداسازی این کلون‌ها است. برای مثال دو کلون زرد ۱۰ و زرد ۲ با وجود نام مشابه کمترین حد تشابه را نشان دادند (۰/۲۰۵). بعضی از کلون‌های با نام متفاوت نیز بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند و در خوشه‌های یکسان قرار گرفتند مثلاً کلون روغنی ۱۴ بیشترین تشابه را با کلون زرد ۱۴ (۰/۶۶۷) و کلون روغنی ۱۲ نیز بیشترین تشابه را با کلون‌های زرد ۱۲ و ۱۳ (۰/۸۴۶) و (۰/۸۱۵) نشان دادند (نتایج نشان داده نشده است). با توجه به این که انتخاب کلون‌ها بر

خشک متوسطی (۴۸ درصد) بود. اولین گروه به دو زیر گروه اصلی تقسیم شد که شامل کلون‌های زرد ۴، ۱۴، ۵، ۹، ۸، ۷، ۶، ۱ و ۲ بود. کلون‌های زرد ۱، ۶، ۷، ۸ و ۹ با استفاده از همه نشانگرهای مورد استفاده پروفایل آللی یکسانی نشان دادند. از نظر صفات مورفولوژیکی اکثر این کلون‌ها دارای میوه‌های درشت به جز زرد ۴ و ۱۴، بیضوی شکل (به جز زرد ۴ که دارای میوه کشیده بود) و هسته تخم مرغی شکل بودند. از نظر درصد روغن در ماده خشک گوشت اکثر کلون‌های قرار گرفته در این گروه دارای درصد روغن متوسطی بودند (بین ۴۵-۵۵ درصد) به جز کلون‌های زرد ۸ و ۴ که نسبت به سایر کلون‌ها درصد روغن خیلی زیادی داشتند (بالای ۶۰ درصد) و زرد ۵ که دارای درصد روغن زیادی بود (۵۷ درصد). همچنین کلون‌های زرد ۴ و ۱۴ دیررس‌تر و زرد ۳ و ۵ زودرس‌تر از دیگر کلون‌های قرار گرفته در این گروه بودند. گروه دوم نیز شامل دو زیر گروه بود که در زیر گروه اول کلون‌های زرد ۳ و روغنی ۱۴ و در زیر گروه دوم کلون‌های زرد ۱۳، ۱۲، ۱۱ و روغنی ۱۲ قرار گرفتند. در این گروه کلون زرد ۳ (زرد گلوله) دارای میوه‌های گرد و بقیه دارای میوه‌های بیضوی بودند و کلون زرد ۱۲ دارای کمترین درصد روغن در ماده خشک و وزن تر میوه در بین کلون‌های مورد بررسی بود. در این گروه کلون‌های زرد ۱۲ و روغنی ۱۲ دارای پستانک جزیی بودند. گروه سوم هم شامل دو زیر گروه

مبنای مشخصات ظاهری درخت و بنا بر گفته باغداران (نهال‌ها به نام زرد و روغنی خریداری شده‌اند) انجام شد، می‌توان نتیجه گرفت که علت این اختلافات به دلیل برچسب گذاری اشتباه این کلون‌ها به نام زرد و روغنی بوده است.

به طور کلی می‌توان گفت سه دلیل احتمالی برای تفاوت‌های مشاهده شده وجود دارد:

۱- اشتباه در نامگذاری کلون‌هایی که به نام زرد و روغنی شناخته شده‌اند که این نامگذاری بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی انجام می‌شود، ۲- به دلیل وجود مشکلات ناشی از موارد هم نامی و مترادف بودن ارقام باشد. موارد هم نامی، مترادف بودن و نامگذاری اشتباه توسط محققان دیگر در ایران و سایر کشورها نیز گزارش شده است (Ataei *et al.*, 2004؛ Martin-Lopes *et al.*, 2009؛ Samaee *et al.*, 2003؛ Hannachi *et al.*, 2008) و ۳- می‌تواند ناشی از تفاوت واقعی موجود بین کلون‌های یک رقم باشد که ممکن است در نتیجه جهش‌های سوماتیکی (Belaj *et al.*, 2004b) به وجود آمده باشد ولی نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه دارد.

نتایج این بررسی نشان داد که کلون‌های روغنی ۱۳ و زرد ۱۰ نیز با وجود این که به عنوان رقم زرد و روغنی شناخته شده‌اند، تفاوت بارزی در اکثر جایگاه‌های ریزماهواره با کلون‌های دیگر زرد و روغنی داشتند، که این فاصله ژنتیکی از کلون‌های دیگر، احتمال تکثیر

رویشی این درختان و هم‌گروه بودن آن‌ها را با ارقام زرد و روغنی رد می‌کند. از نظر صفات مورفولوژیکی نیز کلون روغنی ۱۳ در میان کلون‌های زرد و زرد ۱۰ در بین کلون‌های روغنی گروه‌بندی شدند ولی در گروه‌های جداگانه قرار نگرفتند (نتایج نشان داده نشده است)، بنابراین احتمال می‌رود این درختان اشتباهاً به عنوان ارقام زرد و روغنی نام‌گذاری شده باشند. همچنین بعضی از کلون‌های زرد و روغنی نیز در خوشه‌های متفاوت توزیع شدند که این سطح از تفاوت در میان کلون‌ها انتظار نمی‌رفت، برای مثال کلون‌های روغنی ۱۲ و ۱۴ نیز که در بین کلون‌های زرد قرار گرفتند، می‌توانند نمونه‌ای از موارد هم‌نامی یا نامگذاری اشتباه باشند. تفاوت‌های جزئی‌تر که در بین کلون‌های زرد و روغنی دیده شد و باعث قرار گرفتن این کلون‌ها در خوشه‌های نزدیک به هم شد، متأثر از تفاوت واقعی موجود بین کلون‌های این ارقام است. تنوع بالایی در کلون‌های ارقام یکسان توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Gomes *et al.*, 2008؛ Sensi *et al.*, 2003؛ Sanz-Cortez *et al.*, 2003).

نامگذاری ارقام به روش سنتی بر اساس صفات مورفولوژیکی و پومولوژیکی انجام می‌شود که تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. همچنین دقت و تسلط فرد در شناسایی صحیح صفات نیز از عوامل مؤثر در تشخیص صحیح ارقام است، که این موارد لزوم استفاده از نشانگرهای مولکولی را برای ارزیابی

در کشور هستند، تفاوت‌های ژنتیکی موجود در ۱۸ جایگاه مورد بررسی می‌تواند در تشخیص این دو رقم و کلون‌های آن‌ها در مراحل اولیه رشد نهال‌ها، جهت احداث و توسعه باغ‌های یکنواخت مفید واقع شود. از آنجایی که وجود تنوع ژنتیکی یکی از شرایط ضروری برای برنامه‌های به نژادی است، این نوع پژوهش‌ها به انتخاب صحیح والدین (استفاده از ژنوتیپ‌ها با فاصله ژنتیکی زیاد) و ارزیابی سریع تر نتایج در برنامه‌های به نژادی کمک فراوانی خواهد کرد. البته به منظور اهداف به نژادی و خصوصاً به گزینی کلونی بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی (مانند وزن میوه، درصد روغن، میزان عملکرد، مقاومت به آفات، بیماری‌ها و تنش‌های محیطی و غیره) به مدت چند سال و در شرایط آب و هوایی مختلف بایستی انجام شود.

سطوح چندشکلی میان ارقام زیتون ایرانی و کلون‌های آن‌ها، همچنین حل مشکلات ناشی از موارد هم‌نامی، مترادفی و نامگذاری اشتباه در ژرم‌پلاسم زیتون ایران آشکار می‌کند. با وجود این‌که طبقه‌بندی مورفولوژیک دارای ضعف‌هایی است اما استفاده از نشانگرهای مولکولی بدون داشتن پیش زمینه از طبقه‌بندی مورفولوژیک قدرت تصمیم‌گیری را کاهش می‌دهد، زیرا برخی از جهش‌ها و یا تغییرات اپی ژنتیکی در برخی خصوصیات مورفولوژیکی رخ می‌دهند که به راحتی از نظر فنوتیپی قابل شناسایی هستند، اما با برخی از نشانگرهای مولکولی قابل تشخیص نیستند. بنابراین به کارگیری همزمان شاخص‌های مورفولوژیک و مولکولی امکان تعیین هویت دقیق ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون کشور را میسر می‌سازد. با توجه به این‌که این دو رقم از ارقام مهم موجود

References

- Anonymous, 2007.** National Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability in Olive. Olive Specialized Committee, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran. 25pp. (in Persian).
- Ataei, S., Hosseini-Mazinani, S. M., Sadeghi, H., Hosseini, M., and Ferdowsipur, M. 2004.** Reclassification on traditional Iranian olive (*Olea europaea* L.) cultivars according to the IOOC Methodology. Proceedings of the 5th International Symposium on Olive Growing. Izmir/ Turkey.
- Bandelj, D., Jakse, J., and Javornik, B. 2004.** Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. Euphytica 136: 93-102.
- Barranco Navero, D., Cimato, A., Fiorion, P., Rallo Romero, L., Touzani, A.,**

- Castaneda, C., Serafini, F., and Trujillo Navas, I. 2000.** World Catalogue Of Olive Varieties. International Olive Oil Council. 360 pp.
- Belaj, A., Cipriani, G., Testoline, R., Rallo, L., and Trujillo, I. 2004a.** Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple sequence repeat markers. Horticultural Science 39: 1557-1561.
- Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., and Baldoni, L. 2004b.** Using RAPD and AFLP markers to distinguish individuals obtained by clonal selection of Arbequina and Manzanilla de Sevilla olive. Horticultural Science 39: 1566-1570.
- Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., and Trujillo, I. 2003.** Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theoretical and Applied Genetics 107: 736-744.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980.** Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-331.
- Barranco Navero, D., Cimato, A., Fiorion, P., Rallo Romero, L., Touzani, A., Castaneda, C., Serafini, F., and Trujillo Navas, I. 2000.** World Catalogue of Olive Varieties. International Olive Oil Council 360pp.
- Cantini, C., Cimato, A., and Sani, G. 1999.** Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica 109(3): 173-181.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., and Giorio, G. 2002.** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). Theoretical and Applied Genetics 104: 301-307.
- Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A., and Testolina, R. 2002.** Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. Theoretical and Applied Genetics 104: 223-228.
- De la Roza, R., James, C., and Tobutt, K. R. 2002.** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. Primer note. Molecular Ecology 2: 265-267.
- Devos, K. M., Dubcovsky, J., Dvorak, J., Chinoy, C. N., and Gale, M. D. 1995.** Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on

- recombination. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 282-288.
- Diaz, A., De la Rosa, R., Martin, A., and Rallo, P. 2006.** Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genetics & Genomes* 2: 165-175.
- Doulati Bane, H., Mohammadi, S. A., and Labera, M. 2010.** Genetic relationship, synonyms and homonyms within grapevine cultivars of West Azarbaijan province. *Seed and Plant Improvement Journal* 26-1(4): 517-529 (in Persian).
- Gomes, S., Martin-Lopes, P., Lima-Brito, J., Meirinhos, J., Lopes, J., Martins, A., and Guedes-Pinto, H. 2008.** Evidence for clonal variation in 'Verdeal-Transmontana' olive using RAPD, ISSR and SSR markers. *Horticultural Science and Biotechnology* 83: 395-400.
- Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, Salem., El Gazzah, M., and Berville, A. (2008).** Difference between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drups, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae* 116: 280-290.
- Hosseini-Mazinani, S. M., and Samaee, M. 2004.** Evaluation of olive germplasm in Iran on the basis of morphological traits: Assessment of Zard and Rowghani cultivars. *Acta Horticulturae* 634: 145-151.
- Ipek, A., Barut, E., Gulen, H., and Ipek, M. 2012.** Assessment of inter- and intra-cultivar variation in olive using SSR markers. *Scientia Agricola* 69(5): 327-335.
- Jones, A. G., and Arden, W. R.. 2003.** Methods of parentage analysis in natural population. *Molecular Ecology* 12: 2511-2523.
- Khadari, B., Breton, C., Moutier, N., Roger, P. J., Besnard, G., Berville, A., and Dosba, F. 2003.** The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 521-529.
- Khadari, B., Charafi, J., Moukhli, A., and Ater, M. 2007.** Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree Genetics & Genomes* 4(2): 213-221.
- Lopes, M. S., Mendonca, D., Sefc, K. M., Gil, F. S., and Machado, A. C. 2004.** Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *Horticultural Science* 39(7): 1562-1565.

- Martin-Lopes, P., Gomes, S., Lima-Brito, J., Lopes, J., and Guedes-Pinto, H. 2009.** Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrancosa' by molecular markers. *Scientia Horticulturae* 123: 82-89.
- Mohammadi, H., and Vakili, D. 2007.** Olive (Cultivation, Protection, Harvest and Processing). Nedaye Sabze Shomal, Rasht, Iran. 214pp. (in Persian).
- Muzzalupo, I., Chiappetta, A., Benincasa, C., and Perri, E. 2010.** Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae* 126(3): 324-329.
- Noormohammadi, Z., Hosseini-Mazinani, S. M., Trujillo, I., and Belaj, A. 2009.** Study of intracultivar variation among main Iranian olive cultivars using SSR markers. *Acta Biologica Szegediensis* 53(1): 27-32.
- Noormohammadi, Z., Hosseini-Mazizani, S. M., Trujillo, I., Rallo, L., Belaj, A., and Sadeghzadeh, M. 2007.** Identification and classification of main Iranian olive cultivars using microsatellite markers. *Horticultural Science* 42: 1545-1550.
- Omran-Sabbaghi, A., Shahriari, M., Falahati-Anbaran, M., Mohammadi, S. A., Nankali, A., Mardi, M., and Ghareyazie, B. 2007.** Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collection. *Scientia Horticulturae* 112: 439-447.
- Peakall, R., and Smouse, P. E. 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6: 288-295.
- Rallo, P., Dorado, G., and Martin, A. 2000.** Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 984-989.
- Rohlf, F. J. 1998.** NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.00. Exeter Software, Setauket, NY, USA.
- Samaee, S. M., Shobbar, Z. S., Ashrafi, H., Hosseini-Mazinani, M., and Sheidai, M. 2003.** Molecular characterization of olive germplasm in Iran by use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): Correlation with phenotypic studies. *Acta Horticulturae* 623: 169-175.
- Sanz-Cortes, F., Parfitt, D. E., Romero, C., Struss, D., Lacer, G., and Badenes, M.**

- L. 2003.** Intraspecific olive diversity assessed with AFLP markers. *Plant Breeding* 122: 173-177.
- Sensi, E., Vignani, R., Scali, M., Masi, E., and Cresti, M. 2003.** DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea* L. estimated by AFLP analysis. *Scientia Horticulturae* 97: 379-388.
- Sheidai, M., Noormohammadi, Z., Dehghani, A., Parvini, F., Hoshiar-Pasian, H., and Hosseini-Mazinani, M. 2010.** Intra-specific morphological and molecular diversity in brown olive (*Olea cuspidate*) of Iran. *Science Asia* 36: 187-193.
- Sneath, P. H. A., and Sokal, R. R. 1973.** Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA.
- Taamalli, W., Banfi, R., Bassi, D., Daoud, D., and Zarrouk, M. 2006.** Agronomic and molecular analyses for the characterisation of accessions in Tunisian olive germplasm collections [online]. Available at www.ejbiotechnology.info. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(5): 467-481.
- Torkzaban, B., Ataei, S., Saboora, A., Azimi, M., and Hosseini-Mazinani, M. 2010.** Study of variation of some unknown olive genotypes in collection of Tarom research station in Iran, applying morphological markers. *Biology Journal* 4(23): 520-531 (in Persian)
- Vrohbi, I., Hraventg, L., Chandelier, A., Mergiai, G., and DuJardin, P. 1996.** Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 115: 205-206.
- Zaher, H., Boulouha, B., Baaziz, M., Sikaoui, L., Gaboun, F., and Udupa, S. M. 2011.** Morphological and genetic diversity in olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) clones and varieties. *Plant Omics Journal* 4: 370-376.