

## بررسی تنوع برخی ژنوتیپهای ناشناخته زیتون در کلکسیون ایستگاه تحقیقات طارم با استفاده از مارکرهای مورفولوژیک

بهاره ترک زبان<sup>۱</sup>، سعیده عطایی<sup>۱</sup>، عدرا صبورا<sup>۲</sup>، محمود عظیمی<sup>۳</sup> و سید مهدی حسینی مزینانی<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup>تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

<sup>۲</sup>تهران دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

<sup>۳</sup>زنجان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان

تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۳۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۶

### چکیده

شناسایی ژنوتیپها و ایجاد بانکهای ژن در حفظ و حراست از ذخائر ژنتیکی یک کشور اهمیت بسیاری دارد. بانکهای ژرم پلاسما حاوی گنجینه های ژنتیکی بسیار ارزشمند و مهم برای تحقق اهداف انتخاب و اصلاح نژاد در بین گونه ها یا ارقام می باشند. با توجه به اینکه ایران به عنوان یکی از خاستگاههای زیتون در جهان مطرح می باشد، شناسایی و حفاظت از ذخائر ژنتیکی زیتون کشور، شناسایی باغهای قدیمی و ساماندهی ژنوتیپهای موجود در آن نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است. حدود ۳۵ سال قبل، تعداد ۲۵ رقم زیتون از مناطق مختلف جهان در باغ هاشم آباد در اطراف شهرستان گرگان کاشته شدند. به منظور حفاظت هر چه بیشتر از این ارقام ارزشمند، در سال ۱۳۷۷ قلمه های ریشه دار شده این درختان به ایستگاه تحقیقات زیتون طارم واقع در شهرستان طارم منتقل و کشت گردیدند. در این ایستگاه تعداد ۹ تکرار از هر رقم کاشته شد و نام اختصاری  $T_n$  برای این ژنوتیپها در نظر گرفته شد. به منظور بررسی میزان قرابت این ژنوتیپهای ناشناخته با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، نمونه گیری از برگ و میوه ۱۵ ژنوتیپ منتخب با سه تکرار (در مجموع ۴۵ درخت)، مطابق با روشهای استاندارد انجام گردید. کلاستر اولیه برای تعیین دوری و نزدیکی این ژنوتیپها و تشخیص تکرار پایه ها رسم شد. سپس با استفاده از آنالیز واریانس، صفات کمی تعیین شده ای را که در تشخیص ژنوتیپها مؤثر بودند، معرفی گردید. همچنین اطلاعات به دست آمده برای رسم کلاستر این ارقام در مقایسه با ارقام شناخته شده ایرانی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به دست آمده بیانگر آن است که ارقام مورد بررسی از تنوع بسیار بالایی برخوردارند و دارای فاصله ژنتیکی معنی داری نسبت به ارقام ایرانی می باشند و میتوان از این ارقام در برنامه های اصلاح نژاد استفاده نمود.

واژه های کلیدی: زیتون، کلکسیون زیتون طارم، تجزیه کلاستر، ذخائر ژنتیکی

\* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۴۴۵۸۰۳۴۵، پست الکترونیکی: hosseini@nigeb.ac.ir

### مقدمه

علت نبودن سرمای کافی زمستانه و عدم استراحت درخت، به بار نمی نشیند (۱).

ایران به عنوان کشوری که در ناحیه شرق مدیترانه واقع شده و با توجه به برخی اطلاعات در رابطه با ارقام موجود در نواحی غرب کشور، خاستگاه مناسبی برای زیتون

گونه زیتون با نام علمی *Olea europea L.* از خانواده Oleaceae گیاهی سازگار با اقلیمهای مدیترانه ای و شبه مدیترانه ای است و پراکنش آن بیشتر در بین عرضهای ۲۵ تا ۴۵ درجه شمالی گزارش گردیده است. این گیاه در مناطق حاره و نیمه حاره نیز به خوبی رشد می کند اما به

رقم در این مجموعه جمع آوری و نگهداری شده است و هم اکنون تأمین کننده رقمهای مورد نیاز مؤسسات تحقیقاتی زیتون در تمامی دنیا می باشد (۶).

با توجه به تنوع اقلیمی و وجود انواع میکروکلیمها در ایران، به عنوان کشوری که افزایش سطح زیر کشت زیتون را در اولویت برنامه های کشاورزی-صنعتی خود قرار داده است، معرفی و شناسایی صحیح ارقام سازگار با هر اقلیم و تعیین نوع کاربرد آن از نظر روغنی یا کنسروی به منظور جلوگیری از اتلاف هزینه و زمان امری اجتناب ناپذیر است. این امر علاوه بر ثبت ذخیره ژنتیکی، به حفظ و حراست این مخزن ژنی و تصمیم گیریهای کلان جهت تکثیر ارقام با کیفیت بالا کمک خواهد کرد.

به نظرمی رسد که بهترین راه تشخیص تنوع ژنتیکی بین ارقام زیتون استفاده از شاخصهای مورفولوژیکی، شیمیایی و مولکولی است. بر همین اساس دانشگاه کوردوبا در اسپانیا صفات مورفولوژیک استاندارد برای شناسایی ارقام زیتون تعریف کرده است (۴). *Tous* و همکاران (۱۹۹۰) با استفاده از صفات مورفولوژیکی و زراعی، ۴۰ کولتیوار را شناسایی و نامگذاریهای غلط و مترادفها را نیز مشخص نمودند (۱۳). حسینی مزینانی و همکاران (۲۰۰۳) با بررسیهای ریخت شناسی ۲۸۱ درخت از دو رقم مهم زیتون ایران بنامهای "زرد" و "روغنی" که از ۸ منطقه با شرایط اکولوژیکی مختلف در شمال ایران انتخاب شده بود، نشان دادند که در داخل این ارقام تنوع چشمگیری دیده می شود (۹). همچنین نتایج بررسیهای عطائی و همکاران (۲۰۰۴) بر روی ۶۰۰ درخت از ۱۰ رقم نام گذاری شده به روش سنتی در منطقه شمال ایران منجر به شناسایی ۳۰ رقم جدید و مشخص شدن مترادفها و هم نامها شد (۳).

با توجه به شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشک ایران، کمبود آب و نیز عدم کفایت سطح زیر کشت دانه های روغنی، لازم است نیاز روغن مصرفی کشور (که بیش از

محسوب می شود) (۱). با در نظر گرفتن درجه بالای تنوع و پراکنش وسیع زیتون در ایران، ذخیره ژنتیکی آن یکی از غنی ترین و مهم ترین ذخائر ژنی در میان کشورهای زیتون خیز جهان می باشد که جمع آوری این تنوع در یک بانک ژرم پلاسما ملی ضروری می نماید. امروزه بانکهای ژرم پلاسما گیاهی به عنوان منابع غنی ذخائر ژنتیکی، ابزارهایی مهم برای انتخاب و اصلاح نژاد در بین گونه ها یا ارقام محسوب می شوند. هدف از تأسیس و گسترش این بانکها حفظ منابع ژنتیکی است که در طی قرنهای شناسایی، جمع آوری، کشت، اصلاح و گسترش یافته اند (۶).

تعیین هویت دقیق کلونها، وارته ها یا گونه های 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 کولتیوارهای مختلف داده شده باشد (هم نام *homonym*) و یا ممکن است یک کولتیوار در مناطق یا کشورهای مختلف با نامهای متفاوت خوانده شده باشد (مترادف *synonym*). از آنجایی که اطلاعات ثبت شده در باغهای قدیمی اغلب فراموش یا گم شده اند، و یا ممکن است ارقام وارداتی مجدداً نامگذاری و به مرور زمان نام اصلی آنها فراموش شده باشد (۵)، یا حتی گاهی ارقام با بی دقتی نامگذاری شده و یا اشتباهی در تکثیرشان رخ داده باشد (۷) شناسایی و نامگذاری صحیح ارقام موجود در یک کلکسیون ضروری است.

در مورد شناخت ژنوتیپها و اکوتیپهای زیتون در دنیا مطالعات متعددی صورت گرفته است و ارقام برتر موجود در هر کشور از جهات مختلف شناسایی و تعداد زیادی از آنها جمع آوری و در بانکهای ژن نگهداری شده اند. امروزه یکی از معروف ترین مجموعه کلکسیونهای ارقام زیتون دنیا در کوردوبای اسپانیا وجود دارد (*Olive world germplasm bank*) OWGB که تا سال ۲۰۰۵ بیش از ۴۰۰

## مواد و روشها

**مواد گیاهی:** نمونه های گیاهی از ایستگاه تحقیقات زیتون طارم (شمال شرقی شهرستان طارم با طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۳۰ دقیقه و عرض ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه شمالی و ارتفاع ۳۰۰ متر از سطح دریا در استان زنجان) تهیه شد. حدود ۳۵ سال قبل، تعداد ۲۵ رقم زیتون از مناطق مختلف جهان در باغ هاشم آباد در اطراف شهرستان گرگان کاشته شدند. در سال ۱۳۷۷ قلمه های ریشه دار شده این درختان به ایستگاه تحقیقات زیتون واقع در شهرستان طارم منتقل و کشت گردیدند. از بین ۲۵ ژنوتیپ، ۱۵ ژنوتیپ جهت بررسی انتخاب شدند. ژنوتیپهای ذکر شده با کدهای T20, T19, T18, T17, T16, T15, T10, T7, T6, T3, T2, T21, T22, T23 و T24 مشخص گردیده اند که از هر ژنوتیپ، سه فرد به طور تصادفی انتخاب و نمونه گیری شدند. در مجموع تعداد ۴۵ درخت مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری از درختان مقارن با زمان رسیدگی میوه ها طی ماههای مهر تا آذر ۱۳۸۶ صورت گرفت.

**بررسی صفات مورفولوژیک:** برگ و میوه ها پس از انتقال به آزمایشگاه در سردخانه نگهداری شدند و مراحل بررسی مورفولوژیکی طبق دستورالعمل IOC (International Olive Council) و دستورالعمل ارائه شده توسط مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال (۱۳۸۶) صورت گرفت (۸،۲). این دستورالعمل شامل بررسی ۳۳ صفت مورفولوژیک می شود که برخی از آنها متعلق به برگ و برخی دیگر متعلق به میوه و هسته هستند، در این میان ۱۱ صفت کمی (جدول ۱) و ۲۲ صفت کیفی (جدول ۲) می باشند. برآورد میانگین کلیه صفات کمی با اندازه گیری شاخص مورد نظر در ۴۰ میوه یا برگ تعیین شد. سپس داده های حاصل همراه با نتایج حاصل از بررسی سه رقم ایرانی به نامهای شنگه، گلوله زیتون و روغنی (۳) از نظر آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۹۰ درصد آن از طریق واردات صورت می گیرد) به روشی غیر از کشت دانه های روغنی تأمین گردد. تحقیقات وسیع در مورد شرایط مناسب و لازم برای رشد زیتون و نیز ویژگیهای منحصر بفرد این درخت گواه بر آن است که بسیاری از نقاط کشور استعداد کشت و توسعه زیتون را دارند (۱۴). در سال ۲۰۰۵، توسعه و گسترش باغهای زیتون ایران حدود صد هزار هکتار در ۲۴ استان گزارش شده است (۱۴). میزان تولید محصولات این باغها بالغ بر ۶۱ هزار تن بوده است که ۸۵ درصد تولید آن متعلق به دره سفید رود در شمال ایران با ۲۱ هزار هکتار (۲۰ درصد) سطح زیر کشت می باشد (۱۴).

پژوهش حاضر بخشی از یک پروژه تحقیقاتی است که در آن سعی شده است با استفاده از نشانگرهای مختلف مورفولوژیک، ژنوتیپهای ناشناخته یکی از کلکسیونهای زیتون واقع در گرگان شناسایی گردد. اکثر ارقام موجود در این کلکسیون مربوط به کشورهای حوزه مدیترانه هستند و بیش از ۳۰ سال پیش وارد ایران شده اند. از آنجایی که کلیه اطلاعات مربوط به کشت این ژنوتیپها و نقشه باغ مفقود شده است، حدود ۸ سال پیش تعدادی نهال متعلق به هر یک از این درختها به کلکسیون واقع در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم در استان زنجان انتقال داده شد. بر اساس نقشه جدید هر ژنوتیپ با یک عدد مشخص گردیده است اما نام گذاری دقیق و صحیح هر پایه مستلزم معرفی و شناخت صفات تعیین کننده هر رقم می باشد. بنابراین شناسایی علمی این ارقام با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی زمینه را برای استفاده آگاهانه از آنها برای انجام آزمایشات اصلاح نژاد و سایر مطالعات باغبانی فراهم خواهد نمود. در مقاله حاضر تلاش گردیده است تا قبل از شروع مطالعات مولکولی و آزمایشات اصلاح نژاد، از طریق روشهای مورفولوژیکی استاندارد اطلاعات مفیدی در مورد تنوع مورفولوژیکی این ژنوتیپها جمع آوری شود.

## نتایج و بحث

بر طبق استاندارد تعریف شده توسط IOC، میوه ها از ناحیه جنوب درخت و از ارتفاع بین ۱۵۰ تا ۱۷۰ سانتیمتری سطح زمین چیده شدند (۸). شاخص رسیدگی میوه ها نیز با توجه به مرحله نهایی رشد میوه یعنی زمانی که حداکثر ۷۰ درصد میوه های درخت شروع به تغییر رنگ کرده باشند در نظر گرفته شد.

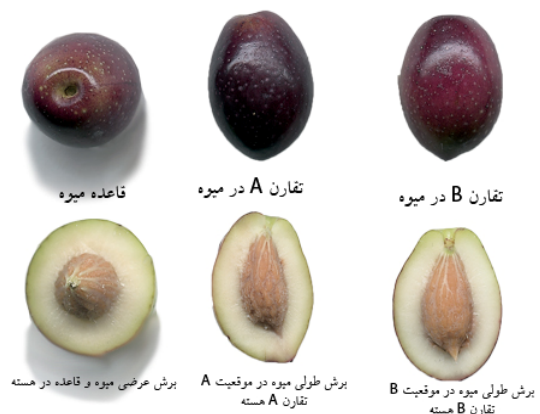
نتایج حاصل از مقایسه ژنوتیپهای مورد بررسی با توجه به تجزیه خوشه ای صفات کمی و کیفی میوه، برگ و هسته طبق روشهای UPGMA, WARD مشابه بود (در شکل ۲ یکی از دندروگرامها نشان داده شده است). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای صفات مورفولوژیک ژنوتیپهای مختلف وجود دو خوشه اصلی را نشان می دهد، صفات جدا کننده شامل چگونگی شکل و نوع تقارن در میوه و هسته می باشد. ژنوتیپهای واقع در اولین خوشه اصلی دارای میوه های تخم مرغی یا گرد نسبتاً متقارن و هسته بیضوی یا تخم مرغی شکل هستند که تقارن هسته آن در موقعیت A (شکل ۱) به صورت "نسبتاً نامتقارن" است. این خوشه شامل دو زیر خوشه است که تفکیک آنها بر اساس موقعیت بیشترین قطر میوه، شکل قاعده میوه (شکل ۱) و بیشترین قطر هسته صورت گرفته است (شکل ۲). در زیرخوشه اول (IA) موقعیت بیشترین قطر میوه و هسته به سمت مرکز و یا به طرف رأس است و در زیرخوشه دوم موقعیت بیشترین قطر میوه و هسته به طرف قاعده (به طرف دم) است. زیر خوشه اول شامل هر سه فرد ژنوتیپهای T2, T6, T7, T10 و T18 و همچنین دو فرد از ژنوتیپ T15 و یکی از افراد هر یک از ژنوتیپهای T3 و T16 می شود. زیر خوشه دوم شامل هر سه فرد ژنوتیپ T23 و دو فرد از ژنوتیپ T3 است. در دومین خوشه اصلی ژنوتیپهایی قرار می گیرند که دارای میوه های کشیده و اغلب نامتقارن می باشند. همچنین هسته آنها کشیده و تقارن آنها در موقعیت A (شکل ۱) به دو حالت "نسبتاً

جدول ۱ - صفات کمی مورد مطالعه در پایه های زیتون مطابق با

استانداردهای IOC	
اندام	صفات
برگ	شاخص شکل*، طول، عرض
میوه	شاخص شکل*، طول، عرض، وزن
هسته	شاخص شکل*، طول، عرض، تعداد شیار

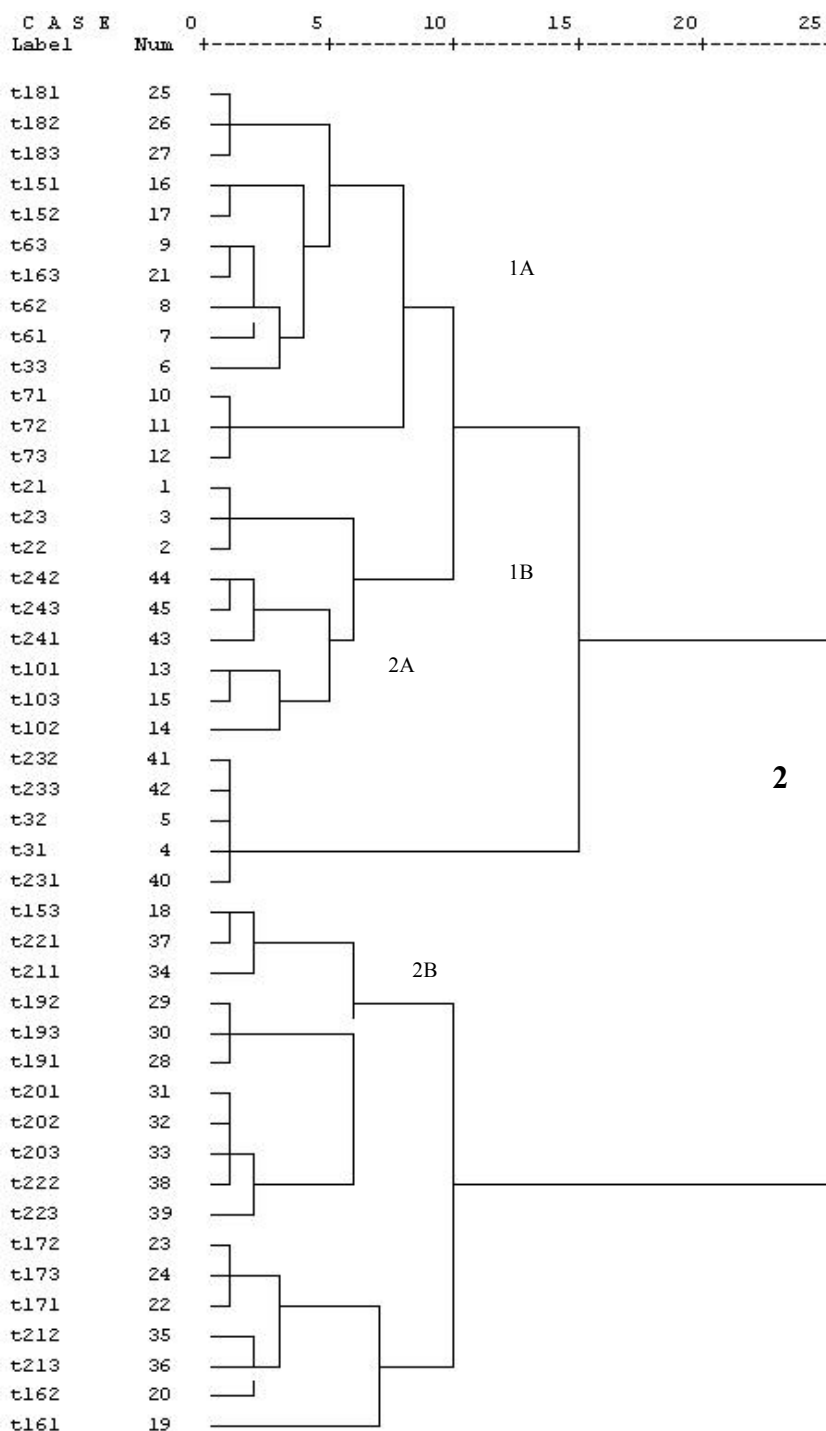
\*نسبت طول به عرض

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور انجام آنالیزهای آماری چند متغیره، هر یک از صفات کیفی در دو یا چند سطح به صورت ۰ و ۱ کدگذاری شدند و برای تعیین میانگین صفات کمی و تجزیه واریانس آنها از داده های استاندارد شده استفاده شد. درجه خویشاوندی و قرابت ژنوتیپهای مطالعه شده به کمک روشهای مختلف تجزیه خوشه ای و رسته بندی با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) با نرم افزار SPSS version 11.5 تعیین شد. با مشاهده اختلاف معنی دار بین میانگینهای صفات مورد مطالعه در ژنوتیپهای مختلف در آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه ای دانکن (Duncan test) در سطح احتمال (p<0.05) صورت گرفت.



شکل ۱ - برخی از صفات کیفی میوه و هسته که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است.

نامتقارن" و "نامتقارن" مشاهده شد. این خوشه شامل هر سه فرد ژنوتیپهای T19، T17، T20، T21، T22 و دو فرد از ژنوتیپ T16 و یکی از افراد ژنوتیپ T15 می باشد.



شکل ۲ - دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای صفات کمی و کیفی ژنوتیپهای مورد مطالعه زیتون به روش WARD \*آخرین رقم سمت راست بیانگر تکرار است.

جدول ۲ - صفات کیفی مورد مطالعه در پایه های زیتون مطابق با استانداردهای IOC

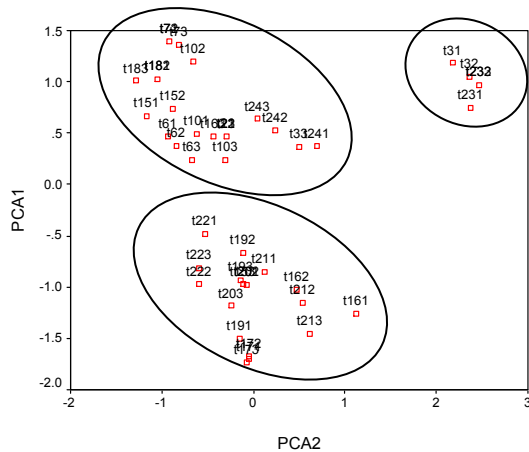
اندام	صفات
برگ	شکل (۱-بیضوی، ۲-بیضوی-دوکی ۳-نیزه ای)
	خمش (۱-به طرف زیر، ۲-مسطح، ۳-به طرف رویی، ۴-ملخی)
میوه	شکل (۱-کروی، ۲-تخم مرغی، ۳-کشیده)
	تقارن A (۱-متقارن، ۲-نسبتاً نامتقارن، ۳-نامتقارن)
	موقعیت بزرگترین قطر میوه (۱-به طرف دم میوه، ۲-به طرف مرکز، ۳-به طرف نوک)،
	نوک میوه (۱-نوک دار، ۲-گرد)
	قاعده میوه (۱-تخت، ۲-گرد)
	پستانک (۱-بدون نوک، ۲-دارای نوک جزئی ۳-نوک آشکار)،
	تعداد عدسک (۱-کم، ۲-زیاد)،
	اندازه عدسکها (۱-کوچک، ۲-بزرگ، ۳-متوسط)،
	مکان ظهور تغییر رنگ (۱-از قاعده، ۲-به طور یکنواخت در کل اپیدرم، ۳-از نوک)
	شکل (۱-کروی، ۲-تخم مرغی، ۳-بیضوی ۴-کشیده)،
هسته	تقارن A (۱-متقارن، ۲-نسبتاً نامتقارن، ۳-نامتقارن)،
	تقارن B (۱-متقارن، ۲-نسبتاً نامتقارن)
	موقعیت بزرگترین قطر هسته (۱-به طرف قاعده، ۲-به طرف مرکز، ۳-به طرف نوک)،
	نوک (۱-برجسته، ۲-گرد)،
	قاعده (۱-تخت، ۲-برجسته، ۳-گرد)،
	سطح هسته (۱-صاف، ۲-ناهموار، ۳-زبر)،
	تعداد شیارها (۱-کم، ۲-متوسط، ۳-زیاد)،
	پراکندگی شیارها (۱-منظم ۲-گروهی اطراف درز)،
	انتهای نوک (۱-بدون نوک تیز ۲-دارای نوک تیز)

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات کمی اندامهای مختلف زیتون

F	جمع مربعات	درجه آزادی	صفات
۱/۴۷۴	۳/۱۴۰ NS	۲۶	طول برگ
۶/۴۶۵	۰/۷۱۱ **	۲۶	عرض برگ
۱۲/۴۲۲	۱۷/۷۱۱ **	۲۶	شاخص شکل برگ
۱۹/۸۲۸	۸۴/۴۸۲ **	۲۶	طول میوه
۱۰۸/۶۳۹	۱۳۹/۰۹۳ **	۲۶	عرض میوه
۴۹/۳۵۴	۰/۷۷۲ **	۲۶	شاخص شکل میوه
۵۸/۲۵۰	۲۷/۴۸۸ **	۲۶	وزن میوه
۲۵/۱۲۱	۹۸/۰۳۶ **	۲۶	طول هسته
۳۰/۶۵۲	۱۳/۴۷۴ **	۲۶	عرض هسته
۴۴/۴۳۸	۲/۹۰۹ **	۲۶	شاخص شکل هسته
۲۱/۷۲۲	۱۲/۹۵۸ **	۲۶	تعداد شیارها

\*\* وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپها در سطح  $p < 0.01$  ns : عدم وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپهای مورد بررسی

را در بر می گیرد شامل صفات موقعیت بیشترین قطر میوه ، شکل قاعده میوه و بیشترین قطر هسته می شود، این صفات منجر به تشکیل دو زیرخوشه در خوشه اصلی اول می شوند که در شکل ۲ و ۳ به خوبی قابل مشاهده است.

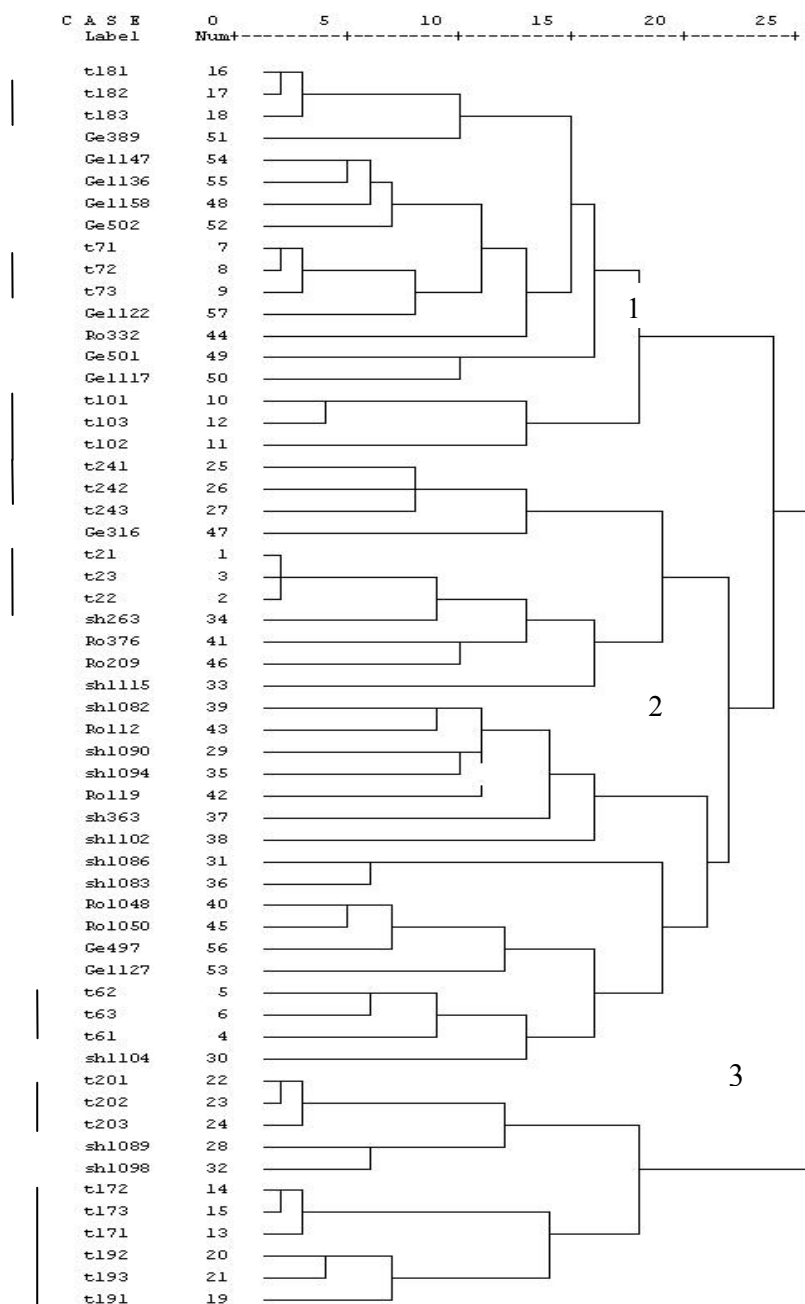


شکل ۳ - رسته بندی حاصل از تجزیه داده های کمی کیفی برگ، میوه و هسته زیتون به مؤلفه های اصلی (PCA)

از آنجایی که هدف از تعیین قرابت و فاصله ژنتیکی این ژنوتیپها، شناسایی و مقایسه آنها با برخی ارقام شناخته شده ایرانی می باشد، داده های مربوط به ژنوتیپهایی که واجد ۳ تکرار واقعی بودند همراه با داده های به دست آمده از بررسی ۳۱ فرد از ۳ رقم ایرانی مجدداً آنالیز شدند. این ارقام، به نامهای سنگه، گلوله زیتون و روغنی، از میان ۱۰ رقم ایرانی که طی مطالعات اخیر در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری شناسایی شده بودند (۳) انتخاب شدند. رقم روغنی در این تحقیق به عنوان یکی از دو رقم اصلی و متنوع ایران و دو رقم سنگه و گلوله زیتون به عنوان ارقام بسیار متنوع ایرانی در کنار این نمونه ها قرار گرفتند (۳، ۱۰ و ۱۲). نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای (شکل ۴) و رسته بندی PCA افراد مختلف ۹ ژنوتیپ باغ طارم و ۳ رقم شناخته شده ایرانی نشان داد که بیشتر ژنوتیپهای این کلکسیون در کنار نمونه های متعلق به دو رقم سنگه و گلوله قرار می گیرند.

با توجه به درجه قرابت ژنتیکی که بر اساس شاخص مربع فاصله اقلیدوسی محاسبه شده بود می توان به این نتیجه رسید که هر سه فرد مورد بررسی در ژنوتیپهای T2، T6، T7، T10، T17، T18، T19، T20، T24 دارای ژنوتیپ مشابه بوده و تکرار محسوب می شوند. اما در مورد سایر ژنوتیپها، برخی از افراد یک ژنوتیپ موقعیتهای جداگانه ای را اشغال می کردند و به صورت پراکنده در میان سایر ژنوتیپها قرار می گرفتند. به طور مثال ژنوتیپ T16-3 در میان تکرارهای ژنوتیپ T6 در خوشه 1A قرار می گیرد و یا ژنوتیپهای T15-3، T22-1 و T21-1 در یکی از زیر خوشه های 2A از دومین خوشه اصلی گرد هم می آیند (N/±). همچنین ژنوتیپهای T3-1 و T3-2 دقیقاً در فراد مربوط به ژنوتیپ T2 در یک زیر خوشه قرار فتند. این مسئله نشانه عدم گذاری صحیح و شناسایی دقیق افراد مختلف مربوط به هر یک از ژنوتیپهای فوق در زمان کشت می باشد. به همین علت برای به دست آوردن نتایج قابل اطمینان در رابطه با تعیین قرابت این ژنوتیپها از محاسبات آماری داده های مربوط به ژنوتیپهایی که افراد آن تکرار محسوب نمی شدند، صرفنظر گردید. از آنجایی که قرار است بر روی ارقام موجود در این کلکسیون برنامه های بلند مدت دورگ گیری صورت گیرد، صحت نام گذاری نمونه های این کلکسیون با روشهای مولکولی و دقیق تر نیز در دستور کار قرار دارد.

نتایج رسته بندی ژنوتیپها بر اساس آنالیز PCA نتایج تجزیه خوشه ای را تأیید کرد، به طوری که می توان ژنوتیپهای مورد بررسی را در سه گروه اصلی طبقه بندی کرد (شکل ۳). شناسایی متغیرترین صفات در میان ژنوتیپهای مورد بررسی نشان داد که در فاکتور اول که حدود ۲۰ درصد از کل تنوع ژنتیکی را در خود جای می دهد صفات شکل میوه و هسته و همچنین نوع تقارن میوه و هسته بالاترین میزان همبستگی را دارا می باشد، این فاکتورها عامل اصلی ایجاد دوخوشه اصلی دندروگرام شکل ۲ هستند. فاکتور دوم که حدود ۱۳/۶ درصد کل تنوع



شکل ۴- کلاستر حاصل از تجزیه خوشه ای روش درون گروهی (within group) بر روی تمامی صفات ریختی در ژنوتیپهای با سه تکرار به همراه سه رقم ایرانی گلوله زیتون (Ge)، شنگه (Sh) و روغنی (Ro). \* در ارقام ایرانی حروف مخفف نام رقم و اعداد نشان دهنده پلاک درخت است و در ژنوتیپها آخرین رقم سمت راست نشانگر تکرار است.

می باشد (شکل ۴). تقریباً تمام ژنوتیپهای مورد بررسی به صورت کاملاً مجزا از نمونه های ایرانی جدا شده بودند. فقط ژنوتیپهای T7، T10، و T18 نزدیکی بیشتری را با پایه های زیتون رقم گلوله ایرانی نشان می دهند.

با توجه به دندروگرام حاصل از آنالیز مجموع ژنوتیپ های تکرار پذیر در این بررسی و ژنوتیپهای سه رقم ایرانی ذکر شده سه خوشه اصلی به دست آمد که اولین خوشه اصلی شامل ژنوتیپهای T7، T10 و T18 به همراه رقم گلوله



تعداد شیرها	شاخص شکل هسته*	عرض هسته (mm)	طول هسته (mm)	شاخص شکل میوه (l/w)*	عرض میوه (mm)	طول میوه (mm)	وزن میوه (g)	شاخص شکل برگ (l/w)*	عرض برگ (mm)	طول برگ (mm)	نمونه
۷/۸۷±/۰۹ dc	۱/۸۸±/۰۲ e	۸/۰±/۲۷ b	۱۰/۳۹±/۳۹ bc	۱/۳۹±/۰۱ cd	۱۷/۰±/۱۲ b	۲۴/۰±/۰۸ b	۳/۶۴±/۰۲ b	۶/۸۷±/۰۸ a	۰/۹۶±/۰۳ d	۸۶/۲۹±/۱۴	T2
۹/۰۰±/۱۹ b	۲/۱۲±/۰۲ c	۶/۸۷±/۰۶ de	۱۴/۷±/۱۶ c	۱/۳۶±/۰۲ cd	۱۰/۹۸±/۱۹ c	۲۱/۸۲±/۳۵ de	۳/۱۴±/۰۶ c	۰/۰۷±/۰۹ cd	۱/۰۶±/۰۹ cd	۰/۸۰±/۲۵ b	T6
۸/۳۴±/۱۸ c	۱/۸۹±/۰۲ c	۸/۴۳±/۰۷ a	۱۰/۷±/۱۸ bc	۱/۲۰±/۰۲ e	۱۹/۲۴±/۲۹ a	۲۴/۰±/۱۲ b	۴/۸۱±/۲۸ a	۰/۷۸±/۰۷ cd	bc/۱/۲±/۰۲	۶/۳۶±/۰۸ b	T7
۸/۳۹±/۰۶ c	۱/۹۲±/۰۱	۸/۶۵±/۱۹ a	۱۶/۷±/۵۸ b	۱/۳۴±/۰۳ d	۱۸/۸۸±/۲۵ a	۲۰/۳۷±/۲۵ a	۴/۷۸±/۱۷ a	۰/۴۰±/۲۴ de	۱/۸۵±/۰۵ bc	۶/۲±/۲۴ ab	T10
۷/۴۸±/۰۶ ef	۲/۸±/۰۲ a	۶/۹۴±/۱ d	۱۸/۰±/۲۲ a	۱/۲۸±/۰۲ ab	۱۲/۴۸±/۳۸ d	۲۲/۷±/۵۲ cd	۲/۳۳±/۲ c	۶/۱۴±/۱ bc	۱±/۰۲ cd	۶/۸۶±/۱۵ ab	T17
۸/۴۶±/۰۳ c	۱/۶۷±/۰۱ f	۷/۳۵±/۱ c	۱۶/۲۹±/۲ d	۱/۲۰±/۰۱ e	۱۶/۰±/۱۲ bc	۲۰/۶۷±/۱۵ ef	۲/۹۷±/۰۷ cd	۰/۷۰±/۱۳ de	۱/۸۲±/۰۲ bc	۰/۹±/۰۶ ab	T18
۸/۰۶±/۱ cd	۲/۶±/۰۷ a	۷/۲۸±/۰۸ cd	۱۹/۰±/۴۶ a	۱/۷±/۰۲ a	۱۳/۷±/۰۷ d	۲۲/۰±/۴۷ bc	۲/۰۷±/۱ de	۴/۸۸±/۰۵ ef	۱/۳±/۰۲ ab	۶/۳۰±/۰۲ ab	T19
۹/۰±/۰۷ a	۲/۴±/۰۶ b	۶/۰±/۰۵ e	۱۰/۷±/۴۷ bc	۱/۶±/۰۱ b	۱۲/۴±/۰۹ c	۱۹/۹۶±/۲۵ f	۱/۷±/۰۳ f	۴/۳۲±/۱۶ f	۱/۳۹±/۰۶ a	۸۰/۹۷±/۰۷	T20
۷/۳۲±/۳۲ f	۲/۱±/۰۲ cd	۷/۰±/۰۵ c	۱۰/۴۶±/۲ bc	۱/۴±/۰۱ c	۱۶/۸۷±/۱۴ b	۲۴/۸۰±/۲۲ b	۳/۷±/۰۷ b	۶/۴۷±/۴۱ ab	۱/۰۷±/۱۱ cd	۶/۴۵±/۳ a	T24

جدول ۴: مقایسه میانگین های صفات کمی مورفولوژیک میوه و برگ در نه ژنوتیپ زیتون (اعداد میانگین ± انحراف معیار است)

حروف مشابه در هر ستون معرف وجود تفاوت معنی دار بین میانگین ها در سطح  $P < 0.05$  می باشد. مقادیر بر حسب میانگین  $\pm SE$  بوده و مقایسه با استفاده از آزمون DMRT انجام شده است.

\* شاخص شکل = طول/عرض

این اختلاف معنی دار تأیید کننده قدرت تشخیص صفات کمی به کار برده شده، جهت شناسایی ارقام مختلف زیتون است به طوری که می توان با اطمینان بالایی از این صفات برای شناسایی و تشخیص ارقام زیتون استفاده کرد. لازم به ذکر است که دقت و تسلط فرد در شناسایی صحیح صفات نیز از عوامل مؤثر در تشخیص صحیح ارقام می باشد. ضمناً مشخص گردید که تکرار درختان در ۳ ژنوتیپ با یکدیگر متفاوتند که به احتمال بسیار زیاد برچسب اشتباه بر روی نهالها و یا جابه جایی برچسبها هنگام انتقال نهالها از گرگان به طارم را می توان از دلایل آن ذکر کرد.

اهم نتایج حاصل از این پژوهش را می توان به صورت زیر خلاصه کرد:

ارقام موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقات طارم که از باغ هاشم آباد گرگان منتقل شده اند از تنوع بسیار بالایی برخوردارند و گنجینه ارزشمندی را تشکیل داده اند. نظر به اینکه تعداد اندکی از این قبیل مجموعه های ژنتیکی در دنیا وجود دارد، حفاظت از این ژنوتیپها در کنار سایر ارقام زیتون ایرانی توصیه می گردد.

صفات مورفولوژیک مورد استفاده در این تحقیق به خوبی قادرند ارقام مختلف زیتون را شناسایی و از یکدیگر تفکیک نمایند.

شناسایی مولکولی و بررسی فیزیولوژیک و صفات زراعی این ارقام مانند کیفیت روغن، میزان تحمل به بیماریها و میزان محصول می تواند پتانسیلهای موجود در این ارقام را مشخص نماید.

فاصله ژنتیکی موجود در بین این ژنوتیپها با ارقام زیتون ایرانی بستر مناسبی را برای استفاده از این ارقام در برنامه های اصلاحی فراهم می نماید.

نورمحمدی و همکاران (2007) طی مطالعه ۱۰ رقم ایرانی با به کار گیری ۱۳ نشانگر SSR نشان دادند که بیشتر نمونه های گلوله در یک زیر خوشه ولی در گروههای مجزا قرار می گیرند که این حالت به خوبی در شکل ۴ نیز دیده می شود (۱۱). در دومین خوشه ژنوتیپهای T2 و T24 نزدیک به ارقام روغنی و ژنوتیپ T6 نزدیک به تعدادی از ژنوتیپهای گلوله قرار می گیرد. در سومین خوشه اصلی، ژنوتیپهای T17, T19 در یک گروه کاملاً مجزا قرار می گیرند و ژنوتیپ T20 در یک زیر خوشه دیگر با نمونه های شنگه ۱۰۹۸ و ۱۰۸۹ جدا می گردد. در بررسیهای قبلی نشان داده شده بود که دو نمونه اخیر در واقع در یک گروه از گروههای متنوع رقم شنگه قرار دارند (۱۱).

وجود زیر خوشه های متعدد و جدایی آنها از یکدیگر حاکی از وجود تنوع قابل ملاحظه در ارقام این کلکسیون است که آن را به مجموعه ای قابل توجه جهت کارهای تحقیقاتی و برنامه های رشد و توسعه زیتون تبدیل نموده است. همچنین با توجه به دوری ژنوتیپهای این کلکسیون از ارقام ایرانی می توان نتیجه گرفت که این کلکسیون مجموعه ای ارزشمند جهت بررسی پتانسیلهای جدید می باشد. هر یک از ارقام این ژرم پلاسمها می تواند از نظر تحمل به بیماری، کیفیت بالای روغن، میزان محصول و غیره مورد بررسی قرار گرفته و همراه با ارقام زیتون ایرانی در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند.

نتایج حاصل از بررسی صفات کمی در میان ژنوتیپهای کلکسیون ایستگاه تحقیقات طارم- که سه تکرار آنها توسط دندروگرام شکل ۲ تأیید شده بود، با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Duncan اختلاف معنی داری ( $p < 0.01$ ) بین ژنوتیپهای مورد بررسی از نظر تمامی صفات کمی به جز طول برگ نشان داد (جدول ۳).

## منابع

۱. صادقی، حسین، ۱۳۸۱. کاشت، داشت و برداشت زیتون. نشرآموزش کشاورزی. صفحات: ۳-۲۵.
۲. مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، ۱۳۸۶. دستورالعملهای ملی آزمونهای تمایز، یکنواختی و پایداری در

گواهی بذر و نهال. ۲۵ صفحه.

3. Ataei, S., Hosseini- Mazinani, M., Sadeghi, H., Hosseini, M. and Ferdowsipur, M. 2004. Reclassification of traditional Iranian Olive (*olea Europaea* L.) Cultivars according to the IOOC Methodology .5<sup>th</sup> International Symposium on olive growing, Izmir / Turkey.
4. Barranco, D. and Rallo, L. 2000. Olive cultivars in Spain. Hortechology, 10(1): 107-110.
5. Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C. and Carignani, G. 1999. Olive cultivar names and synonyms and collections detected in a literature review. Acta Horticulturae, 474: 159-162.
6. Caballero, J. M. and Del Rio, C., Barranco, D., Trujillo, I. 2006. The olive world germplasm bank of Cordoba, Spain. Olea, 25: 14-19
7. Connell, J.H. 1994. History and scope of the olive industry. In Olive production manual. Edited by L. Ferguson, G.S. Sibbett, and G.C. Martin. University of California, Division Agricultural and Natural Resources, Oakland, Calif. pp. 109.
8. Cantini, C., Cimato, A. and Sani, G. 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica 109(3): 173-181.
9. Hosseini-Mazinani, M., Samaee, S. M., Sadeghi, H. and Caballero, J. M. 2004. Evaluation of

زیتون / کارگروه تخصصی زیتون. مؤسسه تحقیقات ثبت و

- olive germplasm in Iran on the basic of morphological traits: assessment of "Zard" and "Rowghani" cultivars. Acta Horticulturae, 634:145-151.
10. Hosseini-Mazinani, M., Ataei, S., Samaee S. M., Sadeghi, A. and Mirmansoori, A. 2008. Multivariant analysis of intra-cultivar variation of a local olive cultivar in the northern part of Iran using morphological traits. Acta Horticulturae, 791(1): 65-71.
11. Noormohammadi, Z., Hosseini-Mazinani, M., Trujillo, I., Rallo, L., Belaj, A. Sadeghizadeh, M., 2007. Identification and classification of main Iranian olive cultivars using micro satellite markers. Horticultural Science 42(7):1545-1550.
12. 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.
13. Tous, J., Romero, A., and Barranco, D., 1990. Olive cultivars in Catalonia (Spain). Acta Horticulturae 286:129-132.
14. Zeinanloo, A.A. 2006. The olive industry in Iran. Olivebioteq, November 5<sup>th</sup> –10<sup>th</sup> Mazara del Vallo, Marsala (Italy) Volume I: 173-181.

## Study of Variation of Some Unknown Olive Genotypes in Collection of Tarom Research Station in Iran, Applying Morphological Markers

Torkzaban B.<sup>1,2</sup>, Ataei S.<sup>1</sup>, Saboora A.<sup>2</sup>, Azimi M.<sup>3</sup> and Hosseini-Mazinani M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN

<sup>2</sup> Biology Dep. Faculty of Sciences, Alzahra Univ., Tehran, I.R. of IRAN

<sup>3</sup> Agricultural Research and Natural Resources center, Zanjan, I.R. of IRAN

### Abstract

Germplasm banks are basic sources for selecting and breeding programs. Iran is known as one of the origins of olive in the world with many different olive cultivars and considerable number of old olive orchards. Evaluation and classification of existing olive genotypes in Iran seems to be very important. Thirty-five years ago, 25 olive genotypes (originated from different parts of the world) had been transferred to an olive orchard near Gorgan city. In 1377 their duplicated plants obtained from these genotypes were transferred to collection of Olive Research Station in Tarom-Zanjan. Each selected genotypes propagated with nine replications and nominated as "T<sub>n</sub>". In this study we used morphological characteristics to identify these unknown genotypes. Samples were collected from 15 genotypes with three replications. Morphological data used for cluster analysis. By using of variance analysis, all the studied quantitative characters (except one) revealed significant differences between genotypes and clearly separated from each other. Comparing results with typical known Iranian olive cultivars, showed a remarkable distance between them.

**Keywords:** olive (*Olea europaea L.*), Tarom Olive Collection, cluster analysis, morphological markers, genetic resources