بررسی میزان تنوع در چهار رقم زیتون ایرانی بامطالعه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD

نرگس ابدالی[۱]، مهدی حسینی مزینانی[۲*]، سعیده عطایی[۲] ، سید محمد حسینی[۲] و محمد رضا نقوی[۳]

[۱] ساری، جهاد دانشگاهی واحد مازندران – دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، باشگاه پژوهشگران جوان

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۳] کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۱۶

چکیده

یکی از مهم ترین عوامل در گسترش موفق سطح زیر کشت درختان زیتون، شناسایی و انتخاب رقم مناسب برای هر منطقه جغرافیایی می‌باشد. با توجه به افزایش سطح زیر کشت زیتون در طی بیست سال اخیر در کشور، شناسایی دقیق ارقام بومی موجود از اهمیت زیادی برخوردار شده است، به طوری که عدم توجه به این مهم باعث بروز خسارات جبران‌ناپذیر به باغداران و در نهایت به اقتصاد کشور خواهد شد. در این پژوهش ابتدا صفات مورفولوژیک چهار رقم زیتون شمال کشور شامل ارقام ماری، زرد، فیشمی و خرما زیتون، مورد بررسی دقیق قرار گرفتند. سپس از نشانگر RAPD جهت بررسی دقیق تر این ارقام و تعیین میزان پلی مورفیسم آنها استفاده شد. با استفاده از پرایمر های گروه C نشانگر RAPD ، آزمایش PCR انجام شد و پس از مشاهده محصول PCR بر روی ژل آکریلآمید و امتیاز دهی قطعات DNA، آنالیز آماری با نرم افزار NTSYS ویرایش ۲/۰۲ بر روی داده ها انجام شد. نتایج مولکولی تا حد زیادی طبقه بندی مورفولوژیک را تأیید نمود. ضمناً رقم خرما زیتون که در طبقه بندی سنتی تحت یک نام شناخته شده بود به چهار گروه مجزا تفکیک گردید.

واژه های کلیدی: زیتون، صفات مورفولوژیک، RAPD ،

* نویسنده مسئول، تلفن ۴۴۵۸۰۳۴۵-۰۲۱ ، پست الکترونیکی hosseini@nigeb.ac.ir

مقدمه

زیتون .*Olea europaea* L گونه‌ای زراعی از جنس *Olea*، یکی از قدیمی‌ترین محصولات درختی است که از هزاران سال پیش در منطقه شرق مدیترانه با کشت جمعیتهای وحشی آن شروع شده و امروزه در مناطق جنوبی اروپا، شمال آفریقا و شرق نزدیک توسعه زیادی یافته است (۱۶). این گیاه توانسته است به خوبی با اقلیمهای متنوع و ریز اقلیمهای فراوان ایران سازش یابد، به طوری که از ارتفاعات سرد ومعتدل زاگرس و البرز تا حاشیه کویر مرکزی می توان آن را مشاهده نمود (۵). تنوع ژنتیکی در اکثر گونه های گیاهی به مرور زمان روند فرسایشی نشان می دهد در حالی که در زیتون چیزی به نام فرسایش ژنتیکی مفهوم ندارد و این رمز قدرت سازگاری بالای زیتون با شرایط متنوع محیطی است(۸). علاوه بر قدرت سازگاری بالا، کاربری دو منظوره (روغنی و کنسروی) و خواص درمانی فراوان این گیاه موجب گردیده که افزایش سطح زیر کشت زیتون در برنامه های توسعه کشور قرار گیرد. این برنامه ریزی در حالی صورت می گیرد که هنوز ابهاماتی درطبقه بندی ارقام زیتون ایرانی وجود دارد و موجب شده است که یک رقم تحت چندین نام (synonyms) و یا چندین رقم تحت یک نام طبقه بندی

Archive of SID
www.SID.ir

شوند (homonyms). این مشکل در سراسر جهان نیز وجود دارد به طوری که بیش از۱۲۰۰ رقم زیتون شناخته شده در جهان تحت ۳۰۰۰ اسم مختلف نامگذاری شده اند (۱۰و۱۱). فراموش شدن اطلاعات باغها، نامگذاری مجدد ارقام وارداتی، بی دقتی در نامگذاری در حین تکثیر و خصوصاً استفاده از صفات مورفولوژیک غیراستاندارد سبب بروز چنین ابهاماتی گردیده است (۲۶).

مرحله جوانی طولانی، دوره بی ثمری بلند مدت و حتی تغییرات شیمیایی و مورفولوژیکی که در حین اهلی شدن زیتون رخ می دهد باعث شده که تعیین هویت ارقام تنها با استفاده از روشهای متداول آلوزایمی و مورفولوژیک امکان پذیر نباشد. نکته ای که در شناسایی ارقام با استفاده از روش مورفولوژیک حائز اهمیت است استفاده از صفاتی است که کمترین تأثیر پذیری را از عوامل محیطی دارند. به عنوان مثال رها شدن یک گیاه اهلی زیتون به حال خود موجب می گردد که فرم تنه اصلی و حتی اندازه میوه دچار تغییرات شدید شود و نهایتاً منجر به خطای شناسایی و طبقه بندی گردد (۳). امروزه استفاده از مارکر های مولکولی مبتنی بر DNA با کاربردهای متنوع و فراوان به سرعت در حال توسعه است(۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷و۲۸)، خصوصا اینکه این مارکرها قادرند یک فرصت مقایسه مستقیم و تعیین هویت ژنتیکی، مستقل از اثرات محیطی را فراهم کنند. مستقل بودن این مارکرها از اثرات محیطی و مراحل رشد گیاه باعث شده که آنها به طور ذاتی برای دسته بندی اختصاصی و منشاء یابی مفید باشند (۱۲، ۱۸و۲۳).

طالبی بداف و همکاران (۴) با استفاده از ۱۳ مارکر RAPD به طبقه بندی ۲۸ رقم انار پرداختند، که نهایتاً توانستند با ۷۲ درصد تشابه ۲۲ رقم را در قالب ۵ گروه و شش رقم باقیمانده را هر کدام در یک گروه مستقل قرار دهند. نتایج حاصل حاکی از آن بود که گروه بندی حاصل در بسیاری از مواقع با صفات مورفولوژیک (متداول) مطابقت ندارد. از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که هر چند طبقه بندی مورفولوژیک دچار ضعفهایی است اما استفاده از نشانگرهای مولکولی بدون داشتن پیش زمینه از طبقه بندی مورفولوژیک نه تنها قدرت تصمیم گیری را کاهش می دهد بلکه موجب بروز ابهامات بیشتر می شود. باتیستا و همکاران (۱۳)، در بررسی ۵۱ رقم زیتون با مارکر RAPD ضمن نشان دادن پلی مورف بالا، آنها را به سه گروه اصلی تفکیک نمودند. گونزالو و همکاران (۲۳) در پژوهشی دیگر در اسپانیا با استفاده از ۱۲ پرایمرRAPD و ۳ پرایمر AP-PCR ، ۵۶ ژنوتیپ شامل ژنوتیپهای بومی، وحشی و خارجی کلاستری شامل ۳ گروه اصلی به دست آوردند که به نظر می رسد در این کلاستر موقعیت جغرافیایی، مهم ترین عامل در طبقه بندی ارقام بوده است و آگاهی از صفات مورفولوژیک در توجیه زیر گروههای هر یک از گروههای اصلی مفید بوده است.

هدف از پژوهش حاضر بررسی میزان تنوع در چهار رقم زیتون ایرانی با مطالعه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD می باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: درختانی که در طبقه بندی سنتی رایج در قالب ۴ رقم زرد، ماری ، فیشمی و خرما زیتون قرار داشتند، از مناطق مختلف شمال کشور –در استانهای گیلان و زنجان و اطراف شهرستان رودبار– شامل : ۱– روستای علی آباد ۲– کهریزک ۳– وخمان ۴– جودکی ۵– بهرام آباد ۶– باغ مطهری ۷– باغ اتکا ۸– منطقه گیلوان ۹– باغ مرکز تحقیقات رودبار ۱۰– کلشتر ۱۱– انجیلک ۱۲– فیشم ۱۳– هرزویل جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه برداری از درختان قدیمی (با عمر بیش از پنجاه سال و در طول سالهای ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۴ به تناوب انجام شد).

مطالعات مورفولوژیک: در این مطالعه ۳۲ صفت ظاهری در گیاه زیتون مورد بررسی قرار گرفت. بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

مورفولوژیک ارقام زیتون ابتدا طبق دستورالعمل شورای بین المللی زیتون IOC (International Olive Council) و سپس در طی سالهای اخیر مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال (۷) صورت گرفت. ضمناً از تجربیات کارشناسان اجرایی و تحقیقاتی هر منطقه نیز استفاده گردید. در این روش شناسایی، انتخاب صفات مورفولوژی گیاه بر اساس سه معیار زیر بوده است: ۱- ثبات علائم (صفات) در درختان تولید شده به روش تکثیر رویشی از یک ژنوتیپ و مشاهده ثبات این علائم در سالهای مختلف ۲- وجود تفاوت کافی بین صفات در ژنوتیپهای مختلف برای تشخیص ۳- امکان تشخیص آسان، سریع و مطمئن برای هر رقم. صفات ظاهری گیاه در پنج قسمت (درخت، برگ ، شاخه گل دهنده، میوه و هسته) بررسی و شناسایی شدند. تعداد۲۱۰ درخت (رقم زرد ۹۱ درخت، رقم ماری ۷۷ درخت، رقم فیشمی ۳۱ درخت و رقم خرمازیتون ۱۱ درخت) زیتون از کل مناطق مورد بررسی در شمال کشور، انتخاب و جهت نمونه برداری پلاک گذاری شدند. تعداد درختان مورد بررسی براساس میزان فراوانی و قابل دسترس بودن آنها در مناطق مختلف انتخاب گردید. رقم زرد از عمده ترین ارقام دو منظوره (روغنی و کنسروی) زیتون ایرانی می باشد. این رقم هم اکنون در سرتاسر کشور کشت شده است. ارقام ماری، فیشمی و خرما زیتون در مناطقی از شمال کشور کشت می شوند. روش نمونه برداری به این ترتیب بود که از هر درخت از شاخه جنوبی آن در ارتفاع ۱/۵ متر ازسطح زمین تعداد ۸ تا ۱۰ شاخه و سپس تعداد ۴۰ برگ ، ۴۰ گل آذین، ۴۰ میوه و ۴۰ هسته در فصول مختلف و بر اساس استاندارد IOC جمع آوری شد (۱۱). از مجموع۳۲ صفت مورد بررسی ۱۵ صفت ستاره دار هستند، صفات ستاره دار صفاتی هستند که طی ۲۰ سال مطالعه و بررسیهای انجام شده توسط متخصصین زیتون ایتالیایی و اسپانیایی به عنوان صفات ثابتی که چندان تحت تأثیر شرایط محیط نیستند معرفی شده اند. به عبارت دیگر تغییر در یک صفت ستاره دار نتیجه تغییر در ژنوم گیاه است.

نهایتاً ۳۲ صفت مورفولوژیک فوق برای چهار رقم زیتون ایرانی ثبت و در نرم افزار SPSS آنالیز شدند. از آنجایی که صفات طول، عرض و خمش برگ نقش کلیدی در جدایی ارقام بازی نمی کنند و جهت یکنواختی آنالیزهای آماری، این صفات حذف شدند و آنالیزهای آماری با صفات کمی و کیفی میوه و هسته انجام گرفت.

تجزیه خوشه ای و رسته بندی PCA با استفاده از تمامی صفات (کمی و کیفی میوه و هسته) در میان نمونه های مورد بررسی جدایی خوبی را نشان نداد. در مرحله بعدی برای تعیین اینکه کدام گروه از صفات (کمی یا کیفی) نقش مهم تری در گروه بندی این ارقام داشته اند و به عبارت دیگر تجزیه خوشه ای با چه نوع صفاتی مطابقت کامل با گروه بندی مورفولوژیکی دارد، تجزیه خوشه ای با صفات مختلف و به صورت زیر انجام گرفت.

۱- تجزیه خوشه ای بر اساس تمامی ۳۲ صفت مورفولوژیک

۲- تجزیه خوشه ای با صفات کیفی میوه و هسته

۳- تجزیه خوشه ای با صفات کمی

۴- تجزیه خوشه ای با صفات کیفی هسته

۵- تجزیه خوشه ای با صفات کیفی و کمی هسته

۶- تجزیه خوشه ای با صفات ستاره دار

مطالعات مولکولی: پس از بررسی مورفولوژیک ارقام و طبقه بندی آنها، تعداد ۱۹ درخت از چهار رقم مورد بررسی، جهت مطالعات مولکولی انتخاب شدند.

استخراج DNA: با توجه به وجود ترکیبات باز دارنده مثل ترکیبات فنلی، تانینی و پلی ساکاریدها در برگ زیتون، روشهای مختلف جهت بهینه نمودن استخراج DNA از برگ بررسی گردید و در نهایت با بهینه سازی روش

Archive of SID

www.SID.ir

Kang & Yang، DNA نمونه ها استخراج گردید(۶، ۲۰، ۲۱و۲۲).

واکنش زنجیره ای پلیمراز- پس از بررسی نتایج تحقیقات قبلی (۲۹) ازبین ۳ ست پرایمر A, B و C پرایمرهای گروه C شرکت Operon که پلی مورف بهتری نشان داده بودند، انتخاب شدند . برنامه دمایی PCR با بهینه سازی برنامه دمایی برگرفته از مقاله سمائی وهمکاران (۲۹) در دستگاه ترموسایکلر Techne مدل Touchegne Gradient به صورت ۵ دقیقه واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، یک چرخه ۳۶ سیکلی شامل ۱ دقیقه ۹۴ درجه، ۱دقیقه ۳۶ درجه، ۲ دقیقه ۷۲ درجه و توسعه نهایی۱۰ دقیقه ای در دمای ۷۲ درجه برای حجم نهایی ۲۵µl واکنش PCR (PCR buffer 1x, $Mgcl_2$ 1.5mM, dNTPs 0.2mM, Taq DNA Polymerase 1.25u, DNA 0.4 ng, primer0.4 ρm) اجرا شد.

الکتروفورز فرآورده های PCR : نمونه های حاصل از واکنش PCR بر روی دو نوع ژل آگارز۲ درصد و اکریلامید۶ درصد الکتروفورز شدند، چون تعداد باند و میزان پلی مورفیسم در ژل آگارز کم بود، آنالیز نهایی بر مبنای امتیاز دهی ژل اکریلامید انجام شد و از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ نوکلیوتیدی شرکت Fermentas (۰۳۲۱ SM)که بر روی ژل اکریلامید ۶ درصد ۱۳ باند تولید می‌کرد، استفاده شد. تمام باندهای واضحی که قابل امتیازدهی بودند، بررسی شدند. جهت دستیابی به بهترین دندروگرام، آنالیز با استفاده از نرم افزار NTSYS ویرایش ۲/۰۲ انجام شد. ماتریس تشابه با روشهای مختلف محاسبه و تجزیه کلاستر انجام گرفت. جهت انتخاب بهترین دندروگرام دو مسئله مد نظر بود: ۱- مقدار ضریب همبستگی ۲- حداکثر تطابق دندروگرام حاصل با طبقه بندی مورفولوژیک جدید. بر این اساس بهترین روش در محاسبه ماتریس تشابه به روش Simple Matching و دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش WPGMA انتخاب شد.

نتایج

مطالعات مورفولوژیک: با مطالعه صفات مورفولوژیک در چهار رقم زیتون ایرانی وجود همونیمی در رقم خرما زیتون به اثبات رسید. طبقه بندی سنتی و طبقه بندی جدید مورفولوژیک در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل مورد تأیید متخصصان طبقه بندی مورفولوژیک زیتون اسپانیا نیز قرار گرفت (۹و۲۴). نهایتاً رقم خرما زیتون به چهار رقم مختلف تفکیک شد. در شکل ۱ و جدول ۲ اختلافات مورفولوژیک در درون رقم خرما زیتون- صفات مربوط به تقارن، وجود پستانک و اندازه عدسکها در میوه و همچنین تقارن و شکل هسته- بوضوح قابل مشاهده است.

هر چند در این مطالعه نزدیک به یکصد درخت از رقم زرد از مناطق مختلف شمال ایران جمع آوری و مورد مطالعه مورفولوژیک قرار گرفت اما میزان تنوع مورفولوژیک مشاهده شده در این رقم به مراتب کمتر از رقم خرما زیتون می باشد. رقم زرد یکی از ارقام عمده زیتون ایرانی می باشد که بیشترین سطح باغات زیتون شمال کشور را به خود اختصاص داده است. هم اکنون مطالعات تکمیلی بر روی جمعیت زرد در حال انجام است. رقم ماری از فراوانی نسبتاً پایینی در منطقه شمال کشور برخورداراست و جمعیت آن نسبتاً همگون می باشد. این رقم دارای میوه های کشیده است و از آن برای تهیه کنسرو استفاده می شود. رقم فیشمی در منطقه ای کوهستانی در استان گیلان و نزدیک رودبار کشت می شود. این رقم نیز دارای جمعیتی نسبتاً همگون می باشد و برای مصارف روغن و تولید کنسرو استفاده می شود. در بین چهار رقم مورد مطالعه، رقم خرما زیتون از جمله ارقام بسیار متنوع می باشد که دارای میوه ای درشت با هسته ای کشیده است. میوه این رقم دو منظوره بوده یعنی دارای کاربرد روغنی و کنسروی می باشد. بر مبنای مطالعات مورفولوژیک بر روی ۱۱ درخت از رقم خرما زیتون این

Archive of SID
www.SID.ir

رقم به چهار رقم مختلف تقسیم گردید که نام هریک از این ارقام بر اساس محل شناسایی آن انتخاب شده است. در بررسی تمام این دندروگرامها مشخص شد که تجزیه خوشه ای با استفاده از صفات کیفی میوه و هسته توانایی بسیار بالایی در تفکیک ارقام از یکدیگر دارد.

جدول ۱- طبقه بندی و نامگذاری برخی ارقام زیتون ایرانی

طبقه بندی قبلی ارقام (سنتی)	طبقه بندی و نامگذاری جدید ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک
زرد (Zard)	زرد
فیمشی (Fishomi)	فیمشی
خرما زیتون (Khormazeitoon)	خرما زیتون (خرما زیتون I) خرما زیتون سمیعی (خرما زیتون II) خرما زیتون مطهری(خرما زیتون III) خرما زیتون کلشتر (خرما زیتون IV)
ماری (Mari)	ماری

جدول ۲- خصوصیات مورفولوژیک میوه و هسته در گروههای مختلف رقم خرما زیتون

میوه

Acc. Code	F-shape	F-symA	F-pmtd	F-apex	F-base	F-nipple	Plt	Slt	Lst
KH-I	2	3(2)	3(2)	2	1	2	1(2)	2	3
KH-II	2(1)	3(2)	3	2	1	2	1(2)	2	3
KH-III	2	3	3	2	1	2	2	2	3
KH-IV	2	1	2	2	1	1	1	1	3

هسته

Acc. Code	S-shape	S-symA	S-symB	S-pmtd	S-apex	S-base	S-urf	Groove	Dgroove	Top
KH-I	3	3	2	3	2	2	3	2(1)	2	2
KH-II	2(3)	2	1	3	2	2	3	2	2	2
KH-II	3	2	2	3	1	1	3	2	2	2
KH-V	3	2	1	2	2	1	2	2	2	2

مطالعات مولکولی: با استفاده از۲۰ پرایمرگروه C، در مجموع ۳۰۸ باند(شامل باندهای با وضوح بالا ووضوح کم) قابل امتیازدهی بر روی ژل اکریلآمید ۶ درصد بدست آمد. به طور متوسط به ازای هرپرایمر ۱۵/۴ باند مشاهده شد، که بیشترین تعداد مربوط به پرایمرC08 با ۲۴ عدد و کمترین تعداد متعلق به C09 با ۸ باند بود. ۷۵ درصد از کل باند ها پلی مورف بودند. در یک ارزیابی کلی، ، پرایمرهای C07،C05 وC09 پرایمر های مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی زیتون (خصوصاً در مورد ارقام مورد مطالعه) نبودند در حالی که پرایمر های C08 ،C15 ،C19 وC20 دارای پلی مورفیسم بالا ، قابلیت امتیاز دهی راحت و قدرت تفکیک مناسب بودند. لذا در کنار آنالیز ۲۰ پرایمر، داده های ۴ پرایمر اخیر نیز به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. ماتریس تشابه حاصل ازضریب Simple Matching و دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش WPGMA با ضریب همبستگی ۰/۸ مناسب ترین دندروگرام را هم برای ۲۰ پرایمر مورد مطالعه (شکل ۲) و هم برای ۴ پرایمر مورد آزمایش با ضریب همبستگی۰/۷۲ ایجاد نمود (شکل ۳). میزان ضریب همبستگی مشترک دندروگرام حاصل از ۲۰ پرایمر و ۴ پرایمر ۰/۷۶ بود.

Archive of SID

www.SID.ir

خرمازیتون (خرما زیتونI) (KhormazeitoonI)	خرمازیتون سمیعی (خرمازیتون II) (KhormazeitoonII)	خرما زیتون مطهری (خرمازیتون III) (KhormazeitoonIII)	خرما زیتون کلشتر (خرمازیتون IV) (KhormazeitoonIV)

شکل ۱- تفکیک رقم خرما زیتون به چهار رقم مجزا بر اساس صفات مورفولوژیک

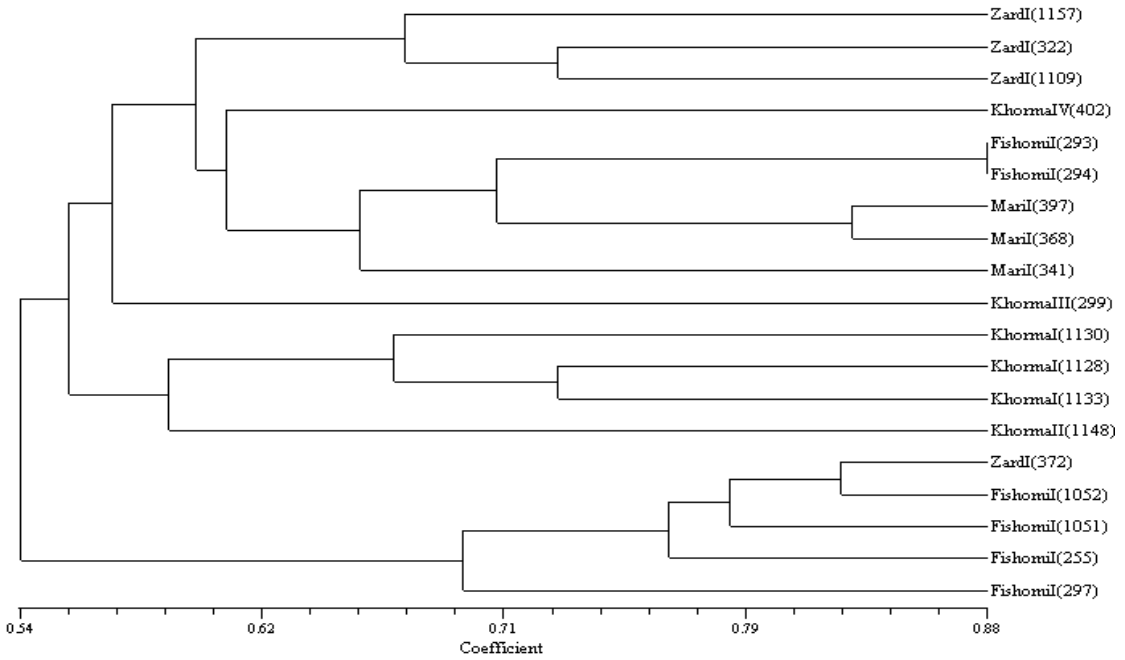
بحث

یکی از اهداف مهم این تحقیق، بررسی میزان تنوع در داخل ارقام زیتون ایرانی و بررسی ارتباط بین طبقه بندی ارقام زیتون براساس صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی می باشد.

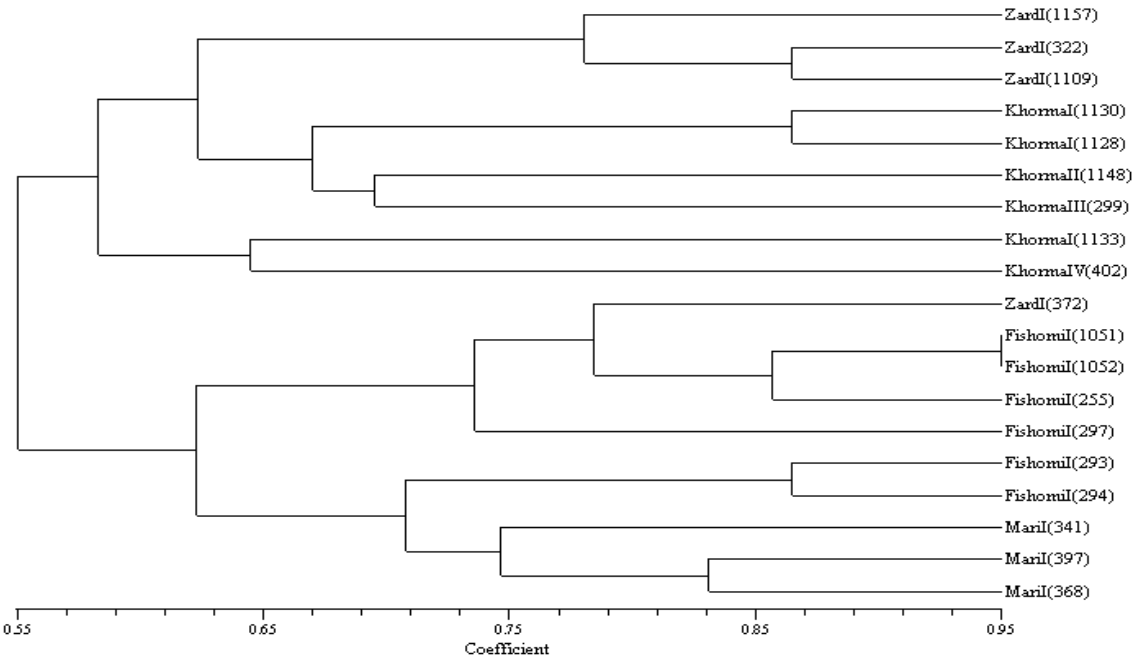
بررسی اولیه دندروگرامهای حاصل از آزمایشات RAPD حاکی از وجود همبستگی بین طبقه بندی مورفولوژیک و مولکولی است. ضمناً در مقایسه دندروگرام حاصل از ۲۰ پرایمر با دندروگرام مربوط به ۴ پرایمر، به نظر می رسد که در دندروگرام حاصل از بررسی ۴ پرایمر تعداد پراکنشها کاهش یافته و همخوانی بیشتری بین این دندروگرام و طبقه بندی مورفولوژیک استاندارد وجود دارد. لذا در ادامه بحث تنها به بررسی دندروگرام حاصل از ۴ پرایمر مذکور اکتفا گردید. به منظور بررسی پراکنش، علاوه بر دندروگرام، از داده های جدول ضریب تشابه (جدول در مقاله نشان داده نشده است) و اطلاعات جانبی استفاده شده است. این دندروگرام با ضریب تشابه ۰/۵۵ به دو شاخه اصلی تفکیک شده است که در آنها بنیادهای ژنتیکی رقم زرد به رقم خرما زیتون شباهت بیشتری نشان داده است تا به ارقام ماری و فیشمی. ارقام ماری و فیشمی نیز بنیادهای ژنتیکی نسبتاً مشابهی با یکدیگر نشان داده اند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- دندروگرام حاصل از روش WPGMA وضریب تشابه Simple Matching برای ۱۹ درخت با استفاده ۲۰ پرایمر ست C مارکر RAPD (کل پرایمر ها)

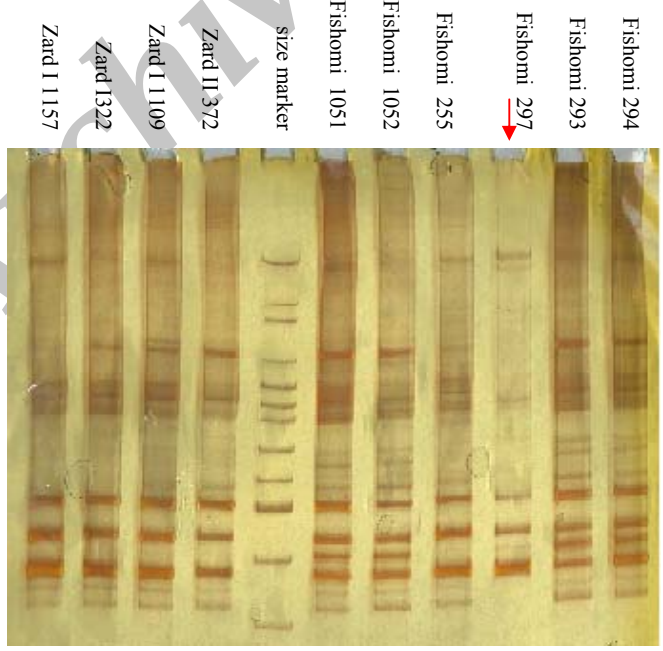


شکل ۳- دندروگرام حاصل از روش WPGMA وضریب تشابه Simple Matching برای ۱۹ درخت با استفاده ۴ پرایمر گروه C مارکر RAPD (C20,C19,C15,C08)

طبق انتظار تکرارهای هر رقم در کنار یکدیگر قرار گرفته اند (به جز رقم زرد ۳۷۲ و خرمازیتون I ۱۱۳۳). قرار گرفتن رقم زرد ۳۷۲ بسیار دورتر از موقعیت مورد انتظار درکنار رقم فیشمی (در هر دو دندروگرام) را می توان به

www.SID.ir

شباهت مورفولوژیکی بالایی که حین مطالعه بین ارقام زرد و فیشمی مشاهده شده نسبت داد و ضمن در نظر داشتن سایر بنیادهای ژنتیکی مشترک و بروز یافته در بررسی مولکولی بین این رقم زرد و تکرارهای فیشمی، لزوم بازنگری صفات مورفولوژیک این نمونه را مد نظر قرار داد. لازم به ذکر است که تنوع ژنتیکی بالا در درون رقم شنگه (یکی از ارقام زیتون بومی شمال کشور) نیز قبلاً توسط حسینی مزینانی و همکاران (۲۵) گزارش شده است، به طوری که در آن پژوهش این رقم بصورت چهار کلاستر کاملاً مجزا از هم تفکیک گردیده است. همان طوری که در مورد ارقام فیشمی مشهود است تکرارهای فیشمی I با شباهت ۹۵ – ۶۲ درصد در کنار یکدیگر قرار گرفته اند، هرچند فیشمی ۲۹۷I درکنار سایر فیشمیها است اما طبق جدول ضریب تشابه میزان شباهتش به تکرارهای دیگر فیشمی I کم است (۷۷–۶۱ درصد). با مراجعه به شکل ۴ به راحتی می توان الگوی باندهای متفاوت و کاملاً محدود فیشمی I ۲۹۷ را مشاهده کرد این الگوی باند در تمام پرایمرها و حتی با استخراج مجدد DNA و تکرار PCR وجود داشت که احتمالاً این نمونه می تواند رقم دیگری از گروه فیشمی باشد. در مورد ارقام خرما زیتون، هر چند در دندروگرام، خرما زیتون I ۱۱۳۳ مجاور خرما زیتون IV واقع شده است. ولی طبق جدول ضرایب، شباهتش به دو تکرار دیگر خرما زیتون I (۶۷–۶۴ درصد) بیشتر از شباهتش به خرما زیتون IV (۶۴ درصد) است، و فقط به خاطر روش تجزیه کلاستر مورد استفاده، در کنار خرما زیتون IV واقع شده است. دور بودن خرما زیتون IV نه تنها بر اساس تفاوت زیاد در اکثر صفات مورفولوژیک مربوط به میوه و برخی صفات مربوط به هسته با سایر خرما زیتونها می باشد (رجوع به شکل ۱)، بلکه براساس تفاوت در ناحیه جغرافیایی خرما IV (منطقه کلشتر) در مقایسه با سایر نمونه های خرما زیتون (منطقه هرزویل و باغ مطهری) قابل توجیه است. ویسمن وهمکاران (۳۰) نیز درگزارشات خود به مواردی از ارتباط بین تفاوتهای ژنتیکی و منشاء جغرافیایی اشاره داشته اند.



شکل ۴- تفاوت در آرایش باندهای DNA حاصل از آزمایش RAPD در رقم فیشمی ۲۹۷ با سایر ژنوتیپهای فیشمی

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به نتایج فوق می توان گفت که ارقام سنتی زیتون در طبقه بندی جدید با تفاوت ۴۵ – ۳۳ درصد بعنوان ارقام مجزا تفکیک شده اند. همان طور که مِکوریا و همکاران (۲۷) اشاره کرده اند تا به حال دستورالعمل واضحی در مورد فاصله ژنتیکی لازم جهت تفکیک و تمایز دو توده مرتبط وجود ندارد. مثلا در پژوهش برادلی و همکاران (۱۹) در مورد گیاه سیر، ۱۲ درصد تفاوت ژنتیکی ازگیاه مادری را ایجاد یک رقم جدید دانستند ، اما در مورد ارقام زیتون با این صراحت نمی توان صحبت کرد. در پژوهشی که ویسمن و همکاران (۳۰) بر روی زیتون انجام دادند حداکثر تفاوت ژنتیکی حدود ۱۶ درصد را برای معرفی رقم جدید در پژوهش خود مطرح کردند. اما طبق توضیحات آنجیولیلو و همکاران (۸) چون زیتون با فرسایش ژنتیکی مقابله می کند ، پس به راحتی نمی توان گفت چه میزان تغییر در افراد یک ژنوتیپ ، یعنی شناسایی یک رقم جدید، نتیجه این امر در قدرت سازگاری زیتون که ناشی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در این گیاه است قابل تأیید می باشد.

با یک نگاه کلی چنین استنباط می شود که این پرایمرها خصوصا ۴ پرایمر منتخب نه تنها به خوبی قادر بودند ارقام زیتون را از هم تفکیک نمایند، بلکه نتایج حاصل تا حد زیادی با انتظارات این پژوهش از نحوه تفکیک مورفولوژیک همخوانی داشت، به عبارتی به جز در مورد یکی از نمونه های رقم زرد (خصوصاً زردI ۳۷۲) که نیاز به بررسی مورفولوژیک و مولکولی بیشتری دارد اولاً ارقام سنتی به خوبی از هم تفکیک شده اند و ثانیاً در مواردی تکرارهای هر رقم با دقت ۹۵ درصد بر هم منطبق شده اند.

جهت توجیه پراکنش ها ۳ فرض را می توان مطرح و بررسی نمود:

۱- وجود بنیادهای ژنتیکی مشترک که فراتر از ارتباط بین نشانگر و صفات مورفولوژیک است و نامشخص بودن جایگاه اتصال نشانگر RAPD موجب شده تا تنها نواحی مرتبط با صفات مورفولوژیک بیان نشوند بلکه آنچه نمود یافته سایر نواحی گسترده سطح ژنوم است(مثلا بین زرد I ۳۷۲ و فیشمیها). ۲- نزدیک شدن برخی ارقام ظاهراً متفاوت احتمالاً حاکی از شباهت در سایر صفات باغبانی خصوصاً نوع کاربری (روغنی یا کنسروی) است (۲). ۳- به دلیل ماهیت پلی ژنی بسیاری از صفات و اثر عوامل محیطی، نیاز به جمع آوری داده های فراوان در مکانهای مختلف بوده و در بعضی موارد میزان پلی مورفیسم برای برخی صفات مورفولوژیک بسیار محدود است (۱).

جدول ۳- اختصارات

هسته	میوه
S-shape = Stone Shape	**F-shape** = Fruit Shape
S-symA = Stone Symmetry A	**F-symA** = Fruit Symmetry A
S-symB = Stone Symmetry B	**F-pmtd** = Fruit Position of maximum transverse diameter
S-pmtd = Stone Position of maximum transverse diameter	**F-apex** = Fruit apex
S-apex = Stone Apex	**F-base** = Fruit Base
S-base = Stone Base	**F-nipple** = Fruit Nipple
S-urf = Stone Surface	**Plt** = Presence of lenticels
Groove = Number of grooves	**Slt** = Size of Lenticels
Dgroove = Distribution of the grooves	**Lst** = Location of start of colour change
Top = Apex Termination	

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی: از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که هزینه اجرای این پژوهش را در قالب طرح شماره ۱۸۴ بر عهده داشته، آقای مهندس میرمنصوری به سبب همکاریهای صمیمانه در پیشبرد این پروژه، همکاری موثر مدیریت محترم باغ اتکا (شهرستان منجیل)، آقای مهندس نیری مدیریت محترم باغ شهید مطهری (شهرستان طارم)، آقای مهندس سالاری مدیریت محترم مرکز تحقیقات زیتون رودبار (آقای مهندس معصومی)، آقای کیوان نظری تکنیسین محترم وزارت جهاد کشاورزی استان گیلان در جمع آوری نمونه ها و همکاری ارزشمند مجری و کارشناسان محترم دفتر طرح زیتون وزارت جهاد کشاورزی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱- فارسی،م. و ذوالعلی، ج. ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- شهریاری، م.، نانکلی، ا.، علوی، س .م. و قره یاضی، ب.، 1380. بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم زیتون ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD. دومین همایش ملی بیوتکنولوژی، ایران. صفحات: ۲۳۲-۲۲۷.

۳- صادقی، ح.، ۱۳۸۱ کاشت، داشت و برداشت زیتون. نشرآموزش کشاورزی.

۴- طالبی بداف، م.، شریف نبی، ب. و بهار، م.، ۱۳۸۲. تنوع ژنتیکی برخی ارقام انار در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD. سومین همایش ملی بیو تکنولوژی، ایران. صفحات: ۳۴۵- ۳۴۳.

۵- طباطبایی م. ۱۳۷۶. گزارشهای مکان یابی زیتون، وزارت کشاورزی، طرح توسعه زیتون

۶- کیهان، آ.، متقی، ل.، ابدالی، ن.، حسینی مزینانی، س.م. و نقوی، م.، ۱۳۸۴. بهینه سازی روش استخراج DNA از برگ زیتون. سیزدهمین کنفرانس زیست شناسی . صفحه: ۵۶.

۷- کارگروه تخصصی زیتون ۱۳۸۶. دستورالعملهای ملی آزمونهای تمایز، یکنواختی و پایداری در زیتون . مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال.

8- Angiolillo, A., Mencuccini, M. and Baldoni, L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphism. TAG.98:411- 421.

9- Ataei, S., Hosseini–Mazinani, M., Sadeghi, A., Hosseini, M. and Ferdowsipur, M., 2004. Reclassification of traditional Iranian Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars according to the IOOC Methodology. 5th International Symposium on olive growing, Izmir /Turky. p. 113.

10- Bartolini, Giorgio., Prevost, Glauco., Messeri, Carlo., Carignani, Gino and Menini, Umberto G. 1998. Olive germplasm, cultivars and world–wide collections. Food and Agriculture Organization of United Nations (F.A.O.).

11- Bartolini, G., Masseri, C. and Prevost, G., 1993. Olive tree germplasm descriptor list of cultivated varieties in the world. Acta Horticulturae 356, 116-118.

12- Bautista, Rocio., Crespillo, Remedies., Canovas, Francisco and Gonzalo Claros, M., 2002. Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. Euphytica 129: 33-41.

13- Bautista, Rocio., Ganovas, Francisco M. and Gonzalo, Claros M. 2003. Genomic evidence for a repetitive nature of the RAPD polymorphisms in *Olea europea* (olive- tree). Euphytica 130**:** 185–190.

14- Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., Satovic. Z. 1998. Effeicincy of RAPD markers for virtual identification in olive (*olea europaea* L.) germplasm collections. Acta Horticulturae 663:15-20

15- Belaj, A., Trujillo, M., Rosa, D.,. Rallo L. and Gimenez, M.J., 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly polymorphic markers in an olive germplasm bank. ASHS, 126 (1), pp. 64-71

16- Bertini , D.G .V. 1960. Olive growing and processing. part I and II. Standing Committee on Agriculture, Melbourne, Australia.

17- Besnard, G., Barada T, Ph., Chevalier, D., Tagmout, A and Berville, A. 2001. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea*

Archive of SID
www.SID.ir

europaea) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes genetic resources and crop evaluation. 48(2): 165-182.

18- Besnard P.Bardat .A .Aerville., 2001. Genetic relationship in the olive (*Olea europaea* L.) reflects multilocal selection of Cultivars, Theor Appl Genet 102, 251-258.

19- Bradley, K.F., Rieger, M. A. and Collins, G.G., 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA finger printing, Australian Journal of Experimental Agriculture 36: 613-8.

20- Breton, C., Claux, D., Metton, I .,Skorski , G and Berville, A. 2004. Comparative study of method for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. J, Agric Food chem. 52(3): 531-7.

21- Dellaporta, S.L. 1994. Plant DNA mini prep and micro prep verso ills. In the maize hand book edited by M.FRF.EI.ING. And V.WAL. BOT. springer-verlag. Newyork. 201-203. PP.522-525.

22- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. Phytachem Bul. 19:11-15.

23- Gonzalo Claros, M., Crespillo, Remedios., Aguilar, L. and Canovas, Francis C.M. March 2000. DNA finger printing and classification of geografically related genotypes of olive- tree *(Olea europaea* L .).Euphytica. 116: 131-142.

24- Hosseini-Mazinani, S.M., Samaee, S., Mohammadreza., Sadeghi, H and Cabalerro, J.M.., 2004. Evaluation of olive germplasm in Iran on the basis of morphological traits: assessment of 'Zard' and ' Rowghani' cultivars. ISHS Acta Horticulturae. 634: 145 – 151.

25- Hosseini-Mazinani, M., Samaee, S.M., Ataei, S., Sadeghi, A. and Mirmansoori, A., 2004. Multivariate analyses of intra-cultivar variation of a local olive cultivar in the Northern part of Iran using morphological traits. Acta Horticulturae. 791: 65–71

26- Macdonald, L., 1995. The olive Journal of the Department of Agriculture of Victoria, 12: 154-503.

27- Mekuria, Genet T., Collins,graham G. and Sedghley, Margaret. 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. Journal of Horticultural Sciences Biotechnology, 74(3)309-314.

28- Parminder, S.V., Fard-lloyd B. V., M.T Jaikson and H.J Newbury. 1995. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collection. Heredity .74:170-179.

29- Samaee, S.M., Shobbar, Z.S., Ashrafi, H., Hosseini-Mazinani, M. and Sheidai, M., 2004. Molecular characterization of olive germplasm in Iran by use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and correlation with phenotypic studies: preliminary results . Acta Horticulturae, 623: 169 – 175.

30- Weisman, Z., Avidan, N., Lavee, Sand Quebedeaux, B., 1998. Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the west bank using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Journals of the American Society for Horticultural Science. 123, 837-410.

Archive of SID

www.SID.ir

Studies on intra-cultivar variation of four iranian olive cultivars using morphological characteristics and RAPD markers

Abdali A.[1], Hosseini-Mazinani M.[2] , Ataei S.[2], Hosseini S. M.[2] and Naghavi M.R.[3]

[1] Mazandaran Branch, Daneshgahi Jihad, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Sari, I.R. of IRAN

[2] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN

[3] Agricultural College, Tehran University, Karaj, I.R. of IRAN

Abstract

From twenty years ago, attempts have been started for improving and developing olive orchards in Iran. Programs as developing and Management of olive orchards are not possible unless through identifying of native olive cultivars. Analysis of morphological characteristics reveals a considerable degree of intra-cultivar variation within four traditionally recognized Iranian olive cultivars. Based on the morphological analysis carried out so far, the four traditional cultivars studied ("Zard","Fishomi", "Mari" and "Khormazeitoon") have been reclassified into 8 cultivars. To evaluate the accuracy of the new morphological classification, we examined the genetic diversity of these cultivars using RAPD primers (set C). The data were analyzed using simple matching similarity coefficient and the NTSYS-pc 2.02 K software. The results confirmed the accuracy of the new morphological classification and the Khormazeitoon cultivar were divided into four new varieties.

Keywords: Olive, Morphological Characteristics, RAPD,

Archive of SID

www.SID.ir