مجله علوم و فنون باغباني ايران جلد ۱۰ شماره ۱ صفحه هاي ۴۳ تا ۵۲ (۱۳۸۸)

بررسي خويشاوندي ژنتيكي برخي از رقم هاي زيتون ايراني و خارجي با استفاده از نشانگرهاي AFLP[1]

ASSESSMENT OF GENETIC RELATIONSHIP AMONG SOME OF THE IRANIAN AND FOREIGN OLIVE CULTIVARS USING AFLP MARKERS

غزاله خاكسار، بدرالدين ابراهيم سيد طباطبايي، مهدي رحيم ملک، سهيلا موحدي و مصطفي مبلي[2]

چكيده

بررسي خويشاوندي ژنتيكي جمعيت‌هاي گياهي براي انتخاب والدين مناسب جهت دورگه گيري بين آن ها و توليد رقم هاي جديد با عملكرد بالا از اهميت زيادي برخوردار است. در اين پژوهش تنوع ژنتيكي ۱۵ رقم زيتون از منشاهاي مختلف (ايران، اسپانيا، سوريه، آمريكا و يونان) با استفاده از نشانگرهاي AFLP مورد بررسي قرار گرفت. نه ترکيب آغازگر, در مجموع ۶۹۵ نوار توليد نمودند كه از اين تعداد ۹۷% نوار چندشكل به دست آمد. بيشترين تعداد نوار چندشكل متعلق به تركيب آغازگري P2 و M21 (۱۰۱ نوار چندشكل, ۹۷%) و كمترين تعداد نوار چندشكل متعلق به تركيب آغازگري P2 و M24 (۶۴ نوار چندشكل, ۹۵%) بود. براي گروه‌بندي رقم ها و تعيين ميزان شباهت آن ها از روش تجزيه خوشه‌اي استفاده شد. بررسي ضريب همبستگي كوفنتيک نشان داد كه گروه‌بندي بر اساس روش UPGMA با استفاده از ضريب تطابق ساده با ضريب همبستگي كوفنتيک ۹۲/. مناسب‌ترين روش طبقه‌بندي رقم هاي مورد مطالعه مي‌باشد. با برش دندروگرام از ناحيه ۰/۶ تشابه, سه گروه ايجاد شد. بيشتر رقم هاي ايراني در يك گروه قرار گرفتند؛ همچنين رقم هاي ايراني شباهت زيادي با رقم هاي اسپانيايي داشتند كه مي‌تواند نشان دهنده منشا تكاملي يكسان آن ها باشد.

واژه هاي كليدي: زيتون، تنوع ژنتيكي، نشانگر AFLP.

مقدمه

زيتون يكي از قديمي‌ترين گياهان منطقه مديترانه به ويژه خاورميانه است و اهلي شدن آن به ۶۰۰۰ سال پيش برمي‌گردد (۲). اين گياه هميشه سبز، از تيره Oleaceae و جنس *Olea* مي‌باشد كه داراي بيش از ۲۰ گونه است. تنها گونه *Olea europaea* و زير جنس *sativa* داراي ميوه خوراكي است (۲). اين گونه به سبب داشتن ميوه خوراكي ورقم هايي با روغن بسيار مرغوب، حائز اهميت است. ميوه آن در صنايع غذايي مثل كنسروسازي، مايونزسازي، دارويي، كرم‌سازي و غيره ماده اوليه گرانبهايي به شمار مي‌رود. افزون بر اين, در ايجاد فضاي سبز و حفاظت از خاک‌ها به ويژه روي شيب‌ها، نقش دارد (۲). اين گياه داراي عمر طولاني است و بنابراين ويژگي هاي ژرم‌پلاسم خود را براي هزاران سال حفظ مي‌نمايد (۱۲). پيچيدگي ژنوم اين گونه (۲n=۴۶) سبب

۱- تاريخ دريافت: ۸۷/۷/۲٤ تاريخ پذيرش: ۸۸/۲/۲۳

۲- به ترتيب كارشناس ارشد بيوتكنولوژي، دانشيار گروه بيوتكنولوژي، دانشجوي دكتري زراعت و اصلاح نباتات و دانشيار گروه علوم باغباني دانشكده كشاورزي، دانشگاه صنعتي اصفهان، اصفهان، جمهوری اسلامی ايران.

محدود شدن اطلاعات ژنتيكي آن گرديده و بهنژادي آن را با مشكل مواجه ساخته است, به‌طوري كه اصلاح آن به طور معمول با روش‌هاي سنتي صورت پذيرفته و تنها به انتخاب همگروه و رقم محدود گشته است (۱۲). در ايران، درختان كهنسال زيتون در نواحي مختلف كشور وجود دارند كه نشان دهنده مستعد بودن بسياري از مناطق كشور براي كاشت و بهره‌برداري از زيتون است. بر اين اساس با بررسي و سرمايه‌گذاري صحيح مي‌توان كشور را به عنوان يكي از مهم‌ترين مراكز توليد كننده زيتون در خاورميانه تبديل نمود (۲).

در سال‌هاي اخير, پژوهش‌هاي گسترده‌اي در بررسي تنوع ژنتيكي گياهان مختلف با استفاده از ويژگي‌هاي مورفولوژيک و نشانگرهاي مولكولي نظير AFLP صورت گرفته است. نشانگرAFLP روش قدرتمندي براي شناسايي چند شكلي DNA و بررسي تنوع ژنتيكي مي‌باشد كه اولين بار توسط ووس[۱] و همكاران (۱۹) معرفي شد. از نشانگر AFLP براي بررسي گوناگوني ژنتيكي و تعيين روابط خويشاوندي رقم هاي زيتون استفاده شده است. سنسي[۲] وهمكاران (۱۸) با استفاده از نشانگر AFLP، ۱۲ نژادگان زيتون را با ۶ ترکيب مختلف آغازگر بررسي و تنوع ژنتيكي آن ها را با ۲۷۴ نوار چند شكل توليد شده مورد تجزيه و تحليل قرار دادند. بر اساس ميزان چند شكلي بالاي به‌دست آمده , ارتباط ژنتيكي درون جمعيت مورد مطالعه را مشخص نمودند. اون[۳] و همكاران (۱۳) ضمن اشاره به دقت بالاي نشانگر AFLP, به بررسي تنوع ژنتيكي در رقم هاي زيتون مديترانه با استفاده از ۵ ترکيب آغازگر مبادرت ورزيدند و با استفاده از ۱۱۹ نوار چند شكل اين رقم هاي را طبقه بندي نمودند. گراتي كامون[۴] و همكاران (۷)، ۲۹ رقم زيتون با درجه هاي متفاوت خويشاوندي را ارزيابي كرده و مشخص نمودند كه اين نشانگر قدرت تمايز بالا و همچنين توانايي تشخيص ارتباط ژنتيكي درون رقم هاي زيتون را داراست. بلاژ[۵] و همكاران (۶) تنوع ژنتيكي و روابط خويشاوندي را در بين ۳۲ رقم زيتون‌هاي ايتاليايي و اسپانيايي با استفاده از نشانگرهاي AFLP، RAPD و SSR بررسي نمودند و نشان دادند كه تنوع ژنتيكي در بين رقم هاي هر كشور بيشتر از بين دو كشور است. مونته مورو[۶] و همكاران (۱۰) روابط ژنتيكي بين رقم هاي زيتون را با استفاده از نشانگرهاي AFLP و SSR بررسي و با استفاده از ۷۰ نوار چند شكل AFLP و ۸۰ نوار چند شكل SSR, رقم ها را به سه گروه مجزا دسته‌بندي نمودند. با توجه به قدرت بالاي نشانگر AFLP در بررسي تنوع رقم هاي زيتون، اين پژوهش براي بررسي نزديكي ژنتيكي رقم هاي ايراني و خارجي زيتون موجود در باغ سازگاري زيتون دانشگاه صنعتي اصفهان با استفاده از نشانگر AFLP در راستاي پيشبرد اهداف بهنژادي به‌منظور انتخاب نژادگان هاي برتر و با ثبات بيشتر به همراه داده‌هاي مورفولوژيک انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

در اين پژوهش ۱۵ رقم زيتون از مجموعه موجود در دانشگاه صنعتي اصفهان انتخاب و از آن‌ها نمونه‌هاي برگي تهيه گرديد (جدول ۱). قلمه‌هاي ريشه‌دار اين رقم ها كه هر كدام يک هم گروه هستند از بين رقم هاي انتخاب شده در بخش زيتون وزرات جهاد كشاورزي در اواخر سال ۱۳۷۹، تهيه وكشت شدند. نمونه‌هاي برگي پس از توزين به ميزان ۰/۵ گرم در نيتروژن مايع منجمد و تا پيش از استخراج DNA در داماي ۸۰- درجه سلسيوس نگهداري شدند. استخراج DNA ژنومي با روش تغيير يافته موري و تامسون[۷] (۱۱) انجام و كميت و كيفيت DNA به‌دست آمده با روش الكترفورز ژل آگارز تعيين شد. واكنش AFLP بر اساس روش پيشنهادي

۱- Vos ۲- Sensi ۳- Owen ۴- Grati-Kamoun ۵- Belaj ۶- Montemurro ۷- Murry and Thompson

ووس وهمكاران (۱۹) با استفاده از آنزيم‌هاي برشي *Pst* I و *Mse* I (شركت Roche) انجام گرفت، بدين صورت كه ۶ ميكروليتر (۵۰ نانوگرم در ميكروليتر) از DNA هر نمونه با آنزيم‌هاي *Pst* I (۵ واحد) و *Mse* I (۵ واحد) در دماي ۳۷ درجه سلسيوس به مدت ۳ ساعت برش يافت. سپس سازگارسازهاي Pst I (۵ پيكومول) و Mse I (۵۰ پيكومول) با استفاده از آنزيم T4 ليگاز (۱ واحد) به انتهاي قطعات برش يافته متصل گرديد (جدول ۲).

جدول۱ – نام ها و منشا احتمالي رقم هاي زيتون مورد استفاده.

Table 1. Name and origin of the olive cultivars used.

شماره Number	نام رقم (Cultivar Name)	منشا احتمالي† (Origin)
۱	'رشيد' ('Rashid')	ايران (Iran)
۲	'دزفول' ('Dezfol')	ايران (Iran)
۳	'بليدي' ('Belidi')	سوريه (Syria)
۴	'زرد' ('Zard')	ايران (Iran)
۵	'شنگه' ('Shenge')	ايران (Iran)
۶	'كرونايكي' ('Kroneiki')	يونان (Greece)
۷	'مانزانيلا' ('Manzanila')	اسپانيا (Spain)
۸	'كنسروواليا' ('Konservolia')	يونان (Greece)
۹	'سويلانا' ('Sevillano')	اسپانيا (Spain)
۱۰	'ميشن' ('Mission')	آمريكا (American)
۱۱	'اسپانيا' ('Spain')	اسپانيا (Spain)
۱۲	'روغني' ('Rowghani')	ايران (Iran)
۱۳	'گرگان' ('Gorgan')	ايران (Iran)
۱۴	'والانوليا' ('Valanolia')	يونان (Greece)
۱۵	'آمفي‌سيس' ('Amphissis')	يونان (Greece)

† On the basis of references number 15.

† بر اساس منبع شماره ۱۵.

در مرحله تكثير پيش انتخابي، از آغازگرهاي بدون نوكلئوتيد انتخابي در انتهاي ۳' (P000 و M000) استفاده شد (جدول ۲). براي انجام PCR[1]، مقدار ۳ ميكروليتر از DNA رقيق شده به نسبت ۱:٤، ۲ ميكروليتر بافر PCR (۱ برابر)، ۰/۸ ميكروليتر كلريد منيزيم (۵۰ ميلي‌مولار)، ۰/۳ ميكروليتر مخلوط نوكلئوتيد (۱۰ ميلي‌مولار)، ۱ ميكروليتر از هر يک از آغازگرهاي P000 و M000 (۱۰ پيكومول)، ۰/۲ ميكروليتر آنزيم تک DNA پليمراز (۱ واحد) و آب دوبار تقطير سترون مخلوط شدند و حجم نهايي واكنش ۲۰ ميكروليتر بود. واكنش PCR در دستگاه ترموسايكلر اپندورف (Mastercycler gradient) با ۳۰ چرخه دمايي شامل ۹۴ درجه سلسيوس ۱ دقيقه، ۵۶ درجه سلسيوس ۱ دقيقه و ۷۲ درجه سلسيوس ۱ دقيقه انجام گرفت.

۱- Polymerase chain reaction

جدول ۲- توالي سازگارسازها PstI و MseI و آغازگرهاي مورد استفاده در اين مطالعه.

Table 2- Sequencing of PstI and MseI adapters and primers.

نام آغازگر/ آداپتور Adapters/primers		توالي Squence
PstI -1	Pst I adapter	5'-GAC TGC GTA GGT GCA-3'
PstI-2		3'-GAG CAT CTG ACG CAT CC-5'
P000		5'-GAC TGC GTA GGT GCA-3'
P1		5'-GAC TGC GTA GGT GCA AAT-3'
P2		5'-GAC TGC GTA GGT GCA ACT-3'
P3		5'-GAC TGC GTA GGT GCA AAC-3'
P4		5'-GAC TGC GTA GGT GCA AGA-3'
P5		5'-GAC TGC GTA GGT GCA ACG-3'
P6		5'-GAC TGC GTA GGT GCA ACA-3'
MseI-1	Mse I adapter	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
MseI-2		3'-TA CTC AGG ACT CAT-5'
M000		5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
M21		5'-GAC GAT GAG TCC TGA GCC A-3'
M24		5'-GAC GAT GAG TCC TGA GCC T-3'
M28		5'-GAC GAT GAG TCC TGA GCG T-3'

در مرحله تكثير انتخابي، محصول مرحله اول به نسبت ۱:۵ رقيق و ۳ ميكروليتر از آن به ۱۲ ميكروليتر بافر PCR (۱ واحد)، ۱ ميكروليتر كلريد منيزيم (۵۰ ميلي‌مولار)، ۰/۳ ميكروليتر مخلوط نوكلئوتيد (۱۰ ميلي‌مولار)، ۱ ميكروليتر از هر يک از آغازگرهاي انتخابي (۱۰ پيكومول)، ۰/۲ ميكروليتر آنزيم تک DNA پليمراز (۱ واحد) و آب دوبار تقطير اضافه گرديد. دوره‌هاي حرارتي شامل واسرشت‌سازي اوليه (۹۴ درجه سلسيوس به مدت دو دقيقه) و پس از آن ۳۵ چرخه دمايي شامل ۹۴ درجه سلسيوس در ۳۰ ثانيه، ۶۵ درجه سلسيوس در ۳۰ ثانيه و ۷۲ درجه سلسيوس در يک دقيقه بود كه در ۱۲ چرخه اوليه، دماي اتصال آغازگر به ميزان ۰/۷ درجه سلسيوس در هر چرخه كاهش يافت و تكثير DNA در دماي ۵۶ درجه سلسيوس براي ۲۳ چرخه باقيمانده ثابت شد و در نهايت به مدت ۲ دقيقه در دماي ۷۲ درجه سلسيوس قرار گرفت. به منظور مشاهده الگوي نواري از ژل پلي‌اكريل‌آمايد ۶% واسرشته استفاده شد. قبل از بارگذاري نمونه‌ها، الكتروفورز اوليه به مدت ۳۰ دقيقه در شرايط ۱۰۰ وات ثابت و دماي ۵۰ درجه سلسيوس صورت گرفت. الكتروفورز محصولات PCR نيز در همان شرايط و به مدت ۲ ساعت با دستگاه توالي‌ياب شركت بيومترا مدل S2 [۱] انجام شد. پس از الكتروفورز، رنگ‌آميزي ژل به روش نيترات نقره (۴) انجام گرفت و از الگوي نواري به‌دست آمده عكس‌برداري شد. براي تجزيه و تحليل مشاهدات, ابتدا وجود و عدم وجود نوار در هر رقم به‌ترتيب با اعداد يک و صفر نشان داده شد. سپس تشابه بين رقم ها با ضريب تطابق ساده[۲] محاسبه و تجزيه خوشه‌اي با استفاده از روش UPGMA و به كمک نرم‌افزار NTSYS-pc نسخه ۲/۰۲ انجام شد. براي گروه‌بندي رقم هاي دندروگرام حاصل از ناحيه ۰/۶ تشابه برش داده شد و در نهايت از ضريب همبستگي كوفنتيک براي ارزيابي گروه‌بندي حاصل استفاده گرديد.

۱- Biometra sequencing gel, S2 ۲- Simple matching

نتايج و بحث

در اين پژوهش با استفاده از ۹ تركيب آغازگري در مجموع ۶۹۵ نوار حاصل شد كه از اين تعداد ۶۷۵ نوار چندشكل (۹۷%) بودند (شكل۱ و جدول ۳). از بين آغازگرهاي مورد استفاده، بيشترين تعداد نوار چندشكل متعلق به تركيب آغازگري P2 و M21 (۱۰۱ نوار چندشكل, ۹۷%) و كمترين تعداد نوار چندشكل متعلق به تركيب آغازگري P2 و M24 (۶۴ نوار چندشكل, ۹۵%) بود (جدول ۳). تعداد نوار زياد و ميزان چندشكلي بالاي به‌دست آمده توسط نشانگر AFLP بيانگر توانايي اين نشانگر در بررسي تنوع ژنتيكي و تفاوت زياد رقم هاي مورد مطالعه مي‌باشد. اون و همكاران (۱۳) رقم هاي تركي، يوناني، سوري و لبناني زيتون موجود در منطقه مديترانه را توسط ۱۱۹ نوار چندشكل حاصل از ۵ تركيب آغازگر نشانگر AFLP طبقه‌بندي نمودند. رستا[1] و همكاران (۱٤) با استفاده از نشانگر AFLP، ۵۰ نژادگان زيتون متعلق به منطقه آپوليا (جنوب ايتاليا) را توسط ۱۸ تركيب مختلف آغازگر مورد بررسي قرار دادند و تشابه ژنتيكي زيادي را بين رقم هاي مختلف محلي به‌دست آوردند.

بررسي ضريب همبستگي كوفنتيك نشان داد كه گروه‌بندي بر اساس روش UPGMA و با استفاده از ضريب تطابق ساده با ضريب كوفنتيک ۰/۹۲ مناسب‌ترين روش طبقه‌بندي است. با قطع دندروگرام رسم‌شده از ناحيه تشابه ۰/۶، سه گروه حاصل شد. رقم هاي 'كرونايكي'، 'والانوليا'، 'آمفي‌سيس' و 'روغني' در گروه اول، رقم هاي 'رشيد'، 'كنسروواليا', 'دزفول'، 'زرد'، 'شنگه'، 'گرگان'، 'مانزانيلا' ، 'سويلانا'، 'اسپانيا' و 'ميشن' در گروه دوم قرار گرفتند و رقم 'بليدي' نيز يک گروه مستقل را تشكيل داد و از ساير رقم ها به طور كامل جدا شد. بررسي داده‌هاي حاصل از ماتريس تشابه نشان داد كه بيشترين شباهت (۷۹%) بين دو رقم 'روغني' و 'والانوليا' و كمترين شباهت (۵۶%) بين دو رقم 'كرونايكي' و 'بليدي' بود. مقايسه نتايج اين تحقيق با نتايج مورفولوژيك حاصل از تحقيق مبلي و همكاران (٤ و منتشر نشده) روي اين رقم ها نشان داد كه در بسياري از موارد نتايج حاصل از دو روش يكسان بود. براي نمونه رقم 'بليدي' كه در اين مطالعه يک گروه مستقل را تشكيل داد, در مقايسه با ساير رقم ها از نظر شكل ميوه و نسبت طول به عرض ميوه تفاوت معني‌داري دارد. در مطالعه مبلي و همكاران (٤) نيز به طور كامل از ساير رقم هاي جدا شد و در يک گروه مستقل قرار گرفت. در گروه اول رقم 'آمفي‌سيس' و 'كرونايكي' داراي صفات رويشي (طول و عرض برگ, سطح برگ, طول دمبرگ, طول شاخه‌ها, طول ميانگره, ارتفاع درخت, قطر تنه) مشابه بودند و رقم 'كرونايكي' و 'روغني' از نظر طول دمبرگ, طول ميانگره, قطر تنه و قطر تاج اختلاف معني‌داري با يكديگر نداشتند. اكثر رقم هاي 'يوناني' در گروه اول قرار گرفتند كه در اين رقم ها، 'والانوليا' و 'كرونايكي' و 'آمفي‌سيس' داراي طول پهنك و نسبت طول پهنك به عرض, طول شاخه يكساله، قطر تنه و قطر تاج شبيه هم هستند. در گروه دوم كه بيشتر رقم ها، ايراني و اسپانيايي مي‌باشند. رقم هاي 'زرد' و 'دزفول' از نظر بيشتر صفات رويشي شبيه هستند (٤) و همان‌طور كه در دندروگرام مشاهده مي‌شود اين دو رقم در تشابه زيادي (۶۸%) با يكديگر داشتند (شكل ۲). رقم هاي 'مانزانيلا' و 'سويلانا' نيز كه هر دو اسپانيايي بودند و در گروه دوم قرار گرفتند، از نظر كليه صفات رويشي گزارش شده توسط مبلي و همكاران (٤) مشابهت دارد. همچنين اين دو رقم از نظر طول پهنك، نسبت طول به عرض برگ, سطح برگ, طول ميانگره و قطر تاج با رقم زرد كه در همين گروه مي‌باشد، داراي اختلاف معني‌داري نمي‌باشند (٤).

۱- Resta

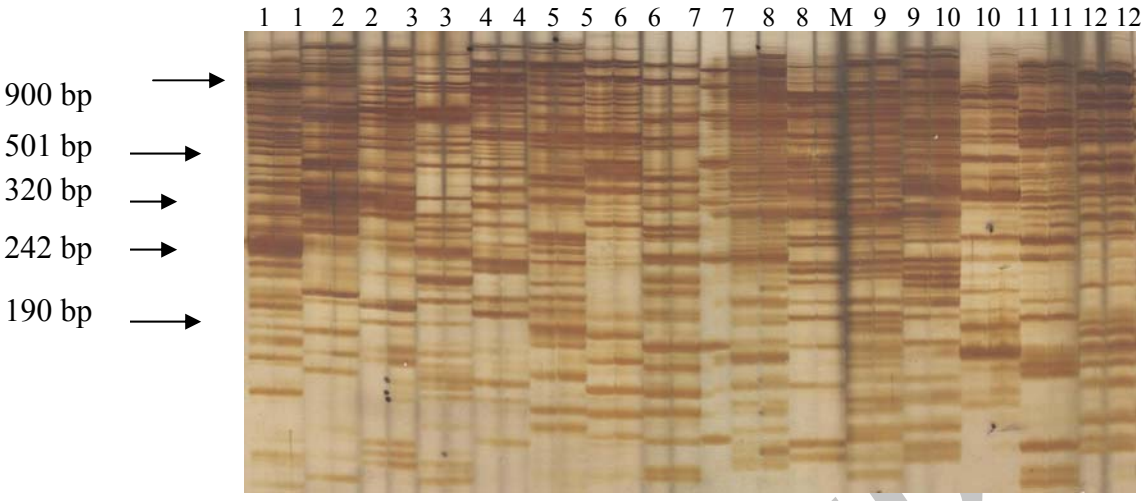


Fig. 1. Banding pattern of M21 and P2 primers in 15 studied olive cultivars

شكل١- الگوي نواري حاصل از تركيب آغازگري P2 و M21 روي ١٥ رقم زيتون مورد مطالعه.

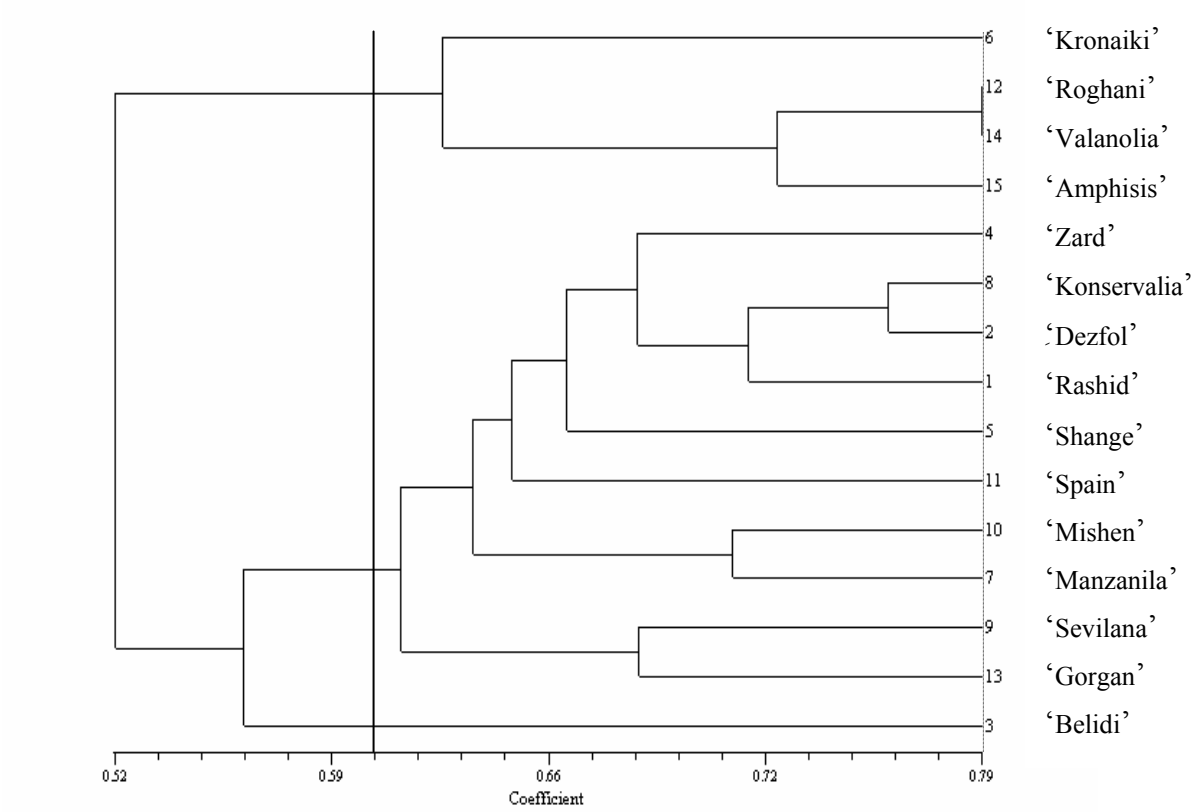
M: نشانگر انـدازه VIII، ١- ’رشيد‘، ٢- ’دزفـول‘، ٣- ’بليـدي‘، ۴- ’زرد‘، ۵- ’شـنگه‘، ۶- ’كرونـايكي‘، ٧- ’مـانزانيلا‘، ٨- ’كنـسروواليا‘، ٩- ’سـويلانا‘، ١٠- ’ميـشن‘، ١١- ’اسـپانيا‘، ١٢- ’روغنـي‘، ١٣- ’گرگـان‘، ١۴- ’والانوليـا‘، ١۵- ’آمفيسيس‘.

1. ‘Rashid’, 2. ‘Dezfol’, 3. ‘Beleidi’, 4. ‘Zard’, 5. ‘Shenge’, 6. ‘Cronaik’, 7.‘manzanila’, 8. ‘Conservalia’, ‘M- ladder XIII’, 9. ‘Sevilana’, 10. ‘Mishen’, 11. ‘Spania’, 12. ‘Roghani’, 13. ‘Gorgan’, 14. ‘Valanolia’, 15. ‘Amphisis’.

جدول٣- تعداد نوارهاي تك و چندشكل، كل نوارها و درصد چندشكلي مـشاهده شـده در رقـم هـاي زيتـون مـورد بررسي.

Table 3- Number of polymorphic bands, total bands and polymorphism percents in olive cultivars used.

درصد چندشكلي Polymorphic %	تعداد كل نوار Total bands	تعداد نوار چندشكل No. of polymorphic bands	تعداد نوار تك شكل No. of monomorphic bands	نام آغازگر Primer name
97.1	69	67	2	P1/M24
95.5	67	64	3	P2/M24
98.6	72	71	1	P3/M24
97.3	76	74	2	P1/M21
97.1	104	101	3	P2/M21
97	67	65	2	P3/M21
96.4	84	81	3	P4/M25
98.6	75	74	1	P5/M25
96.2	81	78	3	P6/M25
	695	675	20	مجموع Sum
97	77.22	75	2.2	ميانگين Mean



شكل۲-گروه‌بندي ۱۵ رقم زيتون با استفاده از ضريب تشابه SM و بر اساس الگوريتم UPGMA.

Fig. 2. Dendogram of 15 olive cultivars using SM similarity coefficient based on UPGMA algoritm.

بررسي نتايج نشان داد كه در برخي موارد بررسي‌هاي مولكولي داده‌هاي مورفولوژيك را تاييد نمي‌نمايند. براي مثال رقم هاي 'روغني' و 'والانوليا' با وجود شباهت ژنتيكي بالا (۷۹%)، از نظر مورفولوژيك شباهت چنداني با يكديگر نداشتند (٤). همچنين رقم هاي 'كنسروواليا' و 'دزفول' با شباهت ژنتيكي ۷٦%، در صفات مورفولوژيكي متفاوت مي‌باشند (٤). مطالعه طالبي بداف و همكاران (۱) نيز در بررسي تنوع ژنتيكي گونه‌هاي علف‌هاي چمني با استفاده از نشانگر AFLP در برخي موارد، گروه‌بندي مولكولي را با داده‌هاي مورفولوژيكي منطبق ندانستند. مطالعه رولند-رويز[1] و همكاران (۱۵) در مقايسه نشانگرهاي مولكولي و نشانگرهاي مورفولوژيك روي چاودار و مارتينز[2] و همكاران (۹) در ارزيابي تنوع ميان گونه‌هاي مختلف انگور نيز اين نتيجه را تاييد مي‌نمايد. مطالعات گذشته نشان داده كه نشانگرهاي مولكولي مانند AFLP قادر به ارزيابي هر بخشي از ناحيه ژنومي مي‌باشند، اين درحالي است كه تنها ۱-۲% ژنوم بيان شده و همراه با تاثير محيط صفات مورفولوژيك را به وجود مي‌آورند (۸). افزون بر اين برخي از تغييرات بعد از رونويسي و توارث غيرهسته‌اي سبب عدم تطبيق نشانگرهاي مورفولوژيك با نشانگرهاي مولكولي مي‌گردد (۸). بنابراين اين دو نشانگر در همه موارد نتايج يكساني ندارند.

۱- Roland-Ruiz ۲- Martinez

در دندروگرام حاصل از اين پژوهش بيشتر رقم هاي ايراني (’زرد‘، ’دزفول‘، ’رشيد‘ و ’شنگه‘) در كنار هم و در نزديک رقم هاي اسپانيايي (’اسپانيا‘، ’مانزانيلا‘ و ’سويلانا‘) قرار گرفتند (شكل ۲) كه نشان‌دهنده منشا احتمالي يكسان آن‌ها مي‌باشد. نتايج اين پژوهش با نتايج كوهي و همكاران (۳) كه از۲۰۳ نشانگر ISSR در بررسي تنوع ژنتيكي همين رقم هاي استفاده نمودند. مطابقت داشت. در مطالعه اين پژوهشگران، رقم هاي ايراني و اسپانيايي در يک گروه قرار گرفتند و منشا احتمالي بيشتر رقم هاي ايراني از اسپانيا معرفي شد. رقم بليدي نيز درمطالعه كوهي و همكاران (۳) با فاصله ژنتيكي زيادي از ساير رقم هاي جدا گشت كه با نتيجه اين پژوهش مطابقت داشت. نتايج اين مطالعه نشان داد كه اكثر رقم هاي ايراني (’رشيد‘، ’زرد‘، ’دزفول‘، ’روغني‘ و ’شنگه‘) در مجموع ويژگي هاي ژنتيكي و مورفولوژيكي مشابهي دارند ولي در رقم گرگان به‌سبب تفاوت ژنتيكي و مورفولوژيكي با ساير رقم ها، منشا احتمالي متفاوتي فرض شده است. با توجه به تاثير افزايش تعداد نشانگرها و نوع نشانگر در افزايش اطمينان از طبقه‌بندي‌ها، نتايج نشانگر AFLP مي‌تواند تاييدي بر نتايج پژوهشگران قبلي باشد. از آنجا كه نشانگر SSR افزون بر چند شكلي بالا، در مطالعه روابط آللي و تكاملي نژادگان‌ها به كار مي‌رود ضروري به نظر مي‌رسد كه در مطالعات بعدي از اين نشانگر نيز استفاده شود تا با اطمينان بالاتر خويشاوندي رقم هاي خارجي و ايراني و منشاء تكاملي آن ها تعيين شود.

منابع REFERENCES

۱. طالبي بداف، م.، ب. ا. سيد طباطبايي، خ. رزمجو و ب. شيران. ۱۳۸۵. تنوع ژنتيكي درون وبين گونه‌هاي علف‌هاي چمني چند ساله با استفاده از نشانگر مولكولي AFLP . مجله علوم وفنون كشاورزي و منابع طبيعي .۴۰-۲۹ :(۲)۱۰.

۲. طباطبايي, م. ۱۳۷۴. زيتون و روغن آن. چاپ اول. انتشارات صندوق مطالعه و توسعه كشت زيتون. ۴۰۰ ص.

۳. كوهي، م.، م. رحيم ملک, ب. ا. سيد طباطبايي, ب. باني نسب و م. مبلي. ۱۳۸۵. بررسي نزديكي ژنتيكي برخي از رقم هاي زيتون ايراني و خارجي با استفاده ازنشانگرهاي مولكولي ISSR .مجله علوم و فنون باغباني ايران. ۹۳-۱۰۲: (۲) ۷

۴. مبلي، م.، ب. باني‌نسب و ا. دهداري. ۱۳۸٤. بررسي تنوع ژنتيكي و گروه‌بندي برخي رقم هاي زيتون بر اساس صفات رويشي. خلاصه مقالات چهارمين كنگره علوم باغباني ايران. دانشگاه فردوسي مشهد. ص ۱۲۲.

5. Bassam, B.J., G. Gaetano-Anolles and P.M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in poly acrylamide gels. Anal. Biochem. 19:680-683.
6. Belaj, A., Z. Satovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo and I. Trujillo. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theor. Appl. Genet. 107:736-744.
7. Grati-kamoun, N., F. Mahmoud, A. Rebai, A. Gargouri, O. Panaud, A. Saar. 2006.

Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. Genetic Res. Crop Evolution 53:256-275.

8. Gupta P.K. and S. Rustgi 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of genome in higher plants, Funct, Integr. Genom 4:139–162
9. Martinez L., P. Cavagnaro, R.M. Asuelli and J. Rodriguez 2003 Evaluation of diversity among Argentina grapevine (*Vitis vinifera*) varieties using morphological data and AFLP markers. Elect. J. Biotech 6:241-250
10. Montemurro, C.R. Simeone, A. Pasqualone, E. Ferrar and A. Blanco. 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. J. Hort. Sci. Biotech. 80:105-110.
11. Murray, M.G. and W.F Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.
12. Omrani-Sabbaghi, A., M. Shahriari, M. Falahati-Anbaran, S.A. Mohammadi, A. Nankal, M. Mardi and B. Ghareyazie. 2006. Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. Sci. Hort. 112:439-447.
13. Owen, C.A., E.C. Bita, G. Banilas, S.E. Hajjar, V. Sellianakis, U. Aksoy, S. Hepaksoy, R. Chamoun and S. N. Talhook. 2004. AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. TAG. 110:1169-1176.
14. Resta, P., C. Lotti, G. Fanizza, A. Godini, R. Mariani and M. Palasciano. 2004. Use of AFLP to characterize Apulian olive varieties (*O. europaea L.*). Acta Hort. 586: IV International Symposium on Olive Growing.
15. Roland-ruiz I.F, Van Eeuwijk A., Gilliland T.J. 2001.A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theor. Appl. Genet. 103:1138-50.
16. Samaee, S.M., Z.S. Shobbar, H. Ashrafi and Hosseini- Mazinani. 2003. Molecular characterization of olive germplasm in Iran by use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): Correlation with phenotypic studies. Acta Hort. 623:169- 175.
17. Sanz-Cortes, I., D.E. Parfitt and C. Ramero. 2003. Interaspecific Olive Diversity Assessed with AFLP. Plant Breeding 122:173-177.
18. Sensi, E., R. Vignani,. M. Scali, E. Masi and M. Cresti. 2003. DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of Olea europaea L. estimated by AFLP analysis. Sci. Hort. 97:379-388.

19. Vos, P., R. Hogres, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frilters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M.Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA finger printing. Nucleic Acid Res. 23:4407-4414.