

Genetic Analysis of Some Genotypes and Varieties of Olive in Qom Province Using Morphological and ISSR Markers

Fereshteh Hosseini Gheydari¹ and Zahra Tahernezhad^{2*}

1- M.Sc. Graduate of Horticulture, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran

2- *Corresponding Author: Ph.D Graduate of Biometrical Genetic, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran (z_tahernezhad@znu.ac.ir)

Received: 15 October, 2017

Accepted: 3 October, 2018

Abstract

Background and Objectives

Olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most ancient tree crops which has been domesticated in the Middle East for about 6000 years. The romans enlarged its cultivation from the Greek islands throughout the Mediterranean basin, mainly along the African and European coasts as well as in the areas where large volumes of water have improved the climate. In the past, cultivar distinguishing approaches were based on morphological characteristics of leaf, fruit and stone. Recently, morphological traits with isozyme and DNA- based markers have been applied to the classification of cultivars. The aim of this study was the evaluation of morphological and molecular similarities between the new and the known cultivars of olive trees in the Fadak garden in Qom province in Iran.

Materials and Methods

In order to analyze genetic variations of olive tree genotypes in Qom province, the olive genotypes (Manzanilla, Sevilana, Mahzam, Arbequina, and Conservalia) and two superior cold resistant genotypes (Fadak and Tooba) were studied using morphological traits based on distinctness, uniformity and stability (DUS) guideline in the Fadak garden (Qom province, Iran) in 2013. In addition, a total genomic DNA was extracted from the leaves, and the PCR was carried out by a set of six inter simple sequence repeats (ISSR) markers for amplification. Then, amplification products from ISSR primer tests were characterized on 2% agarose gels immersed in 1X TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide. The PCR fragments were scored for the presence or absence as 1 and 0, respectively.

Results

In this study, analysis of variance was performed on 12 quantitative traits. Results showed there were significant differences ($p < 0.01$, $p < 0.001$) between all the traits and Fadak and Tooba separated from other genotypes by comparing the means of the tests (Duncan multiple range method). According to the biplot graph (the first two components) in the PCA method by quantitative traits, Arbequina, Manzanilla and Tooba were included in one group, and Fadak and Tooba were distinctly separated from other genotypes. Also, according to the biplot graph (the first two components) in the PCA method by qualitative traits, the distance between Fadak and Tooba was low. In the molecular analysis, all ISSR markers (six primers) showed polymorphism. The total band range was 8-21 (with 14.66 as the average) and the PIC varied from 0.231 to

0.447 (0.309 average). Based on the PCA method, Tooba was utterly separated from other genotypes.

Discussion

In this study, Fadak and Tooba were completely different from other varieties using morphological traits and ISSR molecular markers. Fadak was found to be similar to Sevilana and Conservalia. There was a high similarity between Fadak and Tooba. Also, no similarity was observed between the results of morphological and molecular traits.

Keywords: PCA, Qualitative traits, Quantitative traits, Variance

بررسی تنوع ژنتیکی دو ژنوتیپ برتر زیتون استان قم در مقایسه با برخی ارقام تجاری موجود در باغ فدک این استان با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای ISSR

فرشته حسینی قیداری^۱ و زهرا طاهرنژاد^{۲*}

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد باغبانی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج، ایران

۲- *نویسنده مسئول: دانش‌آموخته دکتری ژنتیک بیومتری، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج، ایران (z_tahermezhad@znu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۳

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام زیتون استان قم، دو ژنوتیپ برتر استان قم از نظر مقاومت به سرما (فدک و طوبی) به همراه پنج رقم زیتون تجاری (مانزانیلا، سویلانا، آربکین، کنسروالیا و محزم) در باغ فدک قم در سال ۱۳۹۲ با استفاده از صفات مورفولوژیکی و مولکولی، مطالعه شدند. در این تحقیق تجزیه واریانس برای ۱۲ صفت کمی انجام گرفت و اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح ۱٪ درصد برای همه صفات مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که ژنوتیپ‌های فدک و طوبی از سایر ژنوتیپ‌ها متمایز شدند. در نمودار دو بعدی به دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات کمی، ژنوتیپ آربکین، مانزانیلا و سویلانا و طوبی در یک گروه قرار گرفتند و ژنوتیپ فدک و طوبی کاملاً از هم تفکیک شدند. همچنین در نمودار دو بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس داده‌های صفات کیفی، ارقام طوبی و فدک در فاصله بسیار کمی از هم قرار گرفتند. در بررسی مولکولی، تمامی آغازگرهای ISSR (شش آغازگر) چند شکلی بسیار زیادی را نشان دادند. تعداد کل باندهای تولیدشده دارای دامنه ۸ تا ۲۱ باند (میانگین ۱۴/۶۶ باند) و محتویات اطلاعات پلی‌مورفیسم (PIC) دارای دامنه ۰/۲۳۱ تا ۰/۴۴۷ (میانگین ۰/۳۰۹) بود. بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز ژنوتیپ طوبی از سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کاملاً تفکیک گردید. طبق این تحقیق، نتایج صفات مورفولوژیکی و مولکولی همخوانی زیادی با هم نداشتند.

کلیدواژه‌ها: صفات کمی، صفات کیفی، واریانس، PCA

مقدمه

باغ‌ها بلکه از نظر شناسایی روابط خویشاوندی برای دستیابی به ارقام جدید اقتصادی و مطابق با نیازهای روز اهمیت زیادی دارد. بنابراین طراحی هرگونه برنامه به‌نژادی و ایجاد باغ‌ها با ارقام موردنظر و گواهی شده مستلزم شناسایی ویژگی‌های اختصاصی هر رقم است. در گذشته، روش‌های شناسایی ارقام مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیکی برگ، میوه و هسته استوار بود. ولی استفاده از صفات مورفولوژیکی به‌تفاهیم برای شناسایی ارقام به دلیل شرایط محیطی به‌ویژه بر روی برگ زیتون، وجود اثر

زیتون (*Olea europaea* L.) یکی از قدیمی‌ترین محصولات درختی است که حدود ۶۰۰۰ سال پیش در منطقه شرق مدیترانه اهلی شده است (Zohary and Hopf, 1994). کشت این گیاه از جزایر یونان در طول حاشیه مدیترانه به‌ویژه در طول سواحل آفریقایی و اروپایی، جایی که آب فراوان باعث بهبود آب و هوا می‌شود، توسط رومی‌ها توسعه داده شد (Cipriani et al., 2002).

تعیین منشأ ژنتیک ارقام نه تنها از جنبه‌های احداث

غالبیت و اپیستازی، عدم تظاهر صفات در مراحل اولیه نمو، کم بودن و یا محدودیت صفات قابل اندازه گیری و صرف مدت زمان طولانی کافی نیست. امروزه برای طبقه بندی ارقام همراه با صفات مورفولوژیکی، از نشانگرهای آیزوزایمی و روش های مولکولی مبتنی بر DNA مانند RAPD، SSR و AFLP، ISSR و RFLP استفاده می شود (Ghareyazi, 2001). (Abdali et al. 2011). صفات مورفولوژیکی چهار رقم زیتون شمال کشور شامل ارقام ماری، زرد، فیشمی و خرما زیتون را مورد بررسی قرار دادند. سپس از نشانگر RAPD جهت بررسی دقیق تر این ارقام و تعیین میزان چندشکلی آن ها استفاده نمودند. 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 طبقه بندی گردید. (Noormohammadi et al. 2012). در مطالعات خود به بررسی تنوع ژنتیکی چهار جمعیت از زیتون وحشی (*O. europaea ssp cuspidate*) در حال رشد هرمزگان با استفاده از دو نشانگر RAPD و ISSR پرداختند که اختلاف معنی داری در این بررسی ها به دست آمد. (Atji et al. 2013). سازگاری ۱۴ رقم زیتون تجاری آزمایشی را در ایستگاه تحقیقات زیتون دالاهو بررسی کردند که ارقام کنسروالیا و سویلانا برای تولید میوه کنسروی بهترین رقم برای منطقه شناخته شدند. (Padula et al. 2008). عملکرد میوه، اندازه میوه، نسبت گوشت به هسته و درصد روغن میوه را در ۱۳۴ ژنوتیپ زیتون در سه منطقه مرکز و جنوب ایتالیا بررسی کردند و در نهایت ۲۱ ژنوتیپ را به عنوان ارقام امیدبخش برای دستیابی به ارقام جدید معرفی کردند. (Zare Rashnodi et al. 2019). در مطالعه ژنوتیپ های گردو با استفاده از نشانگرهای ISSR، سطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی را گزارش و اظهار کردند که نتایج به دست آمده با استفاده از این نشانگرها اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ ها را فراهم می کند. هدف از این تحقیق بررسی میزان تشابه مورفولوژیکی و مولکولی ارقام جدید زیتون در مزرعه فدک با ارقام رایج

و شناخته شده بود.

مواد و روش ها

صفات ریخت شناسی

دو ژنوتیپ طوبی و فدک همراه با پنج رقم تجاری (آربکین، مانزانیلا، سویلانا، محزم، کنسروالیا) به صورت طرح آزمایشی بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه فدک واقع در استان قم (۳۳/۶۶° شمالی ۵۰/۸۸° شرقی، ارتفاع از سطح دریا: ۹۳۰ متر) بر اساس دستورالعمل ملی تمایز، یکنواختی و پایداری (DUS) مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در سال ۱۳۹۲ مورد ارزیابی قرار گرفتند. یادداشت برداری از هر درخت از چهار جهت و در شش مرحله از فروردین ماه تا آبان ماه انجام شد. پس از اندازه گیری و ارزیابی ۱۲ صفت کمی و ۴۹ صفت کیفی (قدرت رشد، حالت شاخه، میزان تراکم، رنگ شاخه های بارده، تراکم شاخه جانبی کوچک در شاخه های بارده، شکل برگ، براق بودن برگ، رنگ سطح رویی برگ، رنگ سطح زیرین برگ، خمیدگی محور طولی پهنک برگ، پیچ خوردگی برگ، وجود برگ های غیرطبیعی، شکل برگ های غیرطبیعی، ساختار گل آذین، انشعابات گل آذین، وجود گل های جانبی گل آذین، اندازه غنچه، شکل میوه، آشکار بودن رگه میوه، رنگ میوه، عدسک میوه، اندازه عدسک، تقارن میوه در موقعیت A، تقارن میوه در موقعیت B، موقعیت بزرگترین قطر میوه، شکل نوک میوه در موقعیت A، شکل نوک میوه در موقعیت B، نوک تیز بودن میوه، موقعیت اثر جای مادگی در میوه، شکل ته میوه در موقعیت A، شکل ته میوه در موقعیت B، شکل فرو رفتگی محل اتصال دم میوه، شکل مقطع عرضی میوه، شکل هسته در موقعیت A، شکل هسته در موقعیت B، تقارن هسته در موقعیت A، تقارن هسته در موقعیت B، شکل مقطع عرضی هسته، موقعیت بزرگترین مقطع عرضی هسته، وجود شیار در هسته، توزیع شیارها در هسته، توزیع شیارها در قسمت پایینی هسته، شکل نوک هسته در موقعیت A، شکل نوک هسته در موقعیت B، نوک تیز بودن هسته، شکل قسمت

۲ ساعت با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید از هم جدا شدند. سرانجام قطعات تکثیری از هم تفکیک شده بر روی ژل، به صورت وجود و عدم وجود (به ترتیب یک و صفر) امتیاز داده شدند. محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، قدرت تبیین (Rp)، ضرایب تشابه و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی توسط نرم‌افزارهای NTSYSpc v2.02 و Excell انجام شد.

نتایج و بحث

صفات ریخت‌شناسی

بعد از نرمال کردن داده‌ها به روش لگاریتم، تجزیه واریانس برای ۱۲ صفت کمی اندازه‌گیری شده بر روی هفت ژنوتیپ زیتون انجام شد. نتایج نشان‌دهنده اختلاف بسیار معنی‌داری بین ارقام در سطح یک درصد برای همه صفات کمی بود (جدول ۲). پس از انجام مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، مشخص شد که ژنوتیپ‌های فدک و طوبی از نظر صفات نسبت گوشت میوه به هسته میوه، قطر میوه، طول هسته، قطر هسته، طول و عرض برگ، نسبت طول برگ به عرض برگ و نسبت درصد روغن به وزن خشک کل میوه با هم و با سایر ارقام اختلاف معنی‌دار داشتند. اما این دو ژنوتیپ در صفات طول میوه، عرض فرورفتگی محل اتصال دم میوه، طول دم‌برگ و نسبت درصد روغن به گوشت میوه با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۳).

PIC = $\sum [2 P_i (1 - P_i)]$ (Botstein *et al.*, 1980)

Pi: فراوانی آلل نام

پایینی هسته در موقعیت A، شکل قسمت پایینی هسته در موقعیت B، عمق درز برچه‌ها در هسته و انحنای درز برچه‌ها در هسته)، تجزیه‌های آماری مانند تجزیه واریانس، تجزیه همبستگی و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ((Principle Component Analysis (PCA)) روی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS و Minitab انجام شد.

نشانه‌های مولکولی

استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن از برگ همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی به روش Dellaporta *et al.* (1983) صورت گرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر قطعات با استفاده از شش آغازگر ISSR Eurofins (Martins-Lopes *et al.*, 2007) ساخت شرکت MWG Opern آلمان (جدول ۱) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (۵۰ ng/μl DNA، ۱X PCR Buffer، ۰/۳۶ mM dNTPs، ۲/۵ mM Taq DNA polymerase U، ۰/۳۶ mM dNTPs، ۲/۵ و آغازگر ۱۰ μm) انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت یک چرخه واسرشته‌سازی (Denaturing) اولیه DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۴۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها (۵۶-۵۰ سانتی‌گراد) به مدت ۴۵ ثانیه و بسط (Extention) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در آخر چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس قطعات تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنوم گیاه زیتون

Table 1. ISSR primers used for evaluation of genome diversity in olive

ردیف	آغازگر	توالی (۵'→۳')	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
No.	Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)
1	UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAT	50
2	UBC 841	GAGAGAGAGAGAGACTC	56
3	UBC 826	ACACACACACACACC	52
4	UBC817	CACACACACACACAA	50
5	UBC 834	AGAGAGAGAGAGAGGCTT	54
6	UBC 855	ACACACACACACACCTT	54

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات کمی ژنوتیپ‌های زیتون مطالعه شده
Table 2. Variance Analysis of quantitative traits of olive genotypes

میانگین مربعات Mean Square													درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V	
گوشت میوه/درصد روغن Oil (%) /Fruit Flesh	وزن خشک کل میوه/درصد روغن Oil (%) /Fruit Dry Weight	هسته میوه/گوشت میوه Fruit Stone / Fruit Flesh	طول میوه Fruit length	قطر میوه Fruit width	عرض فرورفتگی محل اتصال دم میوه Surface of fruit bloom	طول هسته Stone length	قطر هسته Stone width	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	طول دم برگ Petiole length	عرض برگ/طول برگ Leaf length/ Leaf width				
13.19	10.49	11.8	12.46	10.91	11.92	10.37	10.24	22.28	8.59	3.22	11.28	2	تکرار Replication		
473.88**	47.67**	91.94**	11.78**	17.49**	24.72**	78.06**	110.47**	19.14**	35.13**	5.01**	67.16**	6	تیمار Treatment		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	خطا Error		
1.94	1.58	8.21	3.5	8.3	11.52	2.77	1.16	7.52	11.47	12.63	5.99		ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)		

** . significant at 1% probability level:

** معنی دار در سطح یک درصد.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات کمی به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در هفت ژنوتیپ زیتون
 Table 3. Mean comparison of traits according to Duncan multiple range test in seven olive genotypes

میانگین Mean												نمبر
گوشت میوه/درصد روغن Oil (%) /Fruit Flesh	وزن خشک کل میوه/درصد روغن Oil (%) / Fruit Dry Weight	عرض برگ/طول برگ Leaf length/ Leaf width	طول دم برگ Petiole length	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	قطر هسته Stone width	طول هسته Stone length	عرض فرو رفتگی محل اتصال دم میوه Surface of fruit bloom	قطر میوه Fruit width	طول میوه Fruit length	هسته میوه/گوشت میوه Fruit Stone / Fruit Flesh	Treatment
27.68 ^{bc}	49.31 ^b	5.455 ^b	0.498 ^c	0.896 ^c	4.815 ^b	8.764 ^c	17.598 ^{ab}	3.673 ^{bc}	13.756 ^c	23.734 ^b	2.157 ^e	طوبی Tooba
27.58 ^{bc}	46.35 ^{cd}	4.803 ^c	0.502 ^c	1.071 ^c	5.082 ^b	6.89 ^e	11.364 ^e	3.149 ^c	13.644 ^c	22.8 ^b	3.41 ^d	آربکین Arbequina
16.72 ^e	41.88 ^e	5.184 ^{bc}	0.616 ^{bc}	1.082 ^c	5.504 ^b	8.044 ^d	15.936 ^c	3.864 ^b	17.073 ^b	24.085 ^b	7.124 ^b	مانزانیلا Manzanilla
20.33 ^d	45.31 ^d	4.986 ^c	0.712 ^{ab}	1.124 ^c	5.554 ^b	8.043 ^d	15.45 ^{cd}	3.811 ^b	19.017 ^{ab}	23.341 ^b	8.097 ^b	سویلانا Sevilana
26.81 ^c	51.12 ^a	7.448 ^a	0.578 ^{bc}	0.934 ^c	6.991 ^a	8.525 ^c	18.027 ^a	8.254 ^a	20.69 ^a	27.019 ^a	10.894 ^a	محزم Mahzam
36.9 ^a	47.003 ^c	5.463 ^b	0.767 ^a	1.399 ^b	7.33 ^a	10.812 ^a	16.945 ^b	8.054 ^a	21.303 ^a	26.987 ^a	7.354 ^b	کنسروالیا Conservalia
28.25 ^b	46 ^{cd}	4.647 ^c	0.643 ^{abc}	1.67 ^a	7.684 ^a	10.129 ^b	15.047 ^d	4.029 ^b	20.732 ^a	23.453 ^b	5.598 ^c	فدک Fadak

حروف مشترک در هر ستون بیانگر نبود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها ($p < 0.05$) است.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at ($p < 0.05$).

تجزیه همبستگی به روش پیرسون بین صفات کمی انجام شد. بیشترین همبستگی مثبت و معنی دار بین طول میوه و عرض رورفتگی محل اتصال دم میوه (۰/۸۶۴) بود. عرض برگ و طول برگ نیز همبستگی مثبت و معنی دار زیادی (۰/۷۷۵) با هم داشتند. کمترین همبستگی مثبت و معنی دار بین نسبت درصد روغن به وزن خشک کل میوه با طول میوه (۰/۴۴۲) به دست آمد (جدول ۴). بنابراین افزایش طول میوه تاثیر زیادی بر روی افزایش درصد روغن به وزن خشک کل میوه ندارد ولی با افزایش طول میوه، عرض رورفتگی محل اتصال دم میوه به طور معنی داری افزایش می یابد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر اساس ۱۲ صفت کمی اندازه گیری شده انجام شد و نتایج نشان داد که سه مؤلفه اول ۸۸/۱ درصد از کل واریانس را به خود اختصاص دادند. مؤلفه اول با ۴۹/۲ درصد از کل واریانس با صفات طول و قطر میوه، بیشترین همبستگی را داشت. بنابراین مؤلفه اول، مؤلفه ابعاد میوه است. مؤلفه دوم با ۲۴/۸ درصد از کل واریانس، با نسبت طول برگ به عرض برگ بیشترین همبستگی را داشت. بنابراین مؤلفه دوم، مؤلفه نسبت ابعاد برگ (اندازه برگ) است. مؤلفه سوم نیز با ۱۴/۱ درصد از کل واریانس با درصد روغن، بیشترین همبستگی را داشت. در نتیجه مؤلفه سوم، مؤلفه درصد روغن است (جدول ۵). در تحقیقی که در ایتالیا انجام شد، مشخص شد که صفاتی از قبیل طول و عرض میوه، وزن خشک میوه، شکل میوه و همچنین اندازه گل آذین و شکل تاج نقش مهمی در گروه بندی ارقام زیتون مورد مطالعه داشته و جزء صفات تأثیر گذار در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بودند (Cantini et al., 1999). در نمودار دوبعدی بر اساس دو مؤلفه اول ژنوتیپ‌های آرکین، مانزانیلا، طوبی و سویلانا در یک گروه قرار گرفتند. ژنوتیپ فدک از ژنوتیپ طوبی کاملاً متمایز شد (شکل ۱).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های صفات

کیفی نیز انجام شد؛ مؤلفه اول و دوم به ترتیب ۵۰/۱۱ درصد و ۲۶/۹۹ درصد از کل واریانس به خود اختصاص دادند که نمودار دوبعدی بر اساس این دو مؤلفه، رقم‌های سویلانا و مانزانیلا را از سایر ارقام جدا کرد. رقم کنسروالیا نیز از رقم‌های آرکین، طوبی، فدک، و محزم جدا شد. اما ارقام طوبی و فدک در این نمودار در فاصله بسیار کمی از هم قرار گرفتند؛ بنابراین ارقام طوبی و فدک از نظر صفات کیفی بررسی شده فاصله بسیار کمی با همدیگر دارند یا به عبارتی دیگر این دو رقم شباهت زیادی به هم دارند (شکل ۲). رقم محزم با صفات رنگ سطح رویی برگ و رنگ میوه از سایر ارقام جدا شد. رقم طوبی با صفات قدرت رشد گیاه و نوک تیز بودن میوه از پنج رقم باقی مانده دیگر جدا شد. در رقم طوبی نیز این صفات منحصربه فرد هستند. رقم آرکین با صفت حالت شاخه گیاه از چهار رقم باقی مانده جدا شد. رقم فدک با صفات حالت شاخه گیاه، شاخه جانبی کوچک (شاخه‌های بارده) ساختار گل آذین، شکل میوه از ارقام کنسروالیا، مانزانیلا، سویلانا جدا شد. صفات شاخه جانبی کوچک (شاخه‌های بارده)، ساختار گل آذین و شکل میوه تنها در رقم فدک مشاهده شد. رقم کنسروالیا، با صفات براق بودن برگ، ساختار گل آذین، خمیدگی محور طولی پهنک، موقعیت اثر جای مادگی، شکل نوک در موقعیت A هسته، شکل نوک در موقعیت B هسته، نوک تیز بودن هسته، از ارقام مانزانیلا، سویلانا، متفاوت بود. در نهایت، رقم مانزانیلا نیز از رقم سویلانا توسط صفات تراکم گیاه، طول میانگره شاخه‌های بارده، شاخه جانبی کوچک شاخه‌های بارده و انشعابات گل آذین جدا شد. ژنوتیپ طوبی و فدک نیز از نظر صفات قدرت رشد گیاه، رنگ شاخه‌های بارده، طول میانگره، شاخه‌های بارده، شاخه‌های کوچک شاخه‌های بارده، ساختار گل آذین، انشعابات گل آذین، نوک تیز بودن میوه، شکل میوه، نوک تیز بودن هسته باهم دیگر متفاوت بودند.

جدول ۴- مقدار همبستگی بین صفات کمی به روش پیرسون
Table 4. Correlation between quantitative traits by Pierson method

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	صفت Trait
											1	1
										1	0.600**	2
									1	0.612**	0.717**	3
								1	0.605**	0.864**	0.661**	4
							1	0.575**	0.423	0.646**	0.406	5
						1	0.524*	0.505*	0.658**	0.501*	0.14	6
					1	0.669**	0.27	0.582**	0.753**	0.429	0.447*	7
				1	0.775**	0.607**	-0.133	0.085	0.477*	-0.08	-0.003	8
			1	0.623**	0.638**	0.515*	0.228	0.446*	0.611**	0.296	0.412	9
		1	-0.108	-0.443*	0.217	0.028	0.603**	0.682**	0.327	0.725**	0.623**	10
	1	0.621**	-0.203	-0.21	0.181	0.172	0.424	0.479*	0.104	0.442*	0.066	11
1	0.529*	0.109	0.172	0.343	0.448*	0.637**	0.111	0.516*	0.248	0.451*	-0.132	12

(1) هسته میوه/گوشت میوه (Fruit stone / Fruit flesh)

(2) طول میوه (Fruit length)

(3) قطر میوه (Fruit width)

(4) عرض فرورفتگی محل اتصال دم میوه (Surface of fruit bloom)

(9) طول دم برگ (Petiole length)

(5) طول هسته (Stone length)

(10) عرض برگ/طول برگ (Leaf length/ Leaf width)

(6) قطر هسته (Stone width)

(11) وزن خشک کل میوه/درصد روغن (Oil (%))// Fruit dry weight

(7) طول برگ (Leaf length)

(12) گوشت میوه/درصد روغن (Oil (%))//Fruit flesh

(8) عرض برگ (Leaf width)

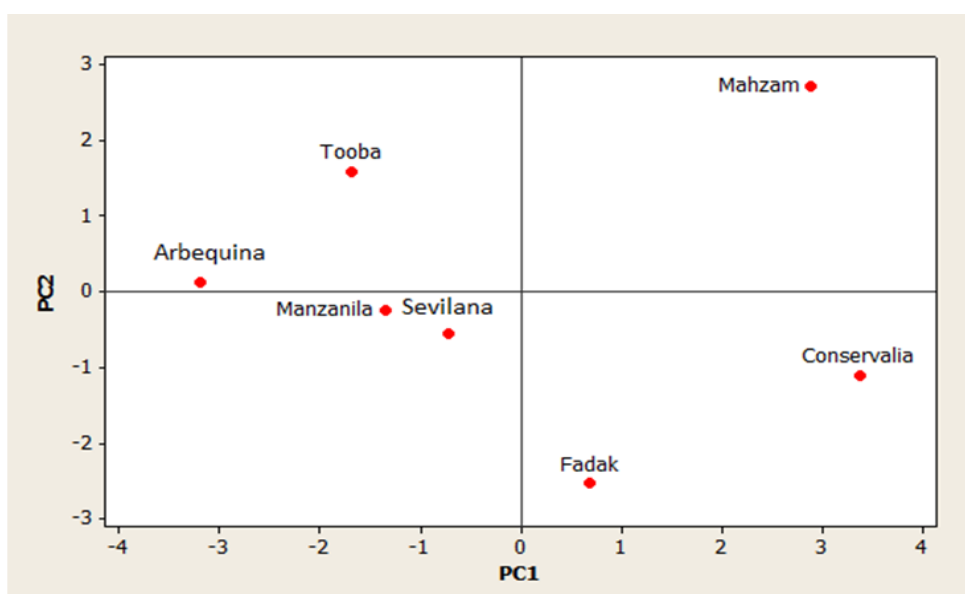
* and **: significant at 5% and 1% probability level, respectively.

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۵- مقدار همبستگی بین مؤلفه‌ها و صفات کمی در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

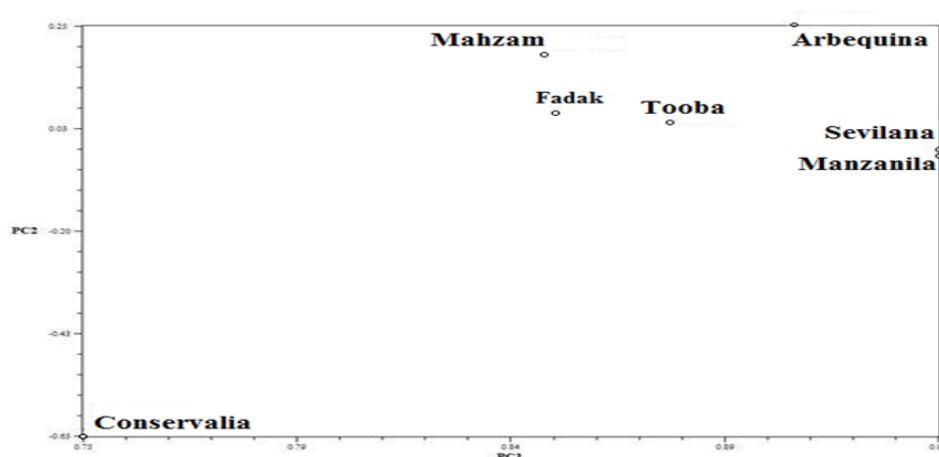
Table 5. Correlation between components and quantitative traits in PCA

مؤلفه سوم Third component (PC3)	مؤلفه دوم Second component (PC2)	مؤلفه اول First component (PC1)	صفت Trait
-0.501	0.095	0.288	هسته میوه / گوشت میوه Fruit stone / Fruit flesh
0.001	0.193	0.369	طول میوه Fruit length
-0.212	-0.185	0.364	قطر میوه Fruit width
0.025	0.167	0.38	عرض فرورفتگی محل اتصال دم میوه Surface of fruit bloom
-0.062	0.229	0.265	طول هسته Stone length
0.256	-0.253	0.31	قطر هسته Stone width
0.052	-0.224	0.349	طول برگ Leaf length
0.124	-0.519	0.138	عرض برگ Leaf width
-0.26	-0.328	0.254	طول دم برگ Petiole length
-0.088	0.456	0.239	عرض برگ / طول برگ Leaf length/ Leaf width
0.412	0.369	0.167	وزن خشک کل میوه / درصد روغن Oil (%)// Fruit dry weight
0.609	-0.063	0.217	گوشت میوه / درصد روغن Oil (%) / Fruit flesh



شکل ۱- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس صفات کمی

Figure1. Principal components analysis according to quantitative traits



شکل ۲- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس صفات کیفی

Figure 2. Principal components analysis according to qualitative traits

کمترین (۳/۴۶۵) MI بودند (جدول ۶). بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده، آغازگر UBC ۸۵۵ دارای قدرت تبیین و تفکیک بیشتری نسبت به سایر آغازگرهای استفاده شده است. در تحقیق (Martins-Lopes et al., 2007) برعکس نتایج تحقیق حاضر، آغازگر UBC ۸۵۵ توانایی بالایی در تفکیک ارقام زیتون نداشته و کمترین چندشکلی را در این ارقام نشان داده است و آغازگر UBC ۸۱۷ به عنوان موفق ترین آغازگرها در تفکیک ارقام معرفی شده است. این امر ناشی از تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی بین ارقام زیتون و تعداد ارقام مورد مطالعه بوده است.

نمودار دویبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر اساس داده‌های ISSR، ژنوتیپ طوبی را از سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه زیتون تفکیک کرد (شکل ۳).

تشخیص اصالت ژنتیکی هر درخت به منظور اجتناب از تکثیر اشتباه ارقام که می‌تواند خسارات زیادی را در صنعت باغبانی و همچنین در تحقیقات و برنامه‌های اصلاحی ایجاد کند، امری ضروری است. در تحقیق حاضر از نشانگرهای ISSR و برخی خصوصیات مورفولوژیکی برای تعیین اصالت ژنتیکی تعدادی از ارقام زیتون و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها استفاده شد. یک ژنوتیپ برتر زیتون با نام پیشنهادی طوبی از نظر مقاومت به سرما در مقایسه با پنج رقم تجاری کشور با نام‌های

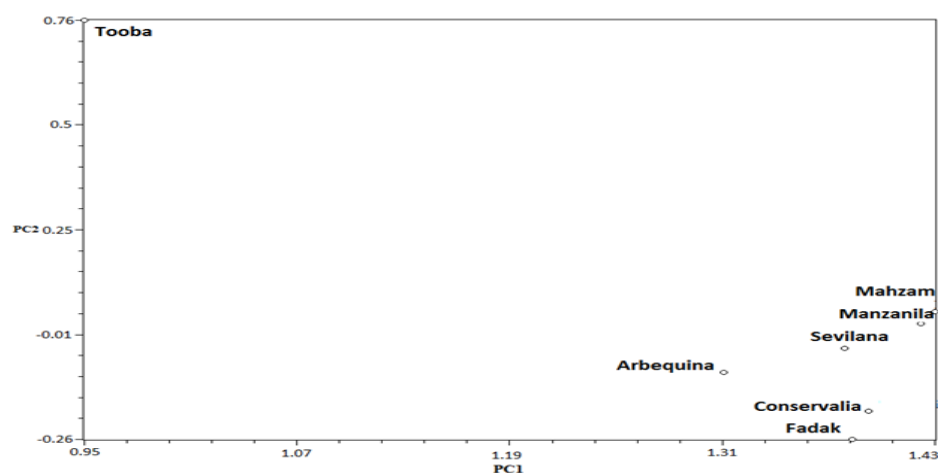
نشانه‌های ISSR

در این مطالعه، شش آغازگر ISSR استفاده شده برای تکثیر، دارای باندهای چند شکل زیادی بودند. تعداد باندهای تولید شده دارای دامنه ۸ تا ۲۱ باند با میانگین ۱۴/۶۶ باند بود. بیشترین باند تولید شده مربوط به نشانگر ۸۵۵ و کمترین باند تولید شده مربوط به نشانگر UBC ۸۱۷ بود. درصد چندشکلی در همه آغازگرها (به استثنای ۸۱۷ UBC و UBC ۸۵۵) ۱۰۰ و میانگین ۹۸/۷۲ بود. محتوی اطلاعات پلی مورفیسم (PIC) در این نشانگرها دارای دامنه ۰/۲۳۱ تا ۰/۴۴۷ با میانگین ۰/۳۰۹ بود. بیشترین PIC مربوط به نشانگر UBC ۸۱۷ (۰/۴۴۷) و کمترین PIC نیز مربوط به نشانگر UBC ۸۴۱ (۰/۲۳۱) بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر UBC ۸۱۷ بیشترین مقدار چندشکلی و نشانگر UBC ۸۴۱ کمترین مقدار چندشکلی را در هفت ژنوتیپ زیتون مورد بررسی نشان دادند. قدرت تبیین نشان دهنده میزان توانایی یک نشانگر برای تفکیک ژنوتیپ‌ها از همدیگر است. با استفاده از محاسبه قدرت تبیین (Rp) آغازگرها، آغازگر UBC ۸۵۵ دارای بیشترین (۸/۸۶) و آغازگر UBC ۸۱۷ دارای کمترین (۵/۱۴) Rp بودند. شاخص نشانگری (MI) نیز برای نشانگرهای مطالعه شده محاسبه گردید؛ که در این میان آغازگر UBC ۸۵۵ دارای بیشترین MI (۵/۲۷۱) و آغازگر UBC ۸۴۱ دارای

جدول ۶- محاسبه مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI)، قدرت تبیین، تعداد باندهای چند شکل و تعداد کل باندها برای شش نشانگر ISSR

Table 6. Polymorphism information content (PIC), MI, RP, number of polymorphism bands and total number of bands in ISSR primers

درصد چندشکلی polymorphism %	تعداد کل باندها No. of bands	تعداد باندهای چند شکل No. of polymorphism bands	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	شاخص نشانگری Marker Index (MI)	قدرت تبیین Resolving Power (RP)	آغازگر Primer
100	13	13	0.311	4.043	6	UBC810
100	14	14	0.352	4.928	7.14	UBC834
100	21	21	0.251	5.271	8.86	UBC855
100	15	15	0.231	3.465	6.28	UBC841
94.12	17	16	0.265	4.505	7.71	UBC826
87.5	8	7	0.447	3.576	5.14	UBC817
98.72	14.66	14.33	0.309	4.530	6.855	Mean



شکل ۳- نمودار دوعبدي حاصل از PCA بر اساس داده‌های ISSR
Figure 3. Principal components analysis by ISSR data

سایر ارقام مورد مطالعه می‌تواند ناشی از موتاسیون‌های سوماتیکی و تنوع درون ارقام باشد. (Trujillo *et al.*, 2014). گزارش‌های متعددی از موتاسیون‌های سوماتیکی که منجر به ایجاد تغییر و تنوع در ارقام مختلف درختان میوه نظیر انگور شده است، وجود دارد که از نظر تاریخچه انتشار، سیستم تکثیر و تنوع ارقام به زیتون شباهت دارند (Riaz *et al.*, 2002; This *et al.*, 2005). ردیابی تعداد زیادی موتاسیون سوماتیکی در زیتون می‌تواند ناشی از تکثیر رویشی مداوم ارقام بومی باشد که این امر می‌تواند باعث سازگاری بیشتر با شرایط محیطی گردد (Diaz *et al.*, 2006). به نظر می‌رسد این نوع ارقام از یک رقم مشترک

آریکین، کنسروالیا، سویلانا، محزم، مانزانیا و ژنوتیپ برتر فدک با استفاده از نشانگرهای ISSR در یک گروه کاملاً متمایز قرار گرفت. ژنوتیپ‌های طوبی و فدک طبق گزارش‌های باغداران در سال ۱۳۸۶ در مقابل سرما در مقایسه با سایر ارقام مقاومت نشان دادند. با توجه به خسارات سنگین سرمازدگی، شناسایی ارقام متحمل به سرما اهمیت اقتصادی بالایی دارد. این امکان وجود ندارد که ژنوتیپ‌های معرفی شده با نام‌های طوبی و فدک مترادف با ارقام دیگری باشند زیرا این دو ژنوتیپ از گروه نهال‌هایی حاصل شده‌اند که به‌عنوان ارقام زرد و روغنی تکثیر شده‌اند. تفاوت‌های ژنوتیپی رقم طوبی در مقایسه با

گیرد (Corrado *et al.*, 2009). در طبقه‌بندی سنتی درختان زیتون، استفاده توأمان داده‌های مولکولی و ریخت‌شناسی احتمالاً برای تفکیک توده‌های نمونه‌های نزدیک به هم در یک رقم، همچنین رفع مشکلات مربوط به تمایز نمونه‌ها و انتخاب کلون اهمیت دارد (Cantini *et al.*, 2008; Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق ژنوتیپ‌های فدک و طوبی، با استفاده از شش آغازگر ISSR، از سایر ارقام مورد مطالعه جدا شده و کاملاً مجزا از هم هستند. طبق بررسی صفات ریخت‌شناسی نیز این دو ژنوتیپ از دیگر نمونه‌ها کاملاً جدا شدند، ولی شباهت بین این دو ژنوتیپ به هم بسیار زیاد بود. ژنوتیپ برتر فدک رابطه نزدیکی با دو رقم سویلانا و کنسروالیا دارد. از آنجا که ژنوتیپ طوبی از شمال کشور به قم منتقل شده است، ممکن است این تفاوت ژنتیکی، ناشی از فاصله جغرافیایی این رقم با سایر ارقام باشد.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال با شماره مصوب ۹۲۱۰۷-۰۸-۰۸-۴ استخراج شده است که بدین وسیله تقدیر و سپاسگزاری به عمل می‌آید.

منشأ گرفته‌اند و ممکن است در اثر یک موتاسیون رویشی ایجاد شده باشند که همین امر منجر به ایجاد تغییرات مورفولوژیکی اساسی بدون ایجاد تغییر در نواحی ISSR تکثیر شده، می‌گردد (Trujillo *et al.*, 2014).

سطوح بالایی از چندشکلی با استفاده از نشانگرهای ISSR در ارقام تجاری زیتون ایران مشاهده شد که حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در بین ارقام مورد مطالعه بوده است که این یافته‌ها با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته در دنیا همخوانی دارد (Terzo Poulos *et al.*, 2005; Martins-Lopes *et al.*, 2007). نتایج گروه‌بندی با استفاده از صفات کمی و کیفی با گروه‌بندی حاصل از نتایج داده‌های مولکولی بسیار متفاوت و همپوشانی قابل توجهی نداشتند. نشانگرهای ریخت‌شناسی که کاربرد وسیعی دارند نتایج متفاوت از داده‌های مولکولی فراهم می‌کنند. همبستگی پایین نتایج ارزیابی‌های فنوتیپی و مولکولی ممکن است ناشی از تنوع بسیار بالا در DNA و سطح بالای هتروزیگوسیتی در زیتون باشد. این شرایط در سایر گیاهانی که به صورت هم‌گروه تکثیر می‌شوند نیز مشاهده می‌گردد. در مجموع لازم است از بین رقم‌های زیتون که شباهت فنوتیپی دارند، مطالعاتی با استفاده از نشانگرهای مولکولی به منظور تشخیص مواد گیاهی که آلل‌ها و یا QTL‌های مشابه دارند صورت

References

- Abdali, A., Hosseini-Mazinani, M., Ataei, S., Hosseini, S. M. and Naghavi, M. R. (2011). Studies on intra-cultivar variation of four Iranian olive cultivars using morphological characteristics and RAPD markers. *Iranian Journal of Biology*, 24(6), 868-879. [In Farsi]
- Arji, I., Zeynanlou, A. A., Hajiamiri, A. and Najafi, M. (2013). Evaluation of adaptability and vegetative and generative traits of some Olive cultivars under Sarpolezahab environmental condition. *Plant Productions*, 35(4), 17-28. [In Farsi]
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314-31.
- Cantini, C. and Cimato, A. (2008). Assessment of the Tuscan olive germplasm by microsatellite markers reveals genetic identities and different discrimination capacity among and within cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(4), 598-604.
- Cantini, C., Cimato, A. and Sani, G. (1999). Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*, 109(3), 173-181.

- Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A. and Testolin, R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical Applied Genetic*, 104(2-3), 223-228.
- Corrado, G., La Mura, M., Ambrosini, O., Pugliano, G., Vorricchio, P., Rao, R. (2009). Relationships of campanian olive cultivars: comparative analysis of molecular and phenotypic data. *Genome*, 52(8), 692-700.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19-21.
- Diaz, A., De la Rosa, R., Martin, A. and Rallo, P. (2006). Development characterization of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification relationship studies. *Tree Genetic Genomes*, 2(3), 165-175.
- Ghareyazi, B. (2001). *Apply of DNA markers in the plant breeding*. 4th Congress of Agriculture and Plant Breeding Sciences, Technological University of Isfahan, Iran. [In Farsi]
- Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L. and Guedes-Pinto, H. (2007). RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: genetic variability and molecular cultivar identification. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 54(1), 117-128.
- Noormohammadi, Z., Sheidai Dehghani, M. R. and Parvini, F. (2012). Inter -Population genetic diversity in *Olea cuspidate* subsp. *cuspidata* revealed by SSR and ISSR markers. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2), 155-163.
- Omrani-Sabbaghi, A., Shahriari, M., Falahati-Anbaran, M., Nankali, A. and Gharehyazei, B. (2007). Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea*) collections. *Science of Horticulture*, 112(4), 439-447.
- Padula, G., Giordani, E., Bellini, E., Rosati, A., Pandolfi, S., Paoletti, A., Pannelli, G., Ripa, V., De Rose, F., Perri, E., Buccoliero, A. and Mennone, C. (2008). Field evaluation of new olive (*Olea europaea* L.) selections and effects of genotype and environment on productivity and fruit characteristics. *Advances in Horticultural Science*, 22(2), 87-94.
- Riaz, S., Garrison, K. E., Dangl, G. S., Boursiquot, J. M., Meredith, C. P. (2002). Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 508-514.
- Terzopoulos, P.J., Kolano, B., Bebeli, P.J and Kaltsikes, P.J. (2005). Identification of *Olea europaea* L. cultivars using intersimple sequence repeat markers. *Science of Horticulture*, 105(1), 45-51.
- This, P., Lacombe, T. and Thomas, M. R. (2005). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511-519.
- Trujillo, L., Ojeda, M. A., Urdiroz, N. M., Potter, D., Barranco, D. E., Rallo, L. and Diez, C. M. (2014). Identification of the world wide olive germplasm Bank of Cordoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10(1), 141-155.
- Zare Rashnodi, N., Erfani Moghadam, J and Fazeli, A. (2019). The screening of Persian walnut genotypes based on the quantitative and qualitative characters and the investigation of genetic diversity among promising samples using ISSR marker. *Plant Productions*, 42(2), 279-294. [In Farsi]
- Zohary, D. and Hopf, M. (1994). Olive: *Olea europaea*. In D. Zohary and M. Hopf (Eds.), *Domestication of plants in the old world* (pp. 137-143). Oxford: Clarendon Press.

