نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و سوم، شماره اول، ۱۳۹۵
http://jopp.gau.ac.ir

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام زیتون

***محسن مردی[۱]، *مهرشاد زین‌العابدینی[۲]، علی‌اصغر زینالو[۳]، سید مجتبی خیام‌نکوئی[۴]، سید حسین جمالی[۵]، عبدالرضا کاوند[۵]، پیام پتکی[۶]، کریم احمدی[۶]، سعید عبدی[۶]، فرشاد شمس‌کیا[۷]، صغری خوشکام[۷]، زهرا طاهرنژاد[۷] و علی‌اکبر لونی[۷]**

[۱]دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، [۲]استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، [۳]استادیار بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال، کرج، ایران، [۴]دانشیار مرکز تحقیقات و توسعه زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، ایران، [۵]مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج، ایران، [۶]پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، [۷]معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/٤/۲

چکیده

سابقه و هدف: زیتون شامل تقریباً ۲۰ گونه درخت کوچک از خانواده Oleaceae بوده که در جهان کهن از حوزه دریای مدیترانه، شمال آفریقا، جنوب شرقی آسیا، شمال تا جنوب چین، اسکاتلند و شرق استرالیا پراکندگی گسترده‌ای داشته‌اند. آن‌ها همیشه سبز بوده و دارای برگ‌هایی کوچک و یکپارچه هستند که روبروی هم قرار گرفته‌اند. درخت زیتون به‌دلیل مقاومت به کم‌آبی و سازگاری با خاک‌های کم‌بازده و فقیر و تولید محصول کم‌هزینه، از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. در گذشته، روش‌های شناسایی ارقام مبتنی‌بر خصوصیات ریخت شناختی برگ، میوه، هسته و مغز هسته استوار بود، ولی جز در موارد خاص استفاده از این صفات به تنهایی برای شناسایی ارقام کافی نمی‌باشد با توجه به شناسایی پیچیده ارقام زیتون با استفاده از صفات ریخت شناختی ابزارها مولکولی چشم‌انداز جدید برای انگشت‌نگاری DNA فراهم کرده‌اند در سال‌های اخیر فناوری نشانگرهای DNA در گیاهان عالی، به سمت استفاده از این نشانگرها در انگشت‌نگاری DNA سوق یافته است.

*مسئولان مکاتبه: mardi@abrii.ac.ir; mzeinolabedini@abrii.ac.ir

مواد و روش‌ها: انجام نمونه‌برداری پس از دریافت اطلاعات از مؤسسه ثبت و گواهی بذرو مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی صورت گرفت. نمونه‌گیری از سربرگ‌های جوان و تازه رشد کرده درخت به‌صورت سرشاخه انجام شد. ۳۰ میلی‌گرم از برگ توسط ازت کوبیده شده و استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Core Bio و بر پایه دستورالعمل کیت انجام گردید. در این تحقیق مجموعاً از ۲۲ نشانگر ریز ماهواره SSR استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای به‌منظور شناسایی درختان مادری خارج از تیپ در بین درختان مادری یک رقم انجام شد. کلیدهای مولکولی اختصاصی به‌وسیله تجزیه‌های مولکولی بر روی ٦٤ درخت مادری ارقام مورد مطالعه، شناسایی و در دو آزمایشگاه مولکولی مستقل واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی و مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تأیید شد. اکثر درختان مادری ارقام مختلف در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی شدند.

یافته‌ها: در این تحقیق با استفاده از ۲۲ نشانگر مولکولی SSR، کلید شناسایی مولکولی ۱۱ رقم زیتون (*Olea europaea* L.) حاصل گردید. نتایج نشان داد ۱۰ نشانگر ریز ماهواره از بین نشانگرهای به‌کار رفته در ۱۱ رقم مورد مطالعه نوارهای چند شکل ایجاد نمودند. نشانگرهای MOL 1 در رقم تخم کبکی، MOL 7 در رقم‌های دزفولی، ماوی و روغنی، MOL 8 در رقم دزفولی و شنگه، MOL 9 در رقم‌های دزفولی، گلوله، ماری و روغنی، MOL 10 در رقم تخم کبکی، MOL 11 در رقم‌های دزفولی و فیشومی، MOL 14 در رقم دهقان، MOL 18 در رقم گلوله و MOL 20 در رقم ماری ایجاد باندهای چند شکل اختصاصی نمودند. از میان نشانگرهای مورد استفاده، نشانگر MOL 9 به تنهایی قادر به شناسایی و تفکیک چهار رقم مهم زیتون ایران شامل دزفولی، گلوله، ماری و روغنی از سایر ارقام مورد مطالعه بود.

نتیجه‌گیری: با مشاهده دندروگرام حاصل از نرم‌افزار Splits Tree 4، درختان مادری ارقام مورد مطالعه زیتون با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR چند شکل نشان دادند. اکثر درختان مادری ارقام مختلف در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی شدند. نتایج حاصل از ارتباط ژنتیکی به‌دست آمده با استفاده از روش مبتنی‌بر مدل و روش خوشه‌ای بسیار مشابه هم بودند. با شناسایی کلیدهای شناسایی مولکولی ارقام مورد مطالعه، امکان تشخیص این ارقام به‌منظور تأیید اصالت ژنتیکی آن‌ها میسر گردید.

کلمات کلیدی: انگشت‌نگاری ریز ماهواره، تجزیه خوشه‌ای، روش‌های مبتنی‌بر مدل، زیتون

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) بومی آسیای میانه، بین‌النهرین، سوریه و ایران است. اگرچه برخی از محققان با توجه به شواهد تاریخی و باستان‌شناسی، خاستگاه اولیه زیتون را فلسطین، لبنان، شمال‌غربی سوریه و مصر می‌دانند و معتقدند که زیتون در اثر تحولات تاریخی و جنگ‌ها به اروپا (یونان، ایتالیا و اسپانیا) برده شده است (۱۸). بر اساس آخرین گزارش سازمان خواربار جهانی، اسپانیا با بیش از شش میلیون تن بیشترین تولید زیتون را به خود اختصاص داده است. بر اساس این گزارش ایران با تولید حدود ٤٠ هزار تن به‌عنوان بیست و یکمین کشور تولید کننده زیتون در جهان معرفی شده است (۱۰). باغ های اقتصادی زیتون در حال حاضر در بسیاری از نقاط کشور از جمله استان‌های قزوین، گیلان، زنجان، گلستان، فارس و کرمانشاه وجود دارد. بر اساس برنامه پنجم توسعه، سطح زیر کشت زیتون از ۷۱ هزار هکتار در سال ۱۳۸۱ به حداقل ٦٠٠ هزار هکتار باید افزایش یابد که برای نیل به‌این هدف ضروری است، سالیانه در حدود ٤/٥ میلیون اصله نهال در کشور تولید و بین باغداران توزیع شود.

یکی از معضلات مهم باغداران در خصوص احداث نهالستان‌ها و باغ‌ها، نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت شده می‌باشد، زیرا شناسایی ارقام باغی در سال‌های اولیه رشد و تا زمانی‌که درختان به بار ننشسته‌اند، امری دشوار است. در بسیاری از مواقع، باغداران چندین سال وقت و سرمایه خود را برای کشت یک رقم خاص صرف می‌کنند و این در حالی است که رقم کشت شده رقم مورد نظر نیست و به‌این ترتیب خسارت جبران‌ناپذیری به آن‌ها وارد می‌شود. وجود باغ‌های قدیمی، عدم دسترسی به باغ‌های مادری استاندارد، عدم آشنایی کافی تولیدکنندگان نهال و اشتباه در زمان حمل و نقل نهال‌ها و از طرفی رشد فزاینده نیاز به تولید نهال، از مهم‌ترین مسایل پیش روی باغبانی کشور می‌باشد. تعیین منشاء ژنتیکی ارقام نه تنها از جنبه‌های احداث باغ، بلکه از نظر شناسایی روابط خویشاوندی، برای دستیابی به ارقام جدید اقتصادی و مطابق با نیازهای روز اهمیت زیادی دارد. بنابراین طراحی هر برنامه به نژادی و ایجاد باغ با ارقام موردنظر و گواهی شده، مستلزم شناسایی ویژگی‌های اختصاصی هر رقم می‌باشد. علی‌رغم این‌که اغلب محصولات باغبانی جزء مهمترین محصولات صادراتی کشور به شمار می‌روند، اما هیچگونه شناسنامه دقیقی برای تعیین اصالت ژنتیکی و حفظ حقوق مالکیت این ذخایر توارثی گران‌بها در کشور وجود ندارد.

در گذشته، روش‌های شناسایی ارقام مبتنی‌بر خصوصیات ریخت شناختی برگ، میوه، هسته و مغز هسته استوار بود، ولی جز در موارد خاص استفاده از صفات ریخت شناختی به تنهایی برای شناسایی ارقام کافی نمی‌باشد. کانتینی و همکاران (٤) تنوع ژنتیکی ارقام زیتون را با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک مورد مطالعه قرار دادند. با انجام تحلیل‌های PCA و تجزیه خوشه‌ای، تفاوت اندکی در خصوصیات میوه، بذر، برگ و عادت رشد مشاهده شد. امروزه تعیین اصالت ژنتیکی محصولات باغی از سطح مورفولوژی فراتر رفته و به‌وسیله روش‌های نوین زیست فناوری در سطح ژنوتیپ گیاه صورت می‌گیرد. در حال حاضر با به‌کارگیری هم‌زمان اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی امکان تعیین دقیق هویت ارقام مهم باغی کشور میسر شده است. انگشت نگاری DNA[1]، در سال ۱۹۸۵ معرفی شد. مبنای انگشت نگاری DNA وجود توالی‌های چند شکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. انجام انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نشانگرهای مختلفی امکان‌پذیر است که با پیشرفت فناوری در سال‌های اخیر، بر تعداد و کارایی آن‌ها افزوده شده است.

تاکنون مطالعات مختلفی در ارتباط با استفاده از نشانگرهای مولکولی در مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام مختلف زیتون انجام شده است. بوگانی و همکاران (۳) ۱۱ رقم زیتون ایتالیا را با استفاده از نشانگر RAPD بررسی کردند. این محققان گزارش نمودند علی‌رغم وجود چند شکلی بین ارقام، نتایج حاصله تکرارپذیر نبوده و به‌این دلیل نتایج ثابتی به‌دست نیامد. فابری و همکاران (۹). با استفاده از نشانگرهای RAPD، ۱۷ رقم زیتون روغنی و کنسروی را که از کشورهای مختلف به آمریکا برده شده بود، شناسایی و تفکیک نمودند. اگرچه نتایج حاصله در ژرم پلاسم، چندشکلی بالایی برای نشانگرهای RAPD مورد آزمایش نشان داد، ولی رابطه منطقی بین گروه‌بندی ارقام بر اساس داده‌های مولکولی و مبدأ جغرافیایی آن‌ها به‌دست نیامدند. کالینز و همکاران (۷) ارقام زیتون وارداتی به استرالیا که فاقد نام مشخصی بودند را با استفاده از نشانگرهای RAPD شناسایی کردند. نتایج نشان داد که بعضی از ارقام مانند مانزانیلا و کالاماتا تشابه بسیار زیادی با درختان مادری خود نشان دادند در حالی‌که برخی دیگر مانند گوردال دارای تفاوت ژنتیکی قابل توجه با درختان مادری خود بودند. بنسارد و همکاران (۲۱)، ۱۱۳ ژنوتیپ زیتون را با استفاده از ٤٥ نشانگر چند شکل RAPD مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق نشانگرهای فوق به‌صورت قابل قبولی، ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون را

1- DNA Fingerprinting

از یکدیگر تفکیک کردند. علاوه‌بر این، ۳۸ رقم زیتون پرتغالی و خارجی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی شدند که ۲۰ آغازگر RAPD و ۱۷ آغازگر ISSR به‌ترتیب ۳۰۱ و ۲۶۲ باند چند شکل ایجاد کردند. از این میان ۷ نشانگر ISSR و ۱۲ نشانگر RAPD قادر به تفکیک ارقام موردنظر شدند (۱۲). بیسی و همکاران (۱) با استفاده از نشانگرهای AFLP و آزمایش تجزیه روغن، ارقام زیتون منطقه گاردای ایتالیا را شناسایی و میزان خویشاوندی آن‌ها را تعیین کردند. براین اساس، ارقام کاسالیوا، فرانتویو، لچینو و پندولینو با کیفیت روغن بالا و خصوصیات مطلوب باغبانی معرفی شدند. در آزمایشی کاریرو و همکاران (۵) موفق به شناسایی ۱۰۰ نشانگر ریزماهواره یا SSR از زیتون شدند. مازارو و همکاران (۱۱) نیز از نشانگرهای ریزماهواره برای شناسایی ارقام زیتون استفاده کردند. نتایج حاصله از این آزمایش وجود تنوع را در ۵۰ جایگاه ریزماهواره برای ارقام مورد مطالعه نشان داد و تنها ۲ جایگاه ریزماهواره تک شکل بود. تعداد آللها از ۱ تا ۷ آلل متفاوت بود. با استفاده از این روش تمامی ارقام حتی ارقام بومی، به راحتی از یکدیگر تفکیک شدند. اختلاف در الگوی SSR در بین افراد یک رقم نیز مشاهده شد. این محققان رقم کاسالیوا را که فرم جهش یافته‌ای از رقم فرانتویو است، متمایز نمودند. همچنین تفاوت چشمگیری بین رقم لچینو که گفته می‌شد شبیه رقم محلی لس است، به‌دست آمد. تنوع ژنتیکی ۱۲۸ نمونه تصادفی باغ‌های منارا در مراکش نیز با استفاده از ۱۵ آغازگر SSR مورد ارزیابی قرار گرفت (٦). ریاله و همکاران (١٦) با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف موفق به تمایز ارقام مختلف زیتون از یکدیگر شدند. عمرانی و همکاران (۱۳) علاوه‌بر مطالعه تنوع ژنتیکی زیتون در ایران، کارایی نشانگرهای مولکولی SSR را در تهیه کلیدهای مولکولی ارقام مختلف زیتون گزارش نمودند. ۱۷ رقم زیتون با استفاده از ۸ نشانگر ریز ماهواره بررسی شد که از مجموعه این نشانگرها در انگشت نگاری این ارقام استفاده گردید (۸).

ساری و همکاران (۱۷) ۱۲ نشانگر ریز ماهواره را برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ذخیره ژنتیکی زیتون نواحی مدیترانه‌ای به‌کار بردند و از این نتایج در تعیین منشا مهمترین ارقام زیتون این نواحی، شناسایی مولکولی، مدیریت ژرم پلاسم و برنامه اصلاحی استفاده نمودند (۱۷).

هدف این تحقیق، تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی مهمترین ارقام زیتون در ایران با استفاده از نشانگرهای SSR بود. در این ارتباط ابتدا درختان مادری مهمترین ارقام زیتون در کشور توسط بخش‌های ذیصلاح اجرایی و پژوهشی وزارت جهادکشاورزی شناسایی، تأیید و معرفی گردیدند و در ادامه کلیدهای شناسایی مولکولی این ارقام حاصل شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: انجام نمونه‌برداری پس از دریافت اطلاعات از مؤسسه ثبت و گواهی بذر و با حضور مجریان/ همکاران/ نمایندگان از مراکز تحقیقاتی ذیربط و همچنین معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهادکشاورزی انجام شد. در جدول ۱ مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه درج شده است. نمونه‌گیری از سربرگ‌های جوان و تازه رشد کرده درخت به‌صورت سرشاخه (برگ همراه با شاخه) و از طرف آفتاب‌گیر انجام شد. بهترین تاریخ نمونه‌برداری به‌طور کلی اوایل رشد مجدد درخت، به‌خصوص اول بهار می‌باشد. عکس‌برداری از محل درخت و نشانه‌گذاری و نمای کلی محل نیز ثبت گردید.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه زیتون.

Table 1. Characteristics of the olive studied.

شماره NO.	نام رقم Cultivar	کد Code	شماره برچسب Lable NO.	محل نمونه‌برداری Location	طول جغرافیایی Altitute	عرض جغرافیایی Latitute	ارتفاع از سطح دریا (متر) Elevation (m)
1	دزفولی Dezfuli	DE_1*DEZ**	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114264	E 048 °25′ 50-1	N 32°15 ′ 41-7	90
2	دزفولی Dezfuli	DE_2DEZ	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114188	E 048 °25′48-1	N 32°15 ′ 35.4	80
3	دزفولی Dezfuli	DE_3DEZ	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114285	E 048 °25′48-2	N 32°15 ′ 35.4	84
4	دزفولی Dezfuli	DE_4DEZ	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114186	E 048 °25′48-2	N 32°15 ′ 35.6	82
5	دزفولی Dezfuli	DE_5DEZ	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114169	E 048 °25′48-4	N 32°15 ′ 35.9	90
6	دزفولی Dezfuli	DE_6DEZ	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114528	E 048 °25′48-1	N 32°15 ′ 35.1	86
7	دزفولی Dezfuli	DE_7DEZ	دزفول- ایستگاه صفی‌آباد Dezful Safiabad-Station	114168	048 °25′47-6	N 32°15 ′ 35.5	87
8	ماوی Mavi	MA_1MAL	باغملک- شهرک ماوی Baghmalek-mavi	114159	E 050° 07′ 28.9	N 31°19 ′ 28.7	1019
9	ماوی Mavi	MA_2MAL	باغملک- شهرک ماوی Baghmalek-mavi	114287	E 050° 07′ 29.0	N 31°19 ′ 28.8	1019
10	ماوی Mavi	MA_3MAL	باغملک- شهرک ماوی Baghmalek-mavi	114265	E 050° 07′ 29.1	N 31°19 ′ 28.9	1014
11	روغنی Roghani	R_1RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114251	E 049° 24.935	N 36°48. 225	257
12	روغنی Roghani	R_2RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114252	E 049° 24.934	N 36°48. 227	271
13	روغنی Roghani	R_3RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114289	E 049° 24.951	N 36°48. 259	273
14	روغنی Roghani	R_4RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114280	E 049° 24.953	N 36°48. 250	273
15	فیشمی Fishmi	F_1RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114291	E 049° 24.962	N 36°48. 197	276
16	فیشمی Fishmi	F_2RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114284	E 049° 24.961	N 36°48. 197	277
17	فیشمی Fishmi	F_3RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114288	E 049° 24.957	N 36°48. 192	277
18	فیشمی Fishmi	F_4RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114253	E 049° 24.954	N 36°48. 192	276
19	گلوله Gololeh	G_1RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114292	E 049° 24.923	N 36°48. 194	271
20	شنگه Shangeh	SH_1RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114255	E 049° 24.919	N 36°48. 204	270
21	شنگه Shangeh	SH_2RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114257	E 049° 24.915	N 36°48. 207	270

ادامه جدول ۱

22	شنگه Shangeh	SH_3RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114294	E 049° 24.911	N 36°48. 198	271
23	شنگه Shangeh	SH_4RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114296	E 049° 24.919	N 36°48. 221	269
24	ماری Mari	M_1RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114254	E 049° 24.911	N 36°48. 220	268
25	ماریMari	M_2RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114267	E 049° 24.908	N 36°48. 218	268
26	ماری Mari	M_3RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114298	E 049° 24.907	N 36°48. 217	269
27	ماری Mari	M_4RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114256	E 049° 24.910	N 36°48. 227	270
28	زرد Zard	Z_1RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114297	E 049° 24.904	N 36°48. 227	268
29	زرد Zard	Z_2RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114276	E 049° 24.905	N 36°48. 227	267
30	زرد Zard	Z_3RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114281	E 049° 24.908	N 36°48. 232	268
31	زرد Zard	Z_4RO	رودبار- ایستگاه تحقیقات زیتون Rodbar Olive Station	114279	E 049° 24.911	N 36°48. 233	269
32	ماری Mari	M_1TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114263	E 049 ° 05 .961	N 36°47. 758	360
33	ماری Mari	M_2TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114277	E 049 ° 05 944	N 36°47. 791	362
34	ماری Mari	M_3TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114271	E 049 ° 05.934	N 36°47. 791	360
35	ماری Mari	M_4TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114271	E 049° 05 .935	N 36°47. 790	360
36	گلوله Gololeh	G_1TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114268	E 049 ° 05 .945	N 36°47. 786	358
37	گلوله Gololeh	G_2TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114266	E 049 ° 05 .901	N 36°47. 783	358
38	گلوله Gololeh	G_3TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114299	E 049 ° 05 .905	N 36°47. 777	358
39	گلوله Gololeh	G_4TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114274	E 049 ° 05 .890	N 36°47. 775	355
40	شنگه Shangeh	SH_1TA	طارم -ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114259	E 049 ° 05 .905	N 36°47. 753	355
41	شنگه Shangeh	SH_2TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114283	E 049 ° 05 .893	N 36°47. 735	355
42	شنگه Shangeh	SH_3TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114282	E 049 ° 05 .919	N 36°47. 754	357
43	شنگه Shangeh	SH_4TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114270	E 049° 06 .017	N 36°47. 730	353
44	زرد Zard	Z_1TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114300	E 049 ° 05 .937	N 36°47. 750	357

ادامه جدول ۱

45	زرد Zard	Z_2TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114295	E 049 ° 05 .940	N 36°47. 748	357
46	زرد Zard	Z3TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114290	E 049 ° 05 .941	N 36°47. 756	359
47	زرد Zard	Z_4TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114293	E 049 ° 05 .923	N 36°47. 762	357
48	روغنی Roghani	R_1TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114258	E 049 ° 05 .931	N 36°47. 753	358
49	روغنی Roghani	R_2TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114260	E 049 ° 05 .946	N 36°47. 737	353
50	روغنی Roghani	R_3TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114269	E 049 ° 05 .944	N 36°47. 733	355
51	روغنی Roghani	R_4TA	طارم- ایستگاه تحقیقات زیتون Tarom Olive Station	114261	E 049 ° 05 .944	N 36°47. 733	355
52	دزفولی Dezfuli	DE_1BE	شیراز- باغ بش Shiraz-baghbesh	114383	E 052 ° 26.369	N 29°37.753	1624
53	دزفولی Dezfuli	DE_2BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114366	E 052 ° 26.369	N 29°37.751	1623
54	دزفولی Dezfuli	DE_3BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114378	E 052 ° 26.370	N 29°37.755	1622
55	تخم کبکی kabki Tokhm	TO_1BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114390	E 052 ° 26.372	N 29°37.757	1623
56	تخم کبکی Tokhm Kabki	TO_2BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114359	E 052 ° 26.368	N 29°37.750	1621
57	تخم کبکی Tokhm Kabki	TO_3BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114369	E 052 ° 26.369	N 29°37.744	1620
58	دهقان Dehghan	DEH_1BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114361	E 052 ° 26.376	N 29°37.747	1620
59	دهقان Dehghan	DEH_2BE	شیراز - باغ بش Shiraz-Baghbesh	114377	E 052 ° 26.365	N 29°37.745	1622
60	دهقان Dehghan	DEH_3BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114373	E 052 ° 26.344	N 29°37.772	1625
61	شیراز Shiraz	SHI_1BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114369	E 052 ° 26.354	N 29°37.777	1624
62	شیراز Shiraz	SHI_2BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114393	E 052 ° 26.418	N 29°37.720	1618
63	شیراز Shiraz	SHI_3BE	شیراز- باغ بش Shiraz-Baghbesh	114364	E 052 ° 26.414	N 29°37.725	1617

تجزیه‌های مولکولی

الف) استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Core Bio و بر پایه دستورالعمل کیت انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین و غلظت نهایی DNA استخراج شده تا ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

ب) تجزیه SSR: در این تحقیق مجموعاً از ۲۲ نشانگر ریز ماهواره استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. این نشانگرها توسط کاریرو و همکاران گزارش شده‌اند (۵). تکثیر قطعات با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش حاوی ۲ میکرولیتر دی ان ای ژنومی (۲۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر (PCR) 10X، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs (2mM)، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای F و R، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ دی ان ای پلیمراز، ۰/٦ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار و ٦/۲ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه و مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۱۰ چرخه حرارتی تاچ داون و متعاقباً ۲۵ چرخه با دمای اتصال مشخص برای هر آغازگر انجام شد. محصولات حاصل از واکنش زنجیره پلیمراز در الکتروفورز عمودی ژل پلی‌آکریل آمید ٦ درصد و با کمک دستگاه (DNA Analyser 4300) تفکیک و ارزیابی شدند.

ج) نحوه کدگذاری و تهیه بارکد اختصاصی هر نمونه: پس از پایان رنگ‌آمیزی و آشکار شدن نوارها، ژل موردنظر اسکن گردیده و سپس روی عکس‌های اسکن شده کار امتیازدهی هر نمونه آغاز گردید. آلل‌های چند شکل مکان (های) ژنی به شرح ذیل کدگذاری شدند. به‌طور مثال اگر یک نشانگر ریز ماهواره دارای سه آلل چند شکل بود، در صورت مشاهده آلل شماره یک در هر نمونه، کد یک و در صورت عدم مشاهده آلل شماره یک کد صفر- در صورت مشاهده آلل شماره دو در هر نمونه، کد دو و در صورت عدم مشاهده آلل شماره دو کد صفر- در صورت مشاهده آلل شماره سه در هر نمونه، کد سه و در صورت عدم مشاهده آلل شماره سه کد صفر در نظر گرفته می‌شود. با کنار هم قرار گرفتن کدهای مربوط به آلل‌های هر مکان ژنی، بار کد مکان ژنی مورد مطالعه برای هر نمونه به‌دست آمد (جدول ۳). با کنار هم قرار گرفتن بارکدهای مکان‌های ژنی مورد مطالعه در هر نمونه، بار کد نهایی برای آن حاصل گردید (جدول ٤). بررسی و تهیه کلیدهای شناسایی توسط نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۰ و ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت به کمک نرم‌افزارهای Power Marker نسخه ۳/۲۵، Split Tree نسخه ٤ و Structure نسخه ۲/۳ انجام گردید. آزمون تکرارپذیری نشانگرهای معرفی شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام پذیرفت.

جدول ۲- مشخصات ۱٤ نشانگر SSR زیتون استفاده شده در تهیه کلیدهای انگشت نگاری شامل توالی آغازگرها، تعداد و اندازه تقریبی آلل‌ها و دمای اتصال آن‌ها.

Table 2. Characteristics of 14 SSR markers in the preparation of fingerprinting keys including primer sequence, approximate size and number of alleles and their annealing temperature.

دمای اتصال Tm	اندازه تقریبی آلل‌ها (bp) Allele size						توالی آغازگرها Primers sequence	نام نشانگر SSR
	6	5	4	3	2	1		
58	–	–	165	170	175	180	F: 5-AAGAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC-3 R: 5-GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC-3	MOL 1
58	–	–	–	–	–	260	F: 5-GATCTTGTCTGTATATCCACAC-3 R: TATACCTTTTCCATCTTGACGC-3	MOL 4
58	145	150	155	165	175	185	F: 5-GATCAAACTACTGCACGAGAGAG-3 R: 5-TTGTCTCAGTGAACCCTTAAACC-3	MOL 7
55	–	–	170	185	190	195	F: 5-CGTGACCACCTAAATCCGCCCC-3 R: 5-CTGTCCAGAGCTAAAGGTTTCG-3	MOL 8
58	160	170	180	185	195	210	F: 5-AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTCG-3 R: 5-GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCT-3	MOL 9
58	–	130	135	140	145	160	F: 5-ACAATTCAACCTCACCCCCATACCC-3 R: 5-TCACGTCAACTGTGCCACTGAACTG-3	MOL 10
55	–	–	–	160	170	180	F: 5-GGACATAAAACATAGAGTGCTGGGG-3 R: 5-AGGGTAGTCCAACTGCTAATAGACG-3	MOL 11
58	–	–	200	210	215	225	F: 5-AACAAATCCCATACGAACTGCC-3 R: 5-CGTGTTGCTGTGAAGAAAATCG-3	MOL 12
60	–	235	250	260	290	300	F: 5-CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC-3 R: 5-TGCTTTTGTCGTGTTTGAGATGTTG-3	MOL 14
58	–	–	–	–	–	210	F: 5-CCTCTGAAAATCTACACTCACATCC-3 R: 5-ATGAACAGAAAGAAGTGAACAATGC-3	MOL 15
58	–	–	–	–	–	215	F: 5-GGTGTAGCCCAAGCCCTTAT-3 R: 5-TGCATGACCGTGGTGTAAGT-3	MOL 17
۵۸	–	–	–	۱٤۵	۱۵۵	۱۷۰	F: 5-AGGGTGGGGATAAAGAAGAAGTCAC-3 R: 5-CTTTTACCCCATATACCCCGATTCATT-3	MOL 18
٦۲	–	–	–	–	–	۲۰۵	F: 5-GTCTCTGCCCAACAATG-3 R: 5-CATACATGAGTGTGTGTG-3	MOL 19
٤۸	–	–	–	۱۸۰	۱۹۰	۲۰۰	F: 5-TGACCATCTCAAAACCATTCA-3 R: 5-TTGCCCGGCTGTAGTTGTAT-3	MOL 20

جدول ۳- کدگذاری نمونه‌ها برای آلل‌های چند شکل یک مکان ژنی.

Table 3. Samples coding for polymorphic alleles of a locus.

ارقام Cultivar	لوکوس ۱ Locus 1			
	آلل ۱ Allele 1	آلل ۲ Allele 2	آلل ۳ Allele 3	کد Code
اوحدی Ohadi	0	2	3	023
سیریزی Sirizi	1	2	3	123
سیف ا الدینی Sifodini	0	0	3	003
ابراهیمی Ebrahimi	1	2	0	120
یو سی بی ۱ Ucb1	0	2	0	020
اینتگریما Integrima	0	0	0	000
بنه باغی Banehbaghi	1	0	0	100

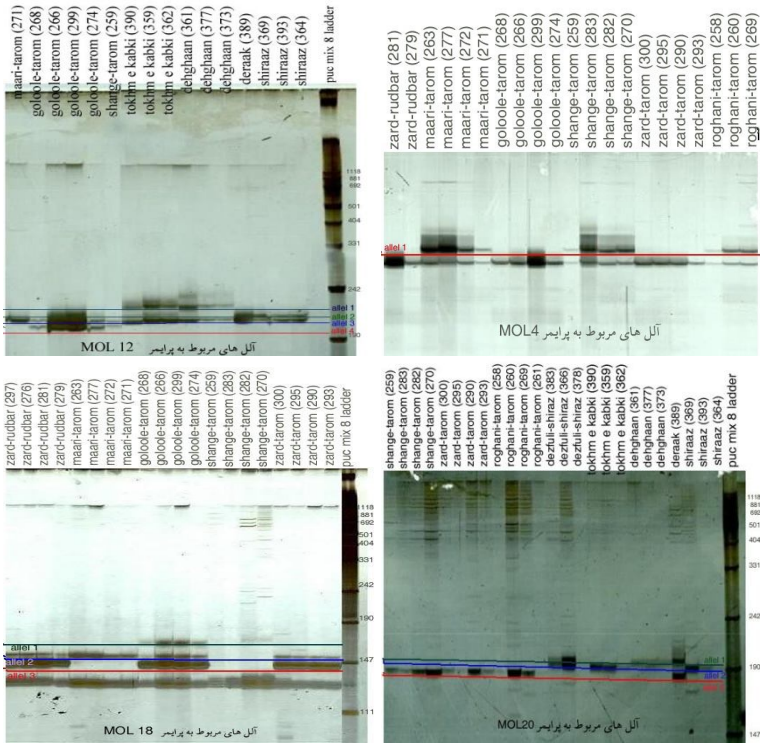
جدول ٤- کدگذاری برای آلل‌های چند شکل چند مکان ژنی

Table 4. Polymorphic alleles coding for locus.

ارقام Cultivar	بارکد Barcode
اوحدی Ohadi	023-0030-000
سیریزی Sirizi	123-0030-000
سیف ا الدینی Sifodini	003-1030-000
ابراهیمی Ebrahimi	120-1030-000
یو سی بی ۱ Ucb1	020-1000-000
اینتگریما Integrima	000-1000-000
بنه باغی Banehbaghi	100-1000-000

نتایج و بحث

از مجموع ۲۲ نشانگر، ۱۰ نشانگر چند شکلی نشان دادند که این تعداد نشانگر دارای چند شکلی مناسب بوده و در ۱۱ رقم مورد مطالعه نوارهای چند شکل ایجاد نمودند. در کل تعداد ۸۶ آلل به‌وسیله این نشانگرها تکثیر گردید که در ارقام مورد بررسی از ۲ تا ۱۵ آلل متغیر و میانگین تعداد آلل‌ها ۳/۹ بود. محتوای اطلاعات چندشکلی، میزان هتروزیگوسیتی و شاخص شانون نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت از ۱۰ نشانگر مولکولی SSR، کلید شناسایی مولکولی ۱۱ رقم زیتون حاصل گردید. برخی از قطعات (الل‌های) تکثیر شده توسط نشانگرهای SSR مورد استفاده در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- تکثیر قطعات و الل‌های مورد مطالعه برخی از نشانگرهای SSR در ارقام مورد مطالعه زیتون.

Figure 1. The amplified fragments and alleles of some SSR markers in olive cultivars.

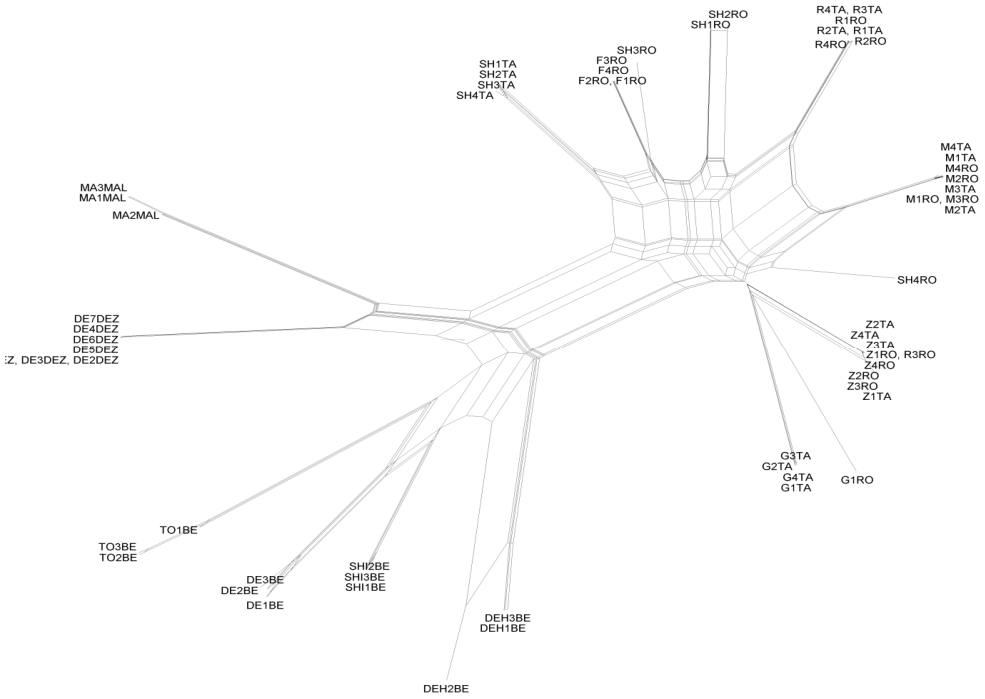
در جدول ۵ نشانگرهای اختصاصی ارقام مختلف زیتون به همراه کلید شناسایی آن‌ها به اختصار نشان داده شده است. به‌طور مثال آلل‌های ۱ و ۲ نشانگر ١٤ در رقم دهقان، آلل‌های ۵ و ٦ نشانگر ۷، آلل ٤ نشانگر ۸، آلل‌های ۱ و ٦ نشانگر ۹ و آلل ۲ نشانگر ۱۱ در رقم دزفولی به‌عنوان کلید شناسایی این ارقام شناسایی شدند. سایر آلل‌های اختصاصی به‌همراه کلیدهای شناسایی ارقام مختلف در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌گردد، نشانگرهای MOL 1 در رقم تخم کبکی، MOL 7 در رقم‌های دزفولی، ماوی و روغنی، MOL 8 در رقم دزفولی و شنگه، MOL 9 در رقم‌های دزفولی، گلوله، ماری و روغنی، MOL 10 در رقم تخم کبکی، MOL 11 در رقم‌های دزفولی و فیشومی، MOL 14 در رقم دهقان، MOL 18 در رقم گلوله و MOL 20 در رقم ماری باندهای چند شکل اختصاصی ایجاد نمودند. از میان نشانگرهای استفاده شده، نشانگر MOL 9 به تنهایی قادر به شناسایی و تفکیک چهار رقم مهم ایران شامل دزفولی، گلوله، ماری و روغنی از سایر ارقام مورد مطالعه بود.

جدول ۵- کلید شناسایی مولکولی ۱۱ رقم مختلف زیتون ایران.

Table 5. Molecular identification keys for 11 different Iranian olives cultivar.

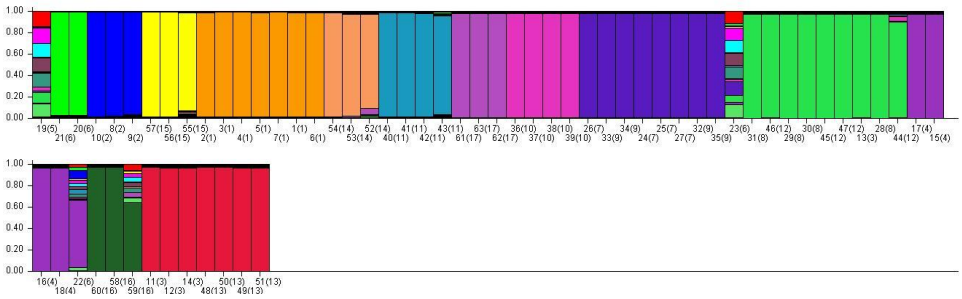
MOL 20	MOL 19	MOL 18	MOL 14	MOL 12	MOL 11	MOL 10	MOL 9	MOL 8	MOL 7	MOL 4	MOL 1	نام
100	1	103	1200	1030	003	00300	020000	1000	000450	0	0300	دهقان Dehghan
020	0	003	1030	0030	020	00340	100006	00040	000450	1	0034	دزفولی Dezfoli
003	0	103	0204	0030	103	00340	100050	0030	025000	1	0200	فیشومی Fishomi
000	0	123	0004	0034	003	00340	023000	0200	100050	0	0200	گولوله Gololeh
103	1	020	0204	0030	003	00305	003000	0030	20400	1	0230	ماری Mari
120	0	103	0030	1030	100	00305	000406	0204	020050	1	0034	ماوی Mavi
003	0	020	0204	0030	100	00045	103000	0030	000006	1	0230	روغنی Roghani
003	0	000	0200	0034	100	00340	120050	0000	003006	1	0200	شانگه Shangeh
020	0	003	1030	0230	003	00045	100050	1004	000450	1	0230	شیراز Shiraz
020	0	003	1004	1030	003	10300	020050	0200	000450	1	1200	تخم کبکی Tokhme Kabki
003	0	023	0004	0030	003	00305	003050	0030	000450	0	0230	زرد Zard

تجزیه خوشه‌ای به‌منظور شناسایی درختان مادری خارج از تیپ در بین درختان مادری یک رقم انجام شد (شکل ۲). نتایج نشان داد درختان مادری رقم شنگه رودبار و طارم جمع‌آوری شده با یکدیگر متفاوت می‌باشند و در بین درختان مادری رقم شنگه که از رودبار جمع‌آوری شده‌اند، تفاوت وجود دارد. علت وجود این تفاوت ممکن است به دلایل مختلف مانند اختلاط و جهش باشد و به‌منظور ایجاد نهال‌های یکنواخت در ارقام مذکور ضروری است، نمونه‌های فوق به‌عنوان درخت مادری مورد استفاده قرار نگیرند. مشاهده دندروگرام حاصل از نرم‌افزار Splits Tree، درختان مادری ارقام مورد مطالعه زیتون با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR چند شکل نشان داد، اکثر درختان مادری ارقام مختلف در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی شدند. همچنین به‌منظور تأیید نتایج حاصل از روش‌های مبتنی‌بر تجزیه خوشه‌ای و جهت اطلاع از وجود ساختار یا زیر جمعیت‌های احتمالی در ژرم پلاسم مورد مطالعه از روش مبتنی‌بر مدل Bayesian استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Structure فرض K=۲ تا K= ۲۰ اجرا گردید (K نشان‌دهنده تعداد گروه‌ها) و سپس بر مبنای معیارهای lnP(D) و ΔK صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد. بر این اساس پایین‌ترین مقدار عددی lnP(D) و بیشترین مقدار عددی ΔK نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه به‌شمار می‌روند. در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، ۱۳ =K بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده است (شکل ۳). هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی (معرف ضریب عضویت) نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد می‌باشد. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیشترین پهنای رنگی آن خوشه را دارا باشد. در کل ژنوتیپ‌های داخل هر خوشه دارای احتمال عضویت بیش از ۰/۵ هستند و به احتمال بیش از ۵۰ درصد به خوشه خود تعلق دارند. بر طبق معیارهای lnP(D) و ΔK بهترین تعداد گروه k=۱۳ به‌دست آمد و این نتیجه با شبکه فیلوژنی در شکل ۲ به روش Neighbor-net کاملاً منطبق است.



شکل ۲- گروه‌بندی درختان مادری ارقام زیتون با استفاده از داده‌های حاصل از ۱۱ نشانگر SSR چند شکل.

Figure 2. Clustering of mother trees olive cultivars using data from 11 polymorphic SSR markers.



شکل ۳- تجزیه ساختار ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون با استفاده از روش مبتنی‌بر مدل به کمک مکان‌های ژنومی نشانگرهای SSR.

Figure 3. Analysis of the structure of olive cultivars and genotypes using model-based approach by SSR markers.

همچنین بر اساس نتایج به‌دست آماده، اختلافاتی از نظر الگوهای نواری نشانگرهای ریـز مـاهواره در بعضی از درختان مادری ارقام دزفولی، دهقان و شنگه (مانند ۱۱٤۲۹٦ و ۱۱٤۲۹٤) مشاهده شد. در نتیجه به‌منظور جلوگیری از هر گونه احتمال اختلاط در میان نمونـه‌هـای یـک رقـم، ضـروری اسـت، نمونه‌های مذکور به‌عنوان درخت مادری مورد استفاده قرار نگیرند.

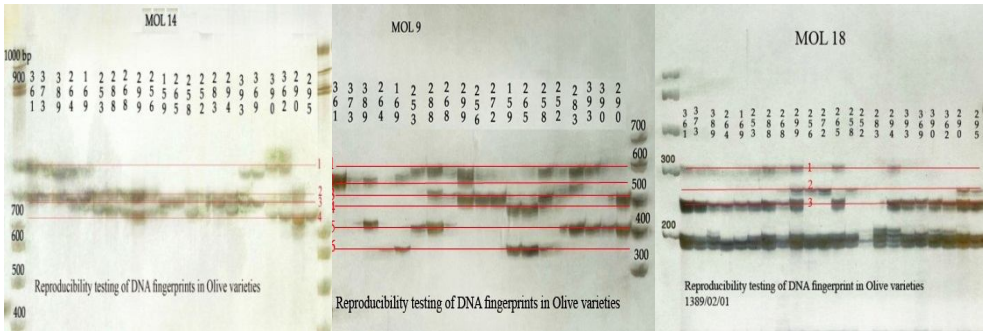
در آزمون تکرارپذیری نشانگرهای معرفی شده توسط مؤسسه تحقیقات بیوتکنولـوژی کشـاورزی، آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، از بین ۱۰ نشانگر معرفی شده برای ارقام زیتون، به‌طور تصادفی سه نشانگر MOL 18، MOL 9 و MOL 14 انتخاب و توسط DNA دو نمونه از ۱۱ رقم موجود (در مجمـوع ۲۲ فـرد) تکثیـر شـدند. محصـولات PCR روی ژل پلی‌اکریل آمید شش درصد الکتروفورز تفکیک و به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شـدند. نمونـه‌هـای انتخابی به‌همراه کد رقم و آلل‌ها در سه نشانگر تکرار شده در این آزمایشگاه در شـکل ٤ و جـدول ٦ نشان داده شده است. نتایج نشان داد، پروفایل سه نشانگر انتخاب شده در ارقام زیتون با پروفایل ارائـه شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مطابقت کامل داشته و بیانگر تکرارپذیر بودن آلل‌هـای این نشانگرها می‌باشد. با توجه به این‌که تجزیه‌های این تحقیق در دو آزمایشـگاه مسـتقل انجـام شـده است و نتایج هردو آزمایشگاه تأیید کننده نتایج یکدیگر بوده‌اند، لـذا اسـتفاده از کلیـدهـای شناسـایی مولکولی ارقام مورد مطالعه امکان تشخیص این ارقام به‌منظـور تأییـد اصـالت ژنتیکـی آن‌هـا را میسـر می‌سازد.

لازم به ذکر است، با توجه به گزارش خصوصیات مطلوب ریخت شناختی درختان مادری رقم دزفول منطقه شیراز- باغ بش و نیز تأیید وجود خصوصیات ریخت شناختی متفاوت درختان مادری رقم دزفول منطقه شیراز- باغ بش با درختان مادری رقم دزفول ایستگاه صفی‌آباد و تأیید این نتایج با انجام آزمایشات مولکولی انجام شده در این پژوهش و نیز به‌منظور جلوگیری از بروز هرگونه اشتباه، پیشنهاد می‌گردد به‌جای استفاده از عنوان "درختان مادری خارج از تیپ" برای درختان مادری رقم دزفولی موجود در باغ بش شیراز، اقدامات لازم به‌منظور ثبت درختان مذکور به‌عنوان درختان مادری رقم جدید زیتون تحت عنوان "دوستی" به‌عمل آید.

جدول ٦- نمونه‌ای از آزمون تکرارپذیری کلیدهای مولکولی مبتنی‌بر نشانگرهای ریزماهواره در زیتون.

Table 6. Examples of repeatability test of molecular key based on microsatellite markers for olive.

MOL 18	کد آلل در SSR SSR Allele code. MOL 14	MOL 9	کد رقم Cultivar code.	نام رقم Cultivar name.	شماره NO.
103	1200	020000	361	دهقان Dehghan	1
103	1200	020000	373	دهقان Dehghan	2
003	1030	100006	264	دزفولی Dezfuli	3
003	1030	100006	169	دزفولی Dezfuli	4
103	0204	100050	253	فیشومی Fishomi	5
103	0204	10350	288	فیشومی Fishomi	6
123	0004	023000	268	گولوله Gololeh	7
123	0004	023000	299	گولوله Gololeh	8
020	0204	003000	256	ماری Mari	9
020	0204	003000	272	ماری Mari	10
103	0030	000406	159	ماوی Mavi	11
103	0030	000406	265	ماوی Mavi	12
020	0204	103000	258	روغنی Roghani	13
020	0204	103000	252	روغنی Roghani	14
000	0200	120050	283	شانگه Shangeh	15
103	0200	000050	294	شانگه Shangeh	16
003	1030	100050	393	شیراز Shiraz	17
003	1030	100050	369	شیراز Shiraz	18
003	1004	020050	390	تخم کبکی Tokhme Kabki	19
003	1004	020050	362	تخم کبکی Tokhme Kabki	20
023	0004	003050	290	زرد Zard	21
023	0004	003050	295	زرد Zard	22



شکل ٤- آزمون تکرارپذیری الل‌های مورد مطالعه نشانگرهای SSR در ارقام مورد مطالعه زیتون در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال.

Figure 4. Repeatability test of alleles SSR markers studied cultivars Olive in Seed Plant Certification Registration Institute.

فهرست منابع

1. Bassi, D., Tura, D.F., and Pedo, S. 2000. Characterization of local olive (*Olea europaea* L.) accessions by oil composition, morphological and molecular marker methods. International Society for Horticulture Science. 4th International Symposium on Olive Growing.
2. Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., and Bervillé, A. 2001. Cultivar identification in olive based on RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 126(6): 668-675.
3. Bogani, P., Cavalieri, D., Petroccelli, R., Polsinelli, L., and Roselli, G. 1994. Identification of olive tree cultivars by using Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). Acta Hort. 356: 98-101.
4. Cantini, C., Cimato, A., and Sani, G. 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica, 109(3): 173-181.
5. Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., and Giorio, G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). The Appl Gen. 104: 301-307.
6. Charafi, J., El Meziane, A., Moukhli, A., Boulouha, B., El Modafar, C., and Khadari, B. 2008. Menara gardens: a Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. Gen. Resour. Crop Evol., 55(6): 893-900.
7. Collins, G., Sedgley, M., and Mekuria, G. 2000. Establishing a database of DNA fingerprinting to identify olive cultivars. International Society for Horticulture Science. 4th International Symposium on Olive Growing.
8. Doveri, S., Sabino Gil, F., Díaz, A., Reale, S., Busconi, M., da Câmara Machado, A., and Lee, D. 2008. Standardization of a set of microsatellite

markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). Sci. Hort., 116(4): 367-373.
9. Fabri, A., and Hormoza, Y., and Polito, V.S. 1995. Random Amplified Polymorphism DNA analysis of olive cultivars. J Amer Soc Hort Sci. 120(3): 538-542.
10. FAOSTAT. 2011, http://faostat.fao.org.
11. Marrozzo, T., Ciprioni, G., Marconi, R., Cimato, A., and Testolin, R. 2000. Isolation and characterization of microsatellite DNA in olive (*Olea europaea* L.). International Society for Horticulture Science.4th International Symposium on Olive Growing.
12. 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. Gen. Resour. Crop Evol., 54(1): 117-128.
13. Omrani-Sabbaghi, M., Shahriari, M., Falahati-Anbaran, M., Mohammadi, S.A., Nankali, A., Mardi, M., and Ghareyazie, B. 2007. Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olives (*Olea europaea* L.) collections. Sci. Hort. 112: 439-447.
14. Rallo, P., and Dora G., and Marttini A. 2000. Application of microsatellite in olive breeding. International Society for Horticulture Science. 4th International Symposium on Olive Growing.
15. Rao, R., La Mura, M., Corrado, G., Ambrosino, O., Foroni, I., Perri, E., and Pugliano, G. 2009. Molecular diversity and genetic relationships of southern Italian olive cultivars as depicted by AFLP and morphological traits. J. Hort. Sci. Biotechnol, 84(3): 261-266.
16. Reale, S., Doveri, S., Díaz, A., Angiolillo, A., Lucentini, L., Pilla, F., Martín, A., Donini, P., and Lee D. 2006. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Genom. 49: 1193-205.
17. Sarri, V., Baldoni, L., Porceddu, A., Cultrera, N.G.M., Contento, A., Frediani, M., and Cionini, P.G. 2006. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. Genom, 49(12): 1606-1615.
18. Zohary, D. 1994. The wild genetic resources of the cultivated olive. Acta Hort. 356: 62-65.