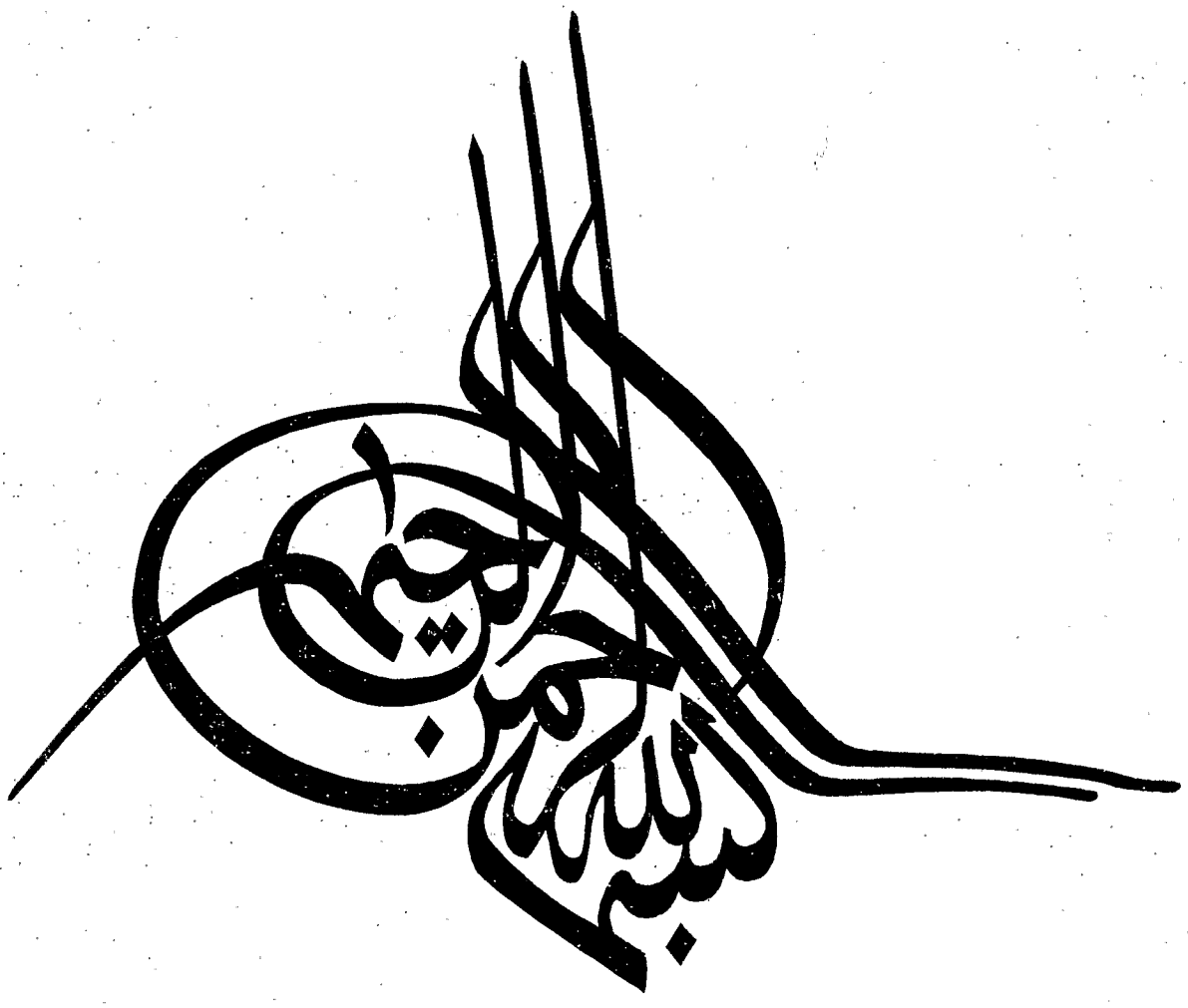

١٢٩٢٤٩

دانشگاه رازی

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی اصلاح نباتات

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های زیتون ایرانی در استان کرمانشاه با استفاده از نشانگر های مولکولی

استادان راهنما:

دکتر کیانوش چقامیرزا

دکتر عزت اله فرشادفر

استاد مشاور :

دکتر عیسی ارجی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی پژوهشگاه
تاریخ ۱۳۸۸/۴/۲۲

نگارش: حمید رضا لطفی

بهمن ماه ۱۳۸۷

۱۲۶۳۶۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشگاه رازی

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی مهندسی کشاورزی

گرایش اصلاح نباتات

نام دانشجو:

حمید رضا لطفی

تحت عنوان

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های زیتون ایرانی در استان کرمانشاه با استفاده از نشانگر های مولکولی

در تاریخ ۸۷/۱۲/۵ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه **عالی** به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول	دکتر کیانوش چقامیرزا	با مرتبه ی علمی استاد یار	امضاء
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر عزت اله فرشاد فر	با مرتبه ی علمی استاد	امضاء
۳- استاد مشاور	دکتر عیسی ارجی	با مرتبه ی علمی استادیار	امضاء
۴- استاد داور داخل گروه	دکتر صحبت بهرامی نژاد	با مرتبه ی علمی استادیار	امضاء
۵- استاد داور خارج از گروه	دکتر محسن فرشاد فر	با مرتبه ی علمی استادیار	امضاء

من لم یشکرالمخلوق لم یشکرالخالق

تقدیر و تشکر:

سپاس و آفرین مرخدای کامران و کامکار و آفریننده زمین و آسمان را که در پرتو لایزالش توفیق آموختن میسر گردید تا منت‌پذیر آستان کبریایش گردم. رحمت واسعه‌اش فرصتی داد تا به اقتضای توان و وسع خود از محضر اساتید گرانقدر بهره جویم و ره توشه از بار علمی ایشان برگیرم. در این بین از استاتید راهنمای محترم خود، **آقایان دکتر کیانوش چقامیرزا** و **دکتر عزت‌اله فرشادفر** که به مثابه معلمانی دلسوز در این مقطع تحصیلی و انجام این پایان نامه از راهنماییهای ارزنده ایشان همیشه برخوردار بوده‌ام، سپاسگزاری می‌کنم.

از جناب آقای **دکتر عیسی ارجی** که در مقام استاد مشاور همچون برادری بزرگوار و دوستی صمیمی در تمام مراحل انجام پایان نامه در کنارم بودند و تواضع را از ایشان آموختم، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین از ریاست و کارکنان محترم مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه بخصوص جناب آقای **مهندس ابوالمحسن حاجی امیری** به خاطر همکاری بی دریغشان در جهت انجام این تحقیق کمال تشکر را دارم.

از آقایان **دکتر صحبت بهرامی نژاد** مدیریت محترم گروه اصلاح نباتات و **دکتر محسن فرشاد فر** به خاطر قبول زحمت داوری و مطالعه دقیق این پایان نامه و رهنمودها و پیشنهادهای ارزنده شان صمیمانه قدردانی می‌کنم.

تشکر از مسئولین آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت دانشکده کشاورزی **خانم مهندس یاقوتی پور، خانم دکتر زارعی** و **خانم مهندس محمودی** را به خاطر همکاری در جهت انجام این تحقیق بر خود لازم می دانم.

نسبت به دوستان و همکلاسی های گرامیم آقایان **رسول امیریان، علی مرادی پیام، مهدی گراوندی، مهدی آقایی نژاد، محمد جواد دهنوی، پژمان ملکی، بهنام آریان، نوید جوادی نیا،** و **داوود کاظمی** ابراز تشکر داشته و از خداوند منان برای ایشان کسب موفقیت و کامیابی را در تمام مراحل زندگی خواستارم.

در پایان از همسرم به پاس یاری و همکاری صبورانه اش در تدوین و نگارش این تحقیق و از تلاشهای بی دریغ خواهرم در به ثمر رسیدن این امر کمال تشکر را دارم.

الهی به حرمت آن نام که تو خوانی

عظمت آن صفت که تو چنانی

دریاب که می‌توانی

تقدیم به:

پدر بزرگوارم

که استقامت و پشتکارش شهامت زیستن و تلاش را در من پرورش داد

مادرم

آیینه افتادگی، مهربانی، صبر و پارسایی که زندگی ام همه برایش رنج بود و وجودش برایم همه مهر

برادرم

امید و ستون زندگی ام

خواهرانم

واژه های پرمعنای زندگی ام

و همسرم

چکیده

زیتون، از درختان مقدس دیرینه ای است که کشت آن از زمان ساسانیان در ایران شروع شده و دارای ارزش زیستی، اقتصادی و دینی است که به عنوان مظهر صلح و دوستی بشر معروف می باشد. شناخت کمی و کیفی تنوع ژنتیکی، اهمیت زیادی در علوم ژنتیک و اصلاح نباتات دارد و وجود تنوع ژنتیکی شانس موفقیت برنامه های اصلاحی را افزایش می دهد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۷۰ نمونه شامل ۴۰ نمونه بومی استان کرمانشاه و ۳۰ رقم مهم ایرانی و خارجی موجود در استان کرمانشاه بوسیله دو نشانگر مولکولی (RAPD و ISSR) و صفات مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفته است. استخراج DNA با استفاده از روش تغییریافته دویل و دویل انجام شد. در روش RAPD در مجموع ۵۰۴ باند توسط ۳۴ آغازگر تصادفی تکثیر شدند که ۴۱۲ باند (۸۱/۷۵ درصد) چند شکل بود. میانگین باند تولید شده برای هر پرایمر ۱۴/۸۲ بود. در روش ISSR در مجموع ۱۲۶ باند توسط ۸ آغازگر ISSR بکار رفته، تکثیر شدند که از میان آنها ۱۱۸ باند (۹۳/۶۵ درصد) چند شکل بود. میانگین باند تولید شده برای هر پرایمر ۱۵/۷۵ بود. در ترکیب داده های دو نشانگر نیز تعداد ۶۳۰ باند (۱۵ باند به ازاء هر آغازگر) تولید شدند که تعداد ۵۳۰ (۸۴/۱۳ درصد) باند چند شکل بودند. با استفاده از نشانگر RAPD ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۲۷۹ تا ۱ متغیر بود و در تجزیه خوشه ای با روش UPGMA، ۷ گروه تشکیل شد. همچنین در نشانگر ISSR تغییرات ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۲۸۴ تا ۱ بود و در تجزیه خوشه ای با روش UPGMA، ۵ گروه تشکیل شد. در ترکیب نشانگرهای RAPD و ISSR ضریب تشابه جاکارد بین ۰/۳ تا ۱ تغییرات نشان داد و در تجزیه خوشه ای با روش UPGMA، ۷ گروه تشکیل شد. آزمون همبستگی مانتل بیانگر همبستگی معنی دار بین ماتریس تشابه دو نشانگر بود. در تجزیه خوشه ای ۴۷ نمونه از کل نمونه ها با استفاده از صفات کمی، ۵ گروه تشکیل شد و آزمون همبستگی مانتل بیانگر همبستگی معنی دار بین ماتریس تشابه نشانگر های مولکولی و صفات کمی بود. با توجه به دندروگرام های ترسیم شده، گروهبندی ها بر اساس نشانگر های مولکولی و صفات کمی، تصویر واضحی از پراکنش جغرافیایی نمونه ها ارائه نداد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، زیتون، نشانگر RAPD، نشانگر ISSR ، استان کرمانشاه

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲-کلیات ۵

۱-۲-۱- تاریخچه ومبدا زیتون در جهان ۵

۱-۲-۲- تاریخچه زیتون در ایران ۶

۱-۲-۳- نیاز های اکولوژیکی زیتون ۷

۱-۲-۴- اهمیت اقتصادی و اجتماعی زیتون در جهان ۹

۱-۲-۵- اهمیت اقتصادی و اجتماعی زیتون در ایران ۱۰

۱-۲-۶- گیاهشناسی زیتون ۱۱

۱-۲-۷- ریخت شناسی درخت زیتون ۱۲

۱-۲-۸- تکثیر زیتون ۱۶

۱-۲-۹- اهداف اصلاحی در زیتون ۱۷

۱-۲-۱۰- بررسی تنوع در ژنوتیپ ها و ارقام زیتون ۱۹

۱-۲-۱۱- تنوع ژنتیکی و ضرورت مطالعه آن ۲۱

۱-۲-۱۲- زیست شناسی مولکولی ۲۴

۱-۲-۱۳- نشانگرهای ریخت شناسی ۲۵

۱-۲-۱۳-۱- نشانگر های مولکولی ۲۵

۱-۲-۱۳-۲- نشانگرهای پروتئینی ۲۶

۱-۲-۱۴- نشانگرهای دی.ان.ای ۲۸

۱-۲-۱۴-۱- نشانگر های غیر مبتنی بر PCR ۲۹

۱-۲-۱۴-۱-۱ تفاوت طول قطعات ناشی از هضم (RFLP) ۲۹

۱-۲-۱۴-۱-۲ پویش ژنومی نشانه های هضم (RLGS) ۲۹

۱-۲-۱۴-۲- نشانگر های مبتنی بر PCR ۳۰

۱-۲-۱۴-۲- ۱- تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر(AFLP) ۳۰

عنوان | صفحه

۱-۲-۱۴-۲- ۲- ریز ماهواره ها (SSR) ۳۱
۱-۲-۱۴-۲- ۳- نشانگر STS ۳۲
۱-۲-۱۴-۲- ۴- نشانگر های EST و SNP ۳۲
۱-۲-۱۴-۲- ۵- دی.ان.ای چند شکلی تکثیر شده تصادفی(RAPD) ۳۳
۱-۲-۱۵- بررسی تحقیقات مرتبط با زیتون و استفاده از نشانگر RAPD ۳۶
۱-۲-۱۶- تحقیقات مرتبط با سایرمحصولات باغی و زراعی با استفاده از نشانگر RAPD ۴۱
۱-۲-۱۷- تکثیر نواحی بین ریز ماهواره ای یا بین توالی های تکراری ساده(ISSR) ۵۹
۱-۲-۱۷-۱- مزایای نشانگر های بین ریز ماهواره ای ۶۰
۱-۲-۱۷-۲- محدودیت های ISSR و راهکار های رفع آن ۶۲
۱-۲-۱۸- بررسی تحقیقات مرتبط با زیتون و استفاده از نشانگر ISSR ۶۳
۱-۲-۱۹- تحقیقات مرتبط با سایرمحصولات باغی و زراعی با استفاده از نشانگر ISSR ۶۴
۱-۲-۲۰- تجزیه تنوع ژنتیکی ۷۰
۱-۲-۲۱- روش‌های گروه‌بندی داده‌ها ۷۰
۱-۲-۲۲- تجزیه خوشه‌ای ۷۱
۱-۲-۲۳- ضریب کوفنتیک ۷۳
۱-۲-۲۴- تخمین فاصله و شباهت ژنتیکی ۷۴
۱-۲-۲۵- تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) ۷۷

فصل دوم: مواد و روش ها ۷۹

۲-۱- مواد گیاهی ۸۰
۲-۲- استخراج DNA ۸۲
۲-۲-۱- استخراج DNAی ژنومی از گیاه زیتون ۸۲
۲-۲-۲- مواد مورد نیاز برای استخراج DNA ۸۳
۲-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۸۵
۲-۴- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۸۶
۲-۵- الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده ۸۹

عنوان | صفحه

۲-۶- رتبه‌بندی داده‌های حاصل از الکتروفورز ۹۰

۲-۷- تجزیه و تحلیل داده های مورفولوژیکی ۹۰

۳-۸- تجزیه و تحلیل داده های مولکولی ۹۱

فصل سوم: نتایج و بحث ۹۲

۳-۱- نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی ۹۳

۳-۱-۱- نتایج حاصل از نشانگر RAPD ۹۳

۳-۱-۲- نتایج حاصل از نشانگر ISSR ۹۸

۳-۱-۳- نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR ۱۰۱

۳-۲- تجزیه و تحلیل داده های مولکولی ۱۰۲

۳-۲-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر RAPD برای ۷۰ نمونه زیتون ۱۰۴

۳-۲-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر نمونه های زیتون با استفاده از داده های حاصل از نشانگرRAPD ۱۰۴

۳-۲-۳- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی براساس نشانگر RAPD ۱۰۷

۳-۲-۴- بررسی ماتریس تشابه جاکارد بر اساس داده های حاصل از نشانگر ISSR ۱۱۰

۳-۲-۵- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس داده های حاصل از نشانگر ISSR ۱۱۰

۳-۲-۶- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی براساس داده های حاصل از نشانگر ISSR ۱۱۲

۳-۲-۷- بررسی ماتریس تشابه جاکارد بر اساس داده های حاصل از ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۱۱۵

۳-۲-۸- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس داده های حاصل از ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۱۱۵

۳-۲-۹- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی براساس داده های حاصل از ترکیب دو نشانگرRAPD و ISSR ۱۱۸

۳-۳- بررسی همبستگی بین ماتریس های تشابه داده های مولکولی حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR ۱۲۱

۳-۴- نتایج حاصل از بررسی داده های کمی ۱۲۲

۳-۴-۱ نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای نمونه های زیتون بر اساس صفات مورفولوژیکی(داده های کمی) ۱۲۵

۳ -۴-۲- بررسی همبستگی بین ماتریس های تشابه داده های مولکولی و زراعی۴۷ نمونه زیتون ۱۲۸

۳-۴-۲-۱-مقایسه ماتریس های تشابه حاصل از داده های نشانگر RAPD و داده های زراعی ۱۲۸

۳-۴-۲-۲- مقایسه ماتریس های تشابه حاصل از داده های نشانگر ISSR و داده های زراعی ۱۲۹

۳-۴-۲-۳- مقایسه ماتریس های تشابه حاصل از ترکیب دو نشانگر RAPDو ISSR وداده های زراعی..... ۱۳۰

عنوان صفحه

۳-۵- نتیجه گیری و پیشنهادات ۱۳۲

پیوست ها ۱۳۵
منابع ۱۵۴

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

زیتون[۱]، از درختان مقدس دیرینه ای است که کشت آن از حدود پنج هزار سال قبل آغاز شده و دارای ارزش زیستی، اقتصادی و دینی است که به عنوان مظهر صلح و دوستی و آرامش بشر معروف می باشد. مورخین و متخصصین علوم کشاورزی، مرکز اولیه پیدایش زیتون را سرزمین گسترده ای شامل بخشهای شرقی و جنوب شرقی دریای مدیترانه و کشور های ایران، سوریه و ترکیه امروزی می دانند. سابقه کشت و کار زیتون در ایران بطور کامل مشخص نیست اما طبق شواهد تاریخی به قبل از زمان ساسانیان باز می گردد، طوری که برای درختان زیتون مالیات تعیین می کردند.

این گیاه از گیاهان مهم تولید کننده روغن با کیفیت بالا و کنسرو می باشد امروزه ایران با داشتن ۱۰۰,۰۰۰ هکتار سطح زیر کشت زیتون و تولید بیش از ۳۰۰۰ تن روغن در سال به عنوان یکی از کشور های مهم پرورش دهنده زیتون در جهان به حساب می آید. از اینرو نیاز مبرم به تحقیقات در زمینه گیاهان روغنی از جمله زیتون در کشور احساس می گردد زیرا دانه ها و میوه های روغنی مانند زیتون پس از غلات دومین ذخایر غذایی جهان را تشکیل می دهند. این محصولات علاوه بر داشتن ذخایر اسید چرب حاوی پروتئین نیز می باشند. یکی از برنامه های مهم وزارت جهاد کشاورزی، افزایش سطح زیر کشت زیتون به منظور تولید روغن و کنسرو است. برای رسیدن به این هدف، از طریق ریشه دار کردن قلمه های ارقام مختلف زیتون، نهال زیتون تولید می گردد، سپس نهال های تولید شده به مناطق مختلف کشور برای احداث باغ های زیتون ارسال می گردند.یکی از مشکلات این طرح، عدم شناسایی دقیق ارقام زیتون ایران و در نتیجه عدم یکنواختی در احداث باغ های زیتون کشور است. بنابراین تشخیص ارقام و جلوگیری از ورود گیاهان غیر هدف در طرح های توسعه کشت زیتون، بسیار ضروری است. برای نیل به خودکفایی در زمینه تولید روغن باید اقدام به کشت و گسترش ارقام پر محصول و با کیفیت بالا نمود که در این میان ژنوتیپ های بومی با توجه به قدمت و سازگاری با شرایط هر منطقه از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند و با شناسایی و بررسی آنها می توان در برنامه های اصلاحی از آنها استفاده کرد.

با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می رسد اولین گام جهت توسعه زیتون بررسی منابع ژنتیکی موجود در کشور باشد. ژنوتیپ های بومی موجود در هر منطقه ذخایر ارزشمندی هستند که از گذشتگان دور به ما به ارث رسیده اند و بر ماست که با مطالعه دقیق این ذخایر ویژگی های آنها را مشخص و از آنها بهره برداری

۱-*Olea europaea L.*

نماییم. برای انجام این امر ابتدا لازم و ضروری است که ارقام زیتون موجود در کشور و هر منطقه به طور دقیق شناسایی شده و سپس نسبت به تکثیر آنها اقدام گردد.

وجود درختان زیتون با قدمت زیاد ولی بطور پراکنده در برخی از استان ها سبب گردیده تا دستیابی به ارقام جدید و مناسب برای هر منطقه هموار تر گردد. منطقه گرم و نیمه گرمسیر استان کرمانشاه به عنوان یکی از قطب های مهم زیتون کاری کشور بدلیل قدمت و سابقه دیرین کشت و کار زیتون از غنای ژنتیکی بسیار بالایی بر خوردار است. ذخایر ژنی زیتون ایران یکی از ذخایر ژنی مهم جهان می باشد. تشخیص و حفظ واریته های مختلف زیتون ایران، مطالعات ژنتیکی بر روی آن ها را طلب می کند.

بررسی ژرم پلاسم هر محصول با توجه به سازگاری ژنوتیپ های موجود در هر منطقه از اهمیت زیادی بر خوردار می باشد. مطالعات زیادی در خارج از کشور برروی ژنوتیپ های بومی زیتون به عمل آمده است در حالیکه در کشور ما ایران، مطالعات بر روی درخت مقدس زیتون در ابتدای راه خود می باشد. در یک پروژه تحقیقاتی در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه اقدام به شناسایی، ارزیابی و جمع آوری ژنوتیپ های بومی شده است. در این تحقیق تعداد ۴۰ ژنوتیپ بومی استان کرمانشاه که سن برخی از آنها به چند صد سال می رسد، شناسایی شده و بررسی های مقدماتی بر اساس دستور العمل ارائه شده توسط شورای بین المللی روغن زیتون (IOOC)[۱] بر روی آنها صورت گرفته است. این ژنوتیپ ها شامل ۴۰ ژنوتیپ بومی از مناطق بان آواره، ده سفید، دشت دیره، بابایادگار، سرپل ذهاب و گیلانغرب در استان کرمانشاه هستند. از بین ژنوتیپ های ذکر شده، ۹ ژنوتیپ بعنوان ژنوتیپ های امید بخش معرفی شده اند ودر دستور کار مطالعات بعدی قرار دارند. به منظور شناسایی بهتر این ژنوتیپ ها ضرورت دارد از روش های دقیق تر استفاده کرد وآنها را از نظر تنوع بررسی و با سایر ارقام مقایسه کرد.

بطور کلی شناسایی ارقام و ژنوتیپ ها به دو روش صورت می گیرد: ریخت شناسی[۲] و مولکولی[۳]. بسیاری از صفات ریخت شناسی تحت تاثیر شرایط محیطی، سن گیاه، سیستم پرورش و مرحله فنولوژیکی گیاهان قرار می گیرند اما شناسایی گیاهان بر اساس صفات ریخت شناسی مرحله اصلی طبقه بندی ژرم پلاسم همه گیاهان از جمله زیتون است. از طرفی روش های مولکولی به صورت یک روش تکمیلی قادرند ما را در تشخیص دقیق تر صفات و طبقه بندی گیاهان کمک نمایند. با توجه به عدم امکان شناخت ارقام مختلف زیتون در مراحل نونهالی، تنوع زیاد در بین ارقام زیتون وتفاوتهای ریخت شناسی در پیکره هر گیاه، شناسایی آنها به ویژه در مراحل نونهالی با کمک روش های دقیق مولکولی، ضروری به نظر می رسد. اهمیت این موضوع زمانی بیشترمشخص می گردد که به نا کارآمد بودن روش های شناسایی ریخت شناسی در متمایز ساختن ارقام بویژه در مراحل نونهالی درختان و بویژه در درخت زیتون واقف شویم.

۱-International Olive Oil Council

۲-Morphology

۳-Molecular

روش های مولکولی متفاوتی برای تشخیص و بررسی تنوع ارقام مختلف گیاهی وجود دارد. اولین نشانگر[۱] مولکولی برای تشخیص و شناسایی ارقام، RAPD[۲] بود. از تکنیک RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم و شناسایی ارقام زیتون استفاده شده است. روش RAPD نشان داده است که شناسایی چند شکلی[۳] ژنتیکی در زیتون، در جمعیت های متنوع که از ارقام مشابه از نظر ریخت شناسی تشکیل شده اند، نیز مقدور است. این نشانگر به تکثیر تصادفی قطعات DNA ژنومی به وسیله آغازگر های منفرد (معمولا ۱۰ نوکلئوتیدی)، بدون نیاز به داشتن آگاهی از توالی های ژنومی برای طراحی آغازگر ها، می پردازد. عدم نیاز به تکنولوژی پیشرفته، میزان هزینه و کار کمتر، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه ها، تجزیه و تحلیل سریع و آسان تعداد زیادی نمونه، عدم استفاده از مواد خطرناک رادیواکتیو و... از جمله برخی مزایای این روش است. همچنین از سال ۱۹۹۴ نشانگر مولکولی جدیدی بنام ISSR[۴] معرفی شد. این نشانگر تصادفی بوده و از تکرار پذیری و چند شکلی بالایی برخوزدار است و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد. آغازگر های مورد استفاده در این نشانگر مکمل توالی های ریز ماهواره ای هستند. این روش برای شناسایی و بررسی تنوع ارقام مختلف، در دامنه وسیعی از گیاهان، از جمله زیتون کاربرد دارد. این روش همانند روش RAPD دارای فن ساده ومزایای فراوانی است.

هدف از انجام این تحقیق، شناسائی و بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های زیتون بومی استان کرمانشاه و مقایسه آنها با ارقام ایرانی و خارجی موجود در ایستگاه تحقیقات زیتون دالاهو شهرستان سر پل ذهاب استان کرمانشاه، در سطح DNA و با استفاده از دو نشانگر RAPD و ISSR می باشد. نتایج این بررسی می تواند در بهبود عملیات اصلاحی و رده بندی ارقام زیتون استان کرمانشاه، مفید واقع شود. همچنین با توجه به اهمیت ژرم پلاسم در دنیا، قدم مهمی در ثبت ژرم پلاسم زیتون بومی استان کرمانشاه برداشته خواهد شد. با توجه به اینکه در کشور ما فعالیت های اصلاحی زیادی در مورد درختان میوه خصوصا درخت زیتون انجام نشده است نتایج این تحقیق می تواند بعنوان یک گام اساسی برای مطالعات اصلاحی بعدی، تلقی گردد.

۱-Marker

۲ - Random Amplified Polymorphic DNA

۳-Polymorphism

٤ -Inter Simple Sequence Repeat

۱-۲-کلیات

۱-۲-۱- تاریخچه ومبدا زیتون در جهان

زیتون، از درختان مقدس دیرینه ای است که کشت آن از حدود پنج هزار سال قبل آغاز شده و دارای ارزش زیستی، اقتصادی و دینی است که به عنوان مظهر صلح و دوستی و آرامش بشر معروف می باشد. مورخین و متخصصین علوم کشاورزی، مرکز اولیه پیدایش زیتون را سرزمین گسترده ای شامل بخشهای شرقی و جنوب شرقی دریای مدیترانه و کشور های ایران، سوریه و ترکیه امروزی می دانند. سومری ها اولین قومی بودند که توسعه کشت زیتون را در سرزمین های شرق دریای مدیترانه آغاز نمودند. دوکاندول، تاریخ شناس مشهور، منشاء اصلی این گیاه را سوریه ذکر می کند اما فتلیه مبداء آن را آسیای صغیر و انتقال به اروپا را مربوط به عهد فوسین ها می داند.

این گیاه تدریجا به کشور های حوزه دریای مدیترانه برده شد. وجود اقلیم های مناسب و سازگار برای کشت زیتون، امکان توسعه باغ های زیتون را در این کشور ها میسر ساخت. ارزش غذایی، زیست محیطی، دارویی و کارآفرینی زیتون موجب شد که به تدریج این درخت مفید از کشور های حوزه مدیترانه به مناطق دیگر در دنیا برده شود. به عقیده برخی از صاحب نظران موطن اصلی زیتون ایتالیا است و از آنجا به سایر نقاط حاشیه مدیترانه برده شده است ولی فرضیه قابل قبول همان نظریه دوکاندول است که مبداء پیدایش زیتون را سوریه و ایران و مسیر پ آن را از مشرق به مغرب در طول و عرض حوزه مدیترانه دانسته است (۲۳).

زیتون با اقلیم های مدیترانه ای و شبه مدیترانه ای سازگار است و به همین دلیل بیشترین باغات زیتون دنیا در اطراف دریای مدیترانه دیده می شوند. آشنایی و بهره برداری از آن در خاور میانه و منطقه مدیترانه با پیدایش اولین انسان های متمدن در شرق مدیترانه همزمان بوده است که قدمت آن به بیش از ۶۰۰۰ سال می رسد. قدیمی ترین مدارک مستند تاریخی در مورد زیتون لوح های گلی مربوط به زمان مینوس[۱]، پادشاه کرت است که ۳۵۰۰ سال قدمت دارد و در این لوح ها اطلاعات جالبی در مورد گونه های مختلف زیتون و بازرگانی آن ها ثبت شده است. استفاده از روغن زیتون در بسیاری از مذاهب و فرهنگ ها توصیه شده است. مبلغان مسیحی به همراه انگور، درخت زیتون را به کالیفرنیا، برای استفاده در مراسم و مصارف عمومی می بردند. از روغن زیتون به عنوان روغن مقدس در کلیسا برای غسل تعمید استفاده می شود (۴۵).

۱-Minos

۱-۲-۲- تاریخچه زیتون در ایران

قدمت درخت زیتون در ایران به حدود دو هزار سال پیش بر می گردد و تاریخ کاشت زیتون در منطقه رودبار ۹۰۰ سال تخمین زده شده است. زیتون در ایران از زمان ساسانیان به عنوان درختی مقدس مورد استفاده قرار گرفته است و در کتاب خدای نامک نیز به آن اشاره شده است. برخی از مولفین گونه هایی از زیتون را بومی ایران می دانند، نظیر ژنوتیپ هایی که در کوههای بارز، به ویژه در منطقه امیر آباد مسکون یا در اطراف بافت وجود دارند.

منابع تاریخی روسی گویای وجود باغ های وسیع در حاشیه رودخانه های ارس و کر در قرن ۱۳ میلادی می باشد که در اثر حمله مغول ها از بین رفته اند. با بررسی رویشگاه های کنونی زیتون در ایران می توان اطلاعاتی بدست آورد. مثلا در علی آباد گرگان درختان زیتونی با عمر بیش از ۱۰۰۰ سال وجود دارند که این درختان پاجوش های درختان بسیار قدیمی تری هستند که به احتمال قوی حدود ۲۰۰۰ سال پیش به طور منظم به دست بشر کاشته شده اند.

وجود تک درخت ها یا مجموعه هایی از درختان در بسیاری از نقاط کشور مانند کازرون، شیراز، مسجد سلیمان، خارک، گرگان، تهران و... در زمین های سنگلاخی و نامناسب و درختانی با بیش از ۵۰۰ سال سن در بعضی از اماکن مقدس ایران گواه بر این موضوع است که این مناطق می توانند برای توسعه کاشت زیتون در نظر گرفته شوند (۴۶).

طباطبایی(۱۳۶۶)، در منطقه بختیاری، روستای سونک در اطراف لردکان و در منطقه زیتی که شاید نام آن نیز از درخت زیتون گرفته شده باشد، به درختان کهنسال زیتونی بر خورده است که بیش از ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ سال عمر داشته اند اما منشاء ورود آنها به منطقه چندان روشن نبوده است. کشت زیتون در ایران طبق روایات معتبر از حدود ۹۰۰ سال پیش در دره الیزه از طوابع رودبار علیا آغاز گردیده و به تدریج در بخشهای طارم سفلی و علیا گسترش یافته است (۲۳).

بررسی و مطالعه مناطق مهم زیتون کاری فعلی دنیا مانند تونس، مراکش، یونان، ایتالیا، اسپانیا و... نشان می دهد که بسیاری از مناطق ایران از نظر اقلیمی و خاکی مشابه یکی از مناطق ذکر شده می باشند. هم اکنون روستاهای زیادی در ایران وجود دارند (مانند زیت، زید، زیران و...) که با کمی مطالعه و جستجو در تاریخچه و قدمت آنها می توان دریافت که نام خود را از باغ های باشکوه زیتون موجود در گذشته دور به ارث برده اند. حتی وجود زیتون های خودروی فروجینا[1] و اونچری[2] در سرتا سر کوه های زاگرس و جنوب ایران موجب شده است که بعضی از دانشمندان، ایران را خاستگاه زیتون بدانند (۴۵).

۱- *Olea ferrugina*

۲- *Olea oncheri*.

۱-۲-۳- نیاز های اکولوژیکی زیتون

مطالعه تطبیق نیازمندی های زیتون و ویژگی های منحصر به فرد آن مانند نیاز به آهک برای رشد و نمو مطلوب، مقاومت در مقابل خشکی های دوره ای و تحمل یا مقاومت در برابر شوری خاک نشان دهنده این مطلب است که بسیاری از نقاط کشور ایران برای توسعه زیتون مناسب هستند و حتی مناطقی که سایر محصولات کشاورزی تولید مطلوبی ندارند، زیتون محصول قابل قبولی تولید می کند. درختانی که از کلون های رویشی تکثیر شده اند، تحت مدیریت صحیح از ۳ تا ۴ سالگی بارور شده و میوه دهی آنها برای صدها سال ادامه می یابد.

زیتون درختی است بسیار مقاوم و بی تفاوت به نوع خاکی که در آن کاشته می شود اما رطوبت زیاد را تحمل نمی کند. در زمین های غنی و خوب آبیاری شده، محصول فراوان می دهد و از طرفی آب و هوای خشک و باد های شدید را بخوبی تحمل می کند. با آنکه در اغلب مناطق کشور درختان زیتون کم و بیش مشاهده می شوند اما از نظر اقتصادی تا کنون تنها مرکز مهم زیتون کاری کشور منطقه رودبار بوده است. سطح زیر کشت این منطقه حدود ۳۰۰۰۰ هکتار و تعداد درختان موجود در این منطقه ۹۰۰۰۰۰ اصله تخمین زده می شود. به علت پراکنده بودن درختان در کنار جویبارها و رودخانه ها و یکنواخت نبودن تراکم در واحد سطح نمی توان رقم صحیحی از سطح زیر کشت آن را برآورد نمود.

زیتون یک درخت همیشه سبز، با اندازه ای متوسط، دارای رشد بطئی و زندگی طولانی است. عمر طولانی درخت زیتون به دلیل وجود غده بن های غنی از جوانه نابجا است که قادر به تولید شاخه های جدید می باشند. درخت زیتون از آب و هوای خشک، گرم و نیمه گرمسیری منشاء گرفته و سازگاری زیادی با شرایط خاک (رسی و کم عمق) و دما های بالا دارد.این درخت بهترین فعالیت را در آب و هوای معتدل و خشک و بدون افت دمایی زیاد و طولانی مدت (خصوصا زیر ۱۰ °C-) در طول زمستان دارد (۴۶).

دما: زیتون طالب آب و هوای مدیترانه ای می باشد. میانگین دما در فصل رشد ۲۵ °C- ۲۰ و میانگین دمای سالانه ۲۵ °C- ۱۵ جهت رشد زیتون مطلوب می باشد. حداقل دمای قابل تحمل گیاه ۵ °C- است. در دمای ۹ °C- شاخه های جوان زیتون از بین می روند و در دمای ۱۲ °C- درخت به کلی خشک می گردد. حداکثر دمای قابل تحمل گیاه ۴۰ °C + است. حداکثر دما در تابستان چندان برای درخت زیتون، به شرط وجود رطوبت کافی در خاک، مهم نیست. درجه حرارت اثر بسیار مهمی بر وضعیت گلدهی درخت دارد (۱۹و۲۳).

سرمای بهاره اثر چندانی روی درخت زیتون ندارد زیرا گل ها در این گیاه دیر باز می شوند اما سرمای پاییزه می تواند باعث از بین رفتن میوه شود. برای تشکیل و رشد و نمو جوانه گل درخت زیتون به ۶۰ روز دمای صفر درجه در شب و دمای ۱۲ °C- ۱۰ در روز نیاز دارد. نیاز سرمایی ارقام مختلف متفاوت بوده و

بین ۲۰۰ تا ۱۲۰۰ ساعت دمای کمتر از ۱۰ °C است. نیاز سرمایی این درخت کم بوده و با حضور برگها در دمای ۱۳- °C ۱۰ صورت می گیرد (۴۶).

دمای مناسب برای تلقیح گلهای زیتون ۲۸- °C ۲۳ است و دمای بیش از ۳۰ °C باعث عدم تلقیح گلها و ایجاد پارتنوکارپی در میوه زیتون می گردد. زیتون در مناطق حاره و نیمه حاره به خوبی رشد می کند اما به دلیل نبودن سرمای زمستانه کافی و عدم استراحت درخت، محصول نمی دهد. در این مناطق رشد سریع و مداوم درخت، تعادل فیزیولوژیکی آن را به هم زده و درخت زود تر پیر و فرسوده می شود (۶۲).

رطوبت هوا: مناسبترین میزان رطوبت نسبی هوا برای عمل لقاح زیتون در حدود ۴۰ درصد می باشد و بیشتر از این میزان خطر آفرین نیست اما نباید کمتر از این میزان باشد (۴۵).

آب: میزان آب جهت آبیاری یک هکتار باغ زیتون بسته به نوع خاک و میزان بارندگی سالیانه از ۶۰۰۰ تا ۷۵۰۰ متر مکعب در سال متغیر است. در مناطقی که میزان بارندگی سالیانه ۵۰۰ میلی متر یا بیشتر باشد می توان زیتون را به صورت دیم کاشت و در مقادیر کمتر از این میزان بارندگی میزان محصول کاهش یافته و جنبه اقتصادی ندارد. در کمتر از ۵۰۰ میلی متر بارندگی گیاه فقط رشد رویشی دارد و در صورت تشکیل میوه، اکثرا میوه ها یک ماه پس از تشکیل، ریزش پیدا خواهند کرد. بهترین میزان بارندگی برای این گیاه ۸۰۰- ۶۰۰ میلی متر است. درخت زیتون به رطوبت بالا حساس بوده و رطوبت زیاد باعث رشد و حمله بیماریهای باکتریایی و قارچی در این درخت می گردد (۴۶).

خاک: زیتون به طیف وسیعی از خاکها سازگار است. خاک های دارای نفوذ پذیری کافی و فاقد آب زیر زمینی مناسب زیتون کاری هستند. زیتون خاک های کمی آهکی و غنی از مواد غذایی را به خوبی تحمل می کند و نسبت به آهک فعال خاک مقاوم است. خاک رسی شنی با زهکش خوب، عمیق و حاصلخیز با pH خاک ۸/۵-۶/۵ بهترین خاک برای این گیاه است. بهترین pH برای جذب عناصر غذایی توسط ریشه زیتون ۷ تا ۷/۵ است (۴۶). عمق لایه حاصلخیزی خاک بیشتر از یک متر و عمق آب زیر زمینی بیشتر از دو متر مطلوب ترین حالت برای درخت زیتون است. خاکهای کمی آهکی را می پسندد و شوری را تا حدودی تحمل می کند اما زمین های مرطوب را به هیچ وجه نمی پسندد زیرا زمین های مرطوب باعث خفگی ریشه های زیتون می گردد. زیتون در خاکهای تا هدایت الکتریکی ۳ میلی موس بر سانتی متر عوارض یا کاهش عملکرد از خود نشان نمی دهد اما در خاکهایی با هدایت الکتریکی ۴ میلی موس بر سانتی متر به میزان ۱۰ درصد و در هدایت الکتریکی ۸/۵ میلی موس بر سانتی متر ۵۰ درصد از عملکرد آن کاسته می شود (۱۹ ، ۲۳ و ۶۹).

ارتفاع: مهمترین مکانهای کشت زیتون در دنیا در ارتفاعات ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ متری از سطح دریا قرار دارند اما در بعضی کشورها مانند اسپانیا، فرانسه، ایتالیا و... از صفر تا ۹۰۰ متری از سطح دریا نیز باغهای زیتون مشاهده می شود. بطور استثنا در کشور برزیل نیز تا ارتفاع ۱۸۰۰ متری نیز باغات زیتون مشاهده می شود.

عرض جغرافیایی: بهترین مناطق کشت زیتون در عرض جغرافیایی ۴۵- ۳۰ درجه واقع شده اند.

دوره تابش خورشیدی: بهترین دوره تابش خورشیدی جهت رشد درختان زیتون ۳۵۰۰-۲۶۰۰ ساعت در سال می باشد.

شیب زمین: در مناطقی که شیب زمین بیش از ۱۲ درصد است باید درختان را روی تراس کاشت. بهترین شیب جهت رشد درختان زیتون شیب ۱۷- ۱۰ درصد می باشد. کشت زیتون در ارتفاعات بالاتر از ۸۰۰ متر در شیب های رو به جنوب و در ارتفاعات پایین تر از ۶۰۰ متر در شیب های رو به شمال توصیه می شود (۲۳ و۴۶).

۱-۲-٤- اهمیت اقتصادی و اجتماعی زیتون در جهان

بیش از ۷۰ درصد روغن های مصرفی دنیا را روغن های گیاهی تشکیل می دهند که به علت افزایش تقاضا، روند تولیدآنها رو به افزایش می باشد. در حدود ۴۰ گونه گیاهی وجود دارند که می توان از آن ها روغن گیاهی تهیه نمود، اما در کشاورزی تعداد محدودی از این گیاهان به منظور تولید روغن کشت می شوند. مهم ترین این گیاهان عبارتند از: سویا، آفتابگردان، کلزا، زیتون و پالم (نخل روغنی) که در مجموع ۷۰ درصد روغن های گیاهی را تشکیل می دهند. در بین روغن های گیاهی روغن زیتون با داشتن ترکیب مناسب از جمله داشتن ویتامین A و آنتی اکسیدان های فراوان، جزو بهترین روغن های دنیاست (۴۶و ۱۲۸).

سطح زیر کشت زیتون در جهان بیش از ۱۰ میلیون هکتار است که در ۶۰ درصد از مناطق به عنوان محصول اصلی کشت می شود. در برآوردی تقریبی تخمین زده می شود که بیش از ۸۰۰ میلیون اصله درخت زیتون در سراسر جهان کاشته شده که متوسط عملکرد سالیانه آنها ۱۰ میلیون تن میوه زیتون می باشد. بیشتر این مقدار در تولید روغن به کار می رود و کمتر از ۱۰ درصد آن بصورت مصرف کنسروی مورد استفاده قرار می گیرد. بیشتر باغ های زیتون دنیا در منطقه مدیترانه قرار دارند. تولید زیتون در این مناطق عمدتا در کشور های اسپانیا، یونان و ایتالیا بوده که تقریبا ۹۹ درصد روغن زیتون دنیا و بیش از ۸۰ درصد تولید کنسروی دنیا را به خود اختصاص می دهند.

گرچه مهمترین هدف کشت زیتون مصرف کنسروی و تولید روغن است اما حفاظت از گونه های آن نیز مهم است. در برخی از کشور های حوزه مدیترانه وجود درختان زیتون در کنار درخت سرو جنبه مذهبی دارد. در این نواحی زیتون از معدود گونه های است که دارای خصوصیاتی همچون مقاومت به خشکی