



Evaluation of genetic relationships among promising and commercial olive varieties using gene-targeted CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers

Sedigheh Fabriki-Ourang

* Assistant Professor, Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Tel: +989195382099, Email: s.ourang910@gmail.com

Majid Golmohammadie

M.S. member, Horticulture Crops Research Department, Qazvin Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Qazvin, Iran.

Email: m_golmohammadie_ir@yahoo.com

Hamid Karimi

M.Sc. Student, Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: hamid.karimi126@gmail.com

Abstract

Objective

The olive is considered as one of the most important horticultural crops, with more abundant number of cultivars. Thus, the aim of this research was to study the genetic diversity in a set of olive cultivars in Taroum station of Iran.

Materials and methods

In this research, 25 CBDP markers were used to study the genetic diversity and relationships of 20 promising and commercial Iranian and foreign varieties of olive.

Results

The 25 used primers amplified a total of 755 polymorph alleles, and the mean of PIC and MI indices were 0.941 and 5.64, respectively, indicating the high efficiency and differentiation power of CBDP markers. The genetic parameters of Nei and Shannon indices were higher in foreign cultivars than those of Iranian cultivars. The high gene flow (4.46) was observed among olive cultivars, which confirmed the low values of the

inter-population differentiation (Gst) and FsT indices. Analysis of molecular variance (AMOVA) differentiated the total genetic variation into inter-group (Iranian and foreign cultivars) (17%) and within-group (83%) diversity. The cluster analysis using Dice coefficient and UPGMA method divided the Iranian and foreign cultivars into five groups, which the promising cultivar T24 and Koroneiki with the maximum difference with others were placed in separate groups. The Principal Coordinate Analysis (PCoA) was able to distinguish promising Iranian cultivars from the other commercial cultivars. The population structure analysis confirmed the results of the cluster and PCoA analysis and clearly separated the two groups of Iranian and foreign cultivars.

Conclusions

In conclusion, it was observed that the promising cultivar T24 with having a genetic similarity to both groups of Iranian and foreign cultivars can be a suitable candidate for commercialization with complementary characteristics of both groups. Also, it is recommended to use this marker to study the genetic diversity of other olive varieties.

Keywords: CAAT box, Informative Marker, Promising cultivar, Structure analysis.

Citation: Fabriki-Ourang S, Golmohammadi M, Karimi H (2019) Evaluation of genetic relationships among promising and commercial olive varieties using gene-targeted CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 10 (4), 93-110.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 93-110.

DOI: 10.22103/jab.2019.2251

Received: September 3, 2018; Accepted: December 13, 2018

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ارزیابی روابط ژنتیکی ارقام امیدبخش و تجاری زیتون با استفاده از چند شکلی نشانگرهای

هدفمند مبتنی بر جعبه CAAT ژن‌ها (CBDP)

صدیقه فابریکی اورنگ

* نویسنده مسئول، استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی^(ع)، قزوین، ایران. تلفن ۰۹۱۹۵۳۸۲۰۹۹، ایمیل:s.ourang910@gmail.com

مجید گلمحمدی

عضو هیات علمی، بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی، قزوین، ایران. ایمیل:

m_golmohammadie_ir@yahoo.com

حمید کریمی

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی^(ع)، قزوین، ایران. ایمیل: —hamid.karimi126@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۲

چکیده

هدف: زیتون به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان باغی دارای تعداد ارقام فراوانی در جهان است. لذا، هدف این پژوهش، مطالعه تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای از ارقام زیتون ایستگاه طارم ایران بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از ۲۵ نشانگر CBDP برای بررسی روابط و تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم زیتون تجاری و امیدبخش ایرانی و خارجی استفاده شد.

نتایج: ۲۵ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۷۵۵ قطعه (آلل) چند شکل تکثیر دادند و میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) آغازگرها به ترتیب ۰/۹۴۱ و ۵/۶۴ بود که بیانگر کارایی و قدرت تمایز بالای نشانگرهای CBDP می‌باشد. پارامترهای ژنتیکی تنوع ژنی نی (H) و شاخص شانون (I) در ارقام خارجی نسبت به ارقام ایرانی بالاتر بودند. جریان ژنی (NM) بالایی (۴/۴۶) بین ارقام زیتون مشاهده شد که این نتیجه مقادیر پایین شاخص‌های تمایز بین جمعیتی (Gst) و Fst را تایید کرد. تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) به ترتیب ۱۷ و ۸۳ درصد از تغییرات کل ژنتیکی را به تنوع بین گروهی (ارقام ایرانی و خارجی) و درون گروهی تفکیک کرد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA ارقام ایرانی و خارجی را در پنج گروه قرار داد که رقم امیدبخش T24 و رقم خارجی Koroneiki با حداکثر تفاوت با بقیه هر کدام در یک گروه

جداگانه قرار گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) توانست به خوبی ارقام امیدبخش ایرانی را از ارقام تجاری ایرانی و خارجی تفکیک کند. تجزیه ساختار (Structure) ژنتیکی جمعیت نیز نتایج حاصل از تجزیه کلاستر و PCoA را تایید کرد و دو گروه ارقام ایرانی و خارجی به وضوح از هم تفکیک شدند.

نتیجه گیری: در جمع بندی کلی مشاهده شد که رقم امیدبخش T24 با دارا بودن شباهت ژنتیکی مشترک به هر دو گروه ارقام ایرانی و خارجی می تواند رقم کاندید مناسبی جهت تجاری سازی با دارا بودن خصوصیات مکمل هر دو گروه باشد. همچنین استفاده از نشانگرهای CBDP برای بررسی تنوع ژنتیکی سایر ارقام زیتون نیز توصیه می شود.

کلمات کلیدی: تجزیه ساختار، جعبه CAAT، رقم امیدبخش، نشانگر آگاهی بخش.

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) درختی با قابلیت رشد و تولید محصول در زمین های سنگلاخی و کم بازده به عنوان یکی از اولین و قدیمی ترین درختان میوه محسوب می شود. طولانی بودن مرحله جوانی (بیش از ۱۵ سال)، دشواری دستکاری ژنتیکی، پیچیدگی ژنتیکی با داشتن ۴۶ کروموزم ($2x=2n=46$) و نیز فقدان اطلاعات ژنتیکی؛ اصلاح زیتون را با مشکلاتی روبرو می کند. از این رو شناخت تنوع ژنتیکی ارقام زیتون برای موفقیت دراز مدت در بهبود آن و نیز یافتن ارقام متحمل به تنش های محیطی امری ضروری است که بهره وری از ژرمپلاسم را می تواند به حداکثر برساند (Belaj et al. 2002). با توجه به محدود بودن ارقام تجاری در مناطق زیتون کاری ایران، جمع آوری و ارزیابی ژرمپلاسم بومی کشور و نیز ارزیابی سازگاری ارقام وارداتی به منظور معرفی ارقام و ژنوتیپ های سازگار با این مناطق و گسترش باغات زیتون امری ضروری است.

در این خصوص از نشانگرهای مولکولی متعددی برای ارزیابی منابع ژرمپلاسمی زیتون استفاده شده است. به عنوان نمونه در ارزیابی ژنوتیپ های زیتون متعلق به مناطق مختلف ترکیه با نشانگر مولکولی SSR، تنوع بالایی در ژرمپلاسم مورد مطالعه گزارش شده است (Sakar et al. 2016). در تحقیقی مشابه، نشانگرهای ISSR و RAPD توانستند درختان زیتون وحشی و نیز جمعیت های طبیعی مربوط به مناطق مختلف ترکیه را تفکیک نمایند؛ به طوری که براساس نشانگر RAPD ژنوتیپ های وحشی متمایز شدند در حالی که نشانگر ISSR برای تعیین تنوع ژنتیکی در جمعیت های طبیعی مناسب بود. در این تحقیق زیتون های وحشی Dikili Bademli و Milas Pinarcik بر اساس نتایج حاصل از نشانگر ISSR از لحاظ ژنتیکی مشابهت داشتند؛ در حالی که از مناطق جغرافیایی مختلفی بودند. زیتون های وحشی با دارا بودن ژن های مقاومت در اصلاح برای انواع تنش ها اهمیت دارند، بنابراین استفاده از چنین نشانگرهایی در گزینش برای انواع ژن ها در این ژنوتیپ ها موثر خواهد بود (Sesli & Yegenoglu 2017). همچنین نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR به عنوان ابزاری قدرتمند برای طبقه بندی کولتیوارهای مختلف زیتون متعلق به کشور پرتغال و نیز چند نمونه خارجی گزارش شده است؛ به طوری که نمونه های مورد بررسی بر اساس

ناحیه جغرافیایی تفکیک و بر اساس نتایج، آغازگرهای آگاهی‌بخش معرفی شده است (Gomes et al. 2009). بررسی زیتون‌های ایرانی و نمونه‌های خارجی با نشانگرهای ریزماهوره نشان داده است که نمونه‌های ایرانی از کولتیوارهای متعلق به سوریه و نیز سایر نمونه‌ها تفکیک شده‌اند و حاکی از این است که منشاء کولتیوارهای ایرانی از کولتیوارهای غرب دریای مدیترانه متفاوت بوده و مستقل از سایرین رشد و نمو یافته‌اند (Omran-Sabbaghi et al. 2007).

از نشانگرهای مولکولی قدرتمند که ژن‌ها را هدف قرار می‌دهند؛ می‌توان به نشانگر CDBP^۱ اشاره نمود. آغازگرهای این نشانگر از جعبه CAAT ناحیه پیش‌برنده ژن‌ها طراحی می‌شوند (Singh et al. 2014). جعبه CAAT با توالی توافقی GGCCAATCT تقریباً در ۸۰ جفت‌بازی بالادست کدون آغاز در ژن‌های یوکاریوتی واقع شده است که نقش مهمی در فرآیند رونویسی ایفا می‌کند (Benoist et al. 1980). نوکلئوتیدهای CAAT در ناحیه مرکزی جعبه CAAT حفاظت شده بوده و در اغلب موارد قبل از نوکلئوتیدهای CAAT نوکلئوتید C قرار گرفته است (Shahmuradov et al. 2003). نشانگرهای CDBP، از تنوع موجود در نواحی غنی از ژن (gene-rich) ژنوم‌های گیاهی مشتق شده‌اند و از تکرارپذیری بالایی برخوردار هستند. از سوی دیگر، استفاده از آنها آسان و نیاز به آگاهی از توالی ژنوم ندارد و همچنین نشانگرهای یادشده از نواحی عملکردی ژنوم تولید می‌شوند. مجموع ویژگی‌های ذکر شده سبب می‌شود که نشانگرهای CDBP در برنامه‌های اصلاحی گیاهان نظیر شناسایی ژنوتیپ، تهیه نقشه‌های پیوستگی و QTL بسیار مفید واقع شوند. از این نشانگر در مطالعه کولتیوارهای کتان (Singh et al., 2014)، گندم دوروم (Heidari et al. 2017; Etminan et al. 2018) و ژنوتیپ‌های Jojoba (Heikrujam et al. 2015) استفاده شده است.

با توجه به اهمیت ژنوتیپ‌های مختلف زیتون و حفظ و نگهداری آنها به‌منظور گسترش باغات زیتون‌کاری، ضرورت گروه-بندی ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف زیتون در ایران و استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی، در تحقیق حاضر از نشانگرهای CDBP با هدف مطالعه روابط و تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام زیتون موجود در ایران استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۰ رقم زیتون (۱۰ رقم ایرانی و خارجی و ۱۰ رقم یا لاین امیدبخش) با استفاده از ۲۵ نشانگر CDBP (Singh et al. 2014) (جدول ۲) مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه ارقام مورد مطالعه از ایستگاه تحقیقاتی طارم (زنجان) به صورت نمونه‌های برگ‌ی جمع‌آوری شدند (جدول ۱). استخراج DNA ژنومی با روش CTAB (Doyle & Doyle 1987) انجام گرفت و کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با ژل آگارز ۰/۸ درصد و نیز روش اسپکتروفتومتریک (Nanodrop, Bio-Rad) براساس میزان جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای

1. CAAT box- derived polymorphism; CDBP

هر کدام از آغازگرهای مورد مطالعه با روش شیب دمایی انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش IX (Amplicon)، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، یک میکرولیتر آغازگر (۰/۴ میکرومولار) و یک میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم) انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس در دستگاه ترموسایکلر (Techne-5000) با برنامه دمایی شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR در ژل آگارز ۳ درصد تفکیک و به‌منظور مشاهده قطعات تکثیر یافته، با (sinaclon) safe stain رنگ‌آمیزی شد و سپس براساس وجود باند (۱) و عدم وجود باند (۰) امتیازدهی شدند.

جدول ۱. اسامی، سطح پلوئیدی و خاستگاه ارقام زیتون تجاری و امیدبخش ایرانی و خارجی

Table 1. The names, ploidy level and origins of Iranian and foreign promising and commercial olive cultivars

کد	رقم امیدبخش	سطح پلوئیدی	خاستگاه	کد	رقم تجاری	سطح پلوئیدی	خاستگاه
Code	Promising cultivar	Ploidy level	Origin	Code	Commercial cultivar	Ploidy level	Origin
1	T2	2x	Iran	11	Zard	2x	Iran
2	T6	2x	Iran	12	Roghani	2x	Iran
3	T7	2x	Iran	13	Mari	2x	Iran
4	T10	2x	Iran	14	Beladi	2x	Lebanon
5	T17	2x	Iran	15	Mission	2x	USA
6	T19	2x	Iran	16	Manzanilla	2x	Spain
7	T20	2x	Iran	17	Koroneiki	2x	Greece
8	T21	2x	Iran	18	Kalamata	2x	Greece
9	T18	2x	Iran	19	Corfolia	2x	Spain
10	T24	2x	Iran	20	Abou-satl	2x	Syria

به‌منظور بررسی کارایی آغازگرهای مورد استفاده در تعیین تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت مورد مطالعه، شاخص محتوای چند شکلی (PIC^۱) و شاخص نشانگری (MI^۲) محاسبه گردید. برای بررسی تنوع موجود در جمعیت، شاخص‌های تنوع ژنی نی

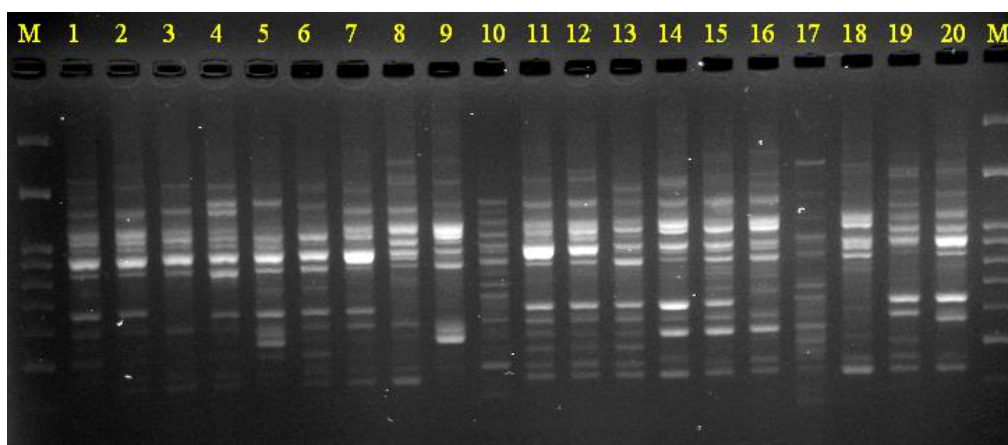
1. Polymorphic Information Content; PIC

2. Marker index; MI

(He^۱)، شاخص تنوع ژنی شانون (I^۲)، شاخص تعداد آل موثر (Ne^۳) و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA^۴) با استفاده از نرم افزار GenAIEX (ver. 6.501) محاسبه شدند. تجزیه ساختار جمعیت مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار STRUCTURE 2.3.4 انجام گرفت. شاخص‌های تمایز بین جمعیت (Gst^۵) و جریان ژنی (NM) با استفاده از نرم افزار POPGENE 32 محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای به منظور گروه‌بندی جمعیت براساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS pc 2 انجام و دندروگرام ترسیم گردید.

نتایج و بحث

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم امیدبخش و تجاری زیتون ایرانی و خارجی با ۲۵ آغازگر CBDP مورد مطالعه قرار گرفت. ۲۵ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۷۵۶ قطعه بانندی (آلل) متفاوت با اندازه بین ۳۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز تکثیر دادند که ۷۵۵ قطعه چند شکل بوده و میانگین چند شکلی باندها ۹۹/۸ درصد بود. نمونه الگوی بانندی تکثیر شده توسط آغازگر CAAT13 در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. الگوی بانندی تکثیر شده توسط آغازگر CAAT13 برای ارقام امیدبخش و تجاری زیتون ایرانی و خارجی. M: نشانگر اندازه ملکولی 100bp (sinaclon)

Figure 1. Banding pattern amplified by CAAT13 primer for promising and commercial varieties of Iranian and foreign olive. M: 100bp ladder (sinaclon)

1. Nei's genetic diversity; He
2. Shannon's information index; I
3. Effective number of alleles; Ne
4. Principal coordinate analysis; PCoA
5. Coefficient of gene differentiation; Gst

میانگین تعداد قطعات تکثیری برای آغازگرها برابر ۳۰/۲۴ بود و در بین آغازگرهای استفاده شده، آغازگر CAAT8 دارای کمترین قطعه تکثیری (۱۲) و آغازگرهای CAAT2 و CAAT2 (۴۵ و ۴۶) بیشترین تعداد قطعات را تکثیر کردند. در بین آغازگرهای مورد استفاده CAAT2، CAAT13، CAAT14 و CAAT52 دارای بیشترین (۰/۹۶۸) و CAAT1 و CAAT8 دارای کمترین (۰/۸۸۱) محتوای چند شکلی اطلاعات (PIC) با میانگین ۰/۹۴۱ بودند. در توافق و تایید بالا بودن PIC آغازگرهای CBDP در این تحقیق، در مطالعه ۱۷ ژنوتیپ نر و ماده گیاه جو با نشانگرهای SCOT و CBDP نیز میانگین PIC بالاتری برای نشانگرهای CBDP گزارش شده است (Heikrujam 2015). در بین شاخص‌های بیانگر کارایی یک سیستم نشانگری، شاخص PIC از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا این شاخص قابلیت سیستم نشانگری در تعیین پتانسیل آغازگرهای استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد (Powell et al. 1996). به عبارت دیگر شاخص PIC احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر بین دو فرد می‌باشد که به تعداد آل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است. به طور کلی مقدار PIC بین صفر و ۰/۲۵ نشان دهنده تنوع ژنتیکی خیلی پایین، PIC بین ۰/۲۵ و ۰/۵ نشان دهنده تنوع ژنتیکی متوسط و PIC بالاتر از ۰/۵ بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد (Tams et al. 2005). بنابراین تمام آغازگرهای CBDP استفاده شده در این تحقیق توانایی بالایی در تفکیک و ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام داشتند زیرا مقادیر PIC همه آغازگرها بیش از ۰/۸۸ بودند.

مقادیر بالای PIC آغازگرهای CBDP در مقایسه با سایر نشانگرها در تحقیقات مختلف نظیر ISSR و RAPD در مریم گلی (Yousefiazar-Khanian et al. 2015)، AFLP در گندم (Bohn et al. 1999)، SCoT در تعدادی از گیاهان (Rajesh et al. 2015; Etminan et al. 2018; Pour-Aboughadareh et al. 2017, 2018) و SSR در زیتون (Biton et al. 2012; Marra et al. 2013; Gismondi & Canini 2013) کارایی بالای نشانگرهای CBDP را نشان می‌دهد. میانگین شاخص نشانگری (MI) برای آغازگرهای CBDP ۵/۶۴ بود و آغازگر CAAT13 بیشترین (۸/۶) و آغازگر CAAT22 کمترین (۲/۵) شاخص MI را نشان دادند (جدول ۲) که نشان‌دهنده قدرت تمایز این نشانگر در تفکیک ارقام و ژنوتیپ‌های زیتون مورد مطالعه بود (Landjeva et al. 2006).

نتایج حاصل از برآورد پارامترهای ژنتیکی به تفکیک برای ارقام ایرانی و خارجی در جدول ۳ نشان داده شده است. تعداد آل‌های مشاهده شده دارای میانگین ۱/۴۹۷ بود و ارقام خارجی با متوسط ۱/۵۱ تعداد آل مشاهده شده بالاتری نسبت به ارقام ایرانی (۱/۴۸) داشتند. متوسط تعداد آل‌های موثر نیز برابر با ۱/۳۰۴ بود که ارقام خارجی با میانگین ۱/۳۱ دارای تعداد آل موثر بیشتری نسبت به ارقام ایرانی (۱/۲۹) بودند. تعداد قطعه تکثیر شده متفاوت در ارقام ایرانی (۵۷۵) بیشتر از ارقام خارجی (۵۶۵) بود و همچنین تعداد آل اختصاصی هر جمعیت در ارقام ایرانی برابر ۱۹۱ و در ارقام خارجی برابر ۱۸۱ آل بود.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای CDBP (Singh et al. 2014) مورد استفاده در این مطالعه و شاخص‌های

محاسبه شده برای آغازگرها

Table 2. Characteristics of CDBP primers (Singh et al. 2014) used in this study and calculated indices for primers

نام آغازگر	توالی آغازگر	TNB	NL	NPL	EMR	MI	PIC
Primer name	Primer sequence						
CAAT1	TGAGCACGATCCAATAGC	97	18	18	3.88	3.44	0.88
CAAT2	TGAGCACGATCCAATAAT	203	46	46	8.12	7.86	0.96
CAAT3	TGAGCACGATCCAATACC	219	25	25	8.76	8.27	0.94
CAAT4	TGAGCACGATCCAATAAG	159	29	29	6.36	6.01	0.94
CAAT5	TGAGCACGATCCAATCTA	174	27	27	6.96	6.60	0.94
CAAT6	TGAGCACGATCCAATCAG	159	23	22	6.08	5.61	0.92
CAAT7	TGAGCACGATCCAATCGA	127	29	29	5.08	4.78	0.94
CAAT8	TGAGCACGATCCAATCGG	115	12	12	4.6	4.05	0.88
CAAT9	TGAGCACGATCCAATGAT	136	29	29	5.44	5.09	0.93
CAAT10	TGAGCACGATCCAAT GTT	145	37	37	5.8	5.54	0.95
CAAT10	TGAGCACGATCCAATTGC	177	32	32	7.08	6.74	0.95
CAAT12	TGAGCACGATCCAATATA	169	36	36	6.76	6.45	0.95
CAAT13	TGAGCACGATCCAATGAG	224	45	45	8.96	8.60	0.96
CAAT14	TGAGCACGATCCAATGCG	211	40	40	8.44	8.11	0.96
CAAT15	TGAGCACGATCCAATTGA	143	24	24	5.72	5.38	0.94
CAAT16	TGAGCACGATCCAATTCA	116	28	28	4.64	4.33	0.93
CAAT17	TGAGCACGATCCAATTTG	141	28	28	5.64	5.26	0.93
CAAT18	CTGAGCACGATCCAATAG	186	31	31	7.44	7.08	0.95
CAAT19	CTGAGCACGATCCAATAC	96	30	30	3.84	3.63	0.94
CAAT20	CTGAGCACGATCCAATAT	99	22	22	3.96	3.71	0.93
CAAT21	CTGAGCACGATCCAATCA	169	36	36	6.76	6.43	0.95
CAAT22	CTGAGCACGATCCAATCG	68	17	17	2.72	2.50	0.91
CAAT23	CTGAGCACGATCCAATGG	133	37	37	5.32	5.02	0.94
CAAT24	CTGAGCACGATCCAATGA	123	31	31	4.92	4.67	0.94
CAAT25	CTGAGCACGATCCAATGT	154	44	44	6.16	5.95	0.96
Mean		149.7	30.24	30.2	5.97	5.64	0.94

EMR و TNB، NPL، NL، MI، PIC: به ترتیب شاخص‌های محتوای چند شکلی اطلاعات، شاخص نشانگری، تعداد آلل،

تعداد آلل چندشکل، تعداد کل قطعات تکثیر شده و نسبت مجموع موثر (تعداد متوسط باند برای هر ژنوتیپ) می‌باشند.

دو پارامتر ژنتیکی شاخص تنوع ژنی نی و شاخص شانون نسبت به سایر پارامترها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و مقادیر بالای این دو شاخص بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد ارزیابی است. ارقام خارجی از نظر هر دو شاخص نی و شانون از مقادیر بالاتری (به ترتیب ۰/۲۱۶ و ۰/۳۱۸) نسبت به ارقام ایرانی (به ترتیب ۰/۱۹۵ و ۰/۲۹۹) برخوردار بودند. این شاخص‌ها نشان دادند که تنوع آلی و ژنتیکی در بین ارقام خارجی بیشتر از ارقام ایرانی است. وجود تنوع ژنتیکی بیشتر در ارقام خارجی می‌تواند به این دلیل باشد که این ارقام مورد مطالعه خارجی به بخش‌های وسیعی با اقلیم‌های متفاوت از سراسر جهان که در طول تکامل و سازگاری به مناطق رشدی خود از نظر برخی از ژن‌ها و حتی آلل‌ها دستخوش تغییرات ژنتیکی شده‌اند که به موازات آن تنوع آلی آن افزایش یافته است. البته تنوع ژنتیکی بالای ارقام ایرانی (با اختلاف بسیار کمتر از ارقام خارجی) نیز قابل توجه و حائز اهمیت است؛ به‌ویژه این‌که ایران در رشته کوه‌های زاگرس و جنوب کشور خاستگاه اولیه برخی از گونه‌های زیتون مانند *O. ocherry* و *O. ferrugina* بوده است. به‌طور کلی ماهیت دگرگرده‌افشانی و بروز جهش و تأثیر عوامل محیطی از جمله عوامل موثر بر ایجاد تنوع در ارقام زیتون شناخته شده‌است (Rouppervander et al. 1998). با محاسبه شاخص جریان ژنی (NM)، جریان ژنی بالایی (۴/۴۶) بین ارقام زیتون مشاهده شد که این نتیجه مقادیر محاسبه شده پایین برای شاخص‌های تمایز بین جمعیتی (Gst) و Fst با مقدار کم ۰/۱ را تایید کرد. در این رابطه نتایج حاصل از مطالعه روی گیاه *Dacryodes edulis* رابطه عکس دو شاخص FsT و NM را به خوبی تایید می‌کند (Donfagsiteli et al. 2016).

بررسی ماتریس ضرایب تشابه دایس (جدول ۴) نشان داد که ارقام Koroneiki و Beladi دارای کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۲) و در مقابل ارقام Zard و Roghani دارای بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۷۴) بودند. جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین کننده فاصله ژنتیکی می‌باشد و در گونه‌های دگرگشن به علت جریان ژنی بالا، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها کم بوده و تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر است (Chumacero et al. 2013). تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) (جدول ۵) نشان داد که ۱۷ درصد از تغییرات کل داده‌ها مربوط به تنوع بین دو گروه ارقام ایرانی و ارقام خارجی بوده و ۸۳ درصد از سهم تغییرات مربوط به تنوع ژنتیکی درون گروهی می‌باشد. در توافق با این آزمایش، در مطالعه تنوع ژنتیکی دو گروه زیتون روغنی و زیتون وحشی ایتالیایی با نشانگرهای SSR از طریق تجزیه واریانس ملکولی، تنوع بین گروهی ۱۸ درصد و تنوع درون گروهی ۸۲ درصد گزارش شده است (Chiappetta et al. 2017). در مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۰۳ رقم زیتون با استفاده از نشانگر RAPD نیز تنوع بالایی را در داخل گروه‌ها گزارش شده‌است (Belaj et al. 2002). همچنین در تطابق با این نتیجه، Linos et al. (2014) نیز تنوع درون گروهی بالایی را با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR و SSR در ۱۰۱ رقم زیتون گزارش کرده‌اند. بالا بودن تنوع ژنتیکی مشاهده شده درون گروهی بین ارقام مورد ارزیابی زیتون می‌تواند به دلیل زمینه ژنتیکی بسیار متفاوت درون ارقام ایرانی و خارجی و همچنین منشاء ژنتیکی متفاوت آن‌ها باشد که آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق به خوبی قادر بودند این تنوع را نشان دهند.

جدول ۳. برآورد پارامترهای ژنتیکی در ارقام زیتون ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

Table 3. Estimation of genetic parameters in Iranian and foreign olive cultivars using CBDP markers

کل Total	ارقام خارجی Foreign cultivars	ارقام ایرانی Iranian cultivars	پارامتر ژنتیکی Genetic parameter
1.497±0.022	1.51±0.03	1.48±0.03	تعداد آل‌های مشاهده شده (Na) No. of Different Alleles
1.304±0.008	1.31±0.01	1.29±0.01	تعداد آل‌های مؤثر (Ne) No. of Effective Alleles (Ne)
0.308±0.006	0.318±0.009	0.299±0.009	شاخص شانون (I) Shannon's Index (I)
0.26±0.01	0.216±0.006	0.195±0.006	تنوع ژنتیکی نی (H) Nei genetic diversity (H)
	565	575	تعداد آل تکثیری متفاوت No. of Different Bands
	181	191	تعداد آل اختصاصی هر جمعیت No. Private Bands

جدول ۴. ماتریس تشابه دایس بین ارقام امیدبخش و تجاری زیتون ایرانی و خارجی

Table 4. The Dice similarity matrix between promising and commercial cultivars of Iranian and foreign olive

Cultivar	T2	T6	T7	T1	T1	T1	T1	T2	T2	T2	Zar	Ro	Mar	Bel	Miss	Man	Kor	Kal	Cor	Abo	
T2	1																				
T6	0.6	1																			
T7	0.5	0.6	1																		
T10	0.5	0.5	0.6	1																	
T17	0.4	0.5	0.6	0.6	1																
T18	0.4	0.4	0.5	0.6	0.6	1															
T19	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	1														
T20	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	1													
T21	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	1												
T24	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	1											
Zard	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	1										
RoGhani	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.7	1									
Mari	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	1								
Beladi	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.2	0.4	0.4	0.5	1							
Mission	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	1						
Manzanil	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.66	1					
Koroneik	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.28	0.32	1				
Kalamata	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.46	0.5	0.32	1			
Corfolia	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.4	0.47	0.33	0.5	1		
Abou-satl	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.33	0.34	0.33	0.5	0.5	1	

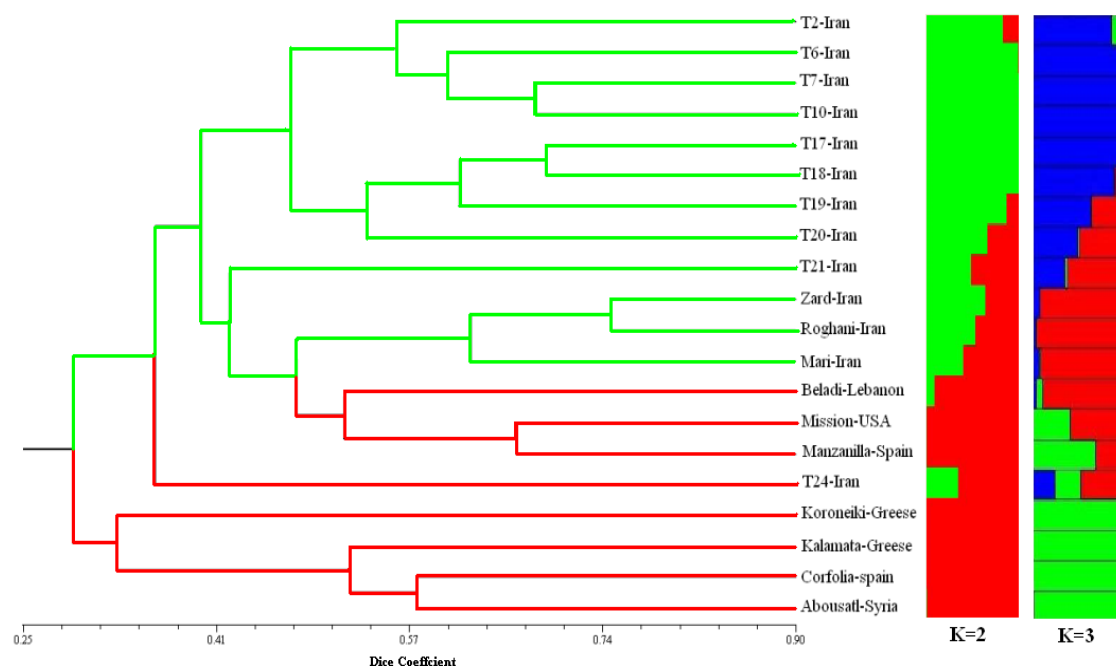
جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ارقام زیتون با استفاده از نشانگرهای CBDP

Table 5. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of olive cultivars using CBDP markers

درصد تغییرات Variation%	واریانس برآورد شده Estimated Variance	میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی (d.f)	منبع تغییرات (S.O.V)
17	21.96	303.65	1	بین گروه‌ها (Among groups)
83	103.77	103.77	18	درون گروهی (Within group)
100	125.74		19	کل Total

تنوع و روابط ژنتیکی بین ارقام زیتون مورد مطالعه با روش‌های تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه کلاستر روشی قوی و مفید برای ارزیابی روابط ژنتیکی افراد و ژنوتیپ‌ها می‌باشد (Randi & Lucchini, 2002). تجزیه خوشه‌ای ارقام زیتون با استفاده از ضرایب تشابه دایس و روش UPGMA توانست ارقام خارجی و ایرانی را به پنج گروه تقسیم کند (شکل ۲) و دندروگرام ترسیم شده دارای ضریب کوفنتیک ۰/۸۵ بود. ضریب کوفنتیک بالاتر از ۰/۸ برآزش قوی دندروگرام ترسیم شده را نشان می‌دهد (Rohlf 2000). گروه یک شامل ارقام امیدبخش ایرانی T2، T6، T7، T10، T17، T18، T19 و T20 بود. گروه دوم شامل سه رقم تجاری و یک رقم امید بخش ایرانی T21، Zard، Roghani، Mari به همراه سه رقم خارجی Mission، Beladi و Manzanila بود که نشان‌دهنده شباهت بالای ارقام خارجی یادشده به چهار رقم ایرانی می‌باشد. گروه سوم شامل تنها یک رقم امیدبخش ایرانی T24 و گروه چهارم شامل یک رقم خارجی Koroneiki بود که نشان دهنده تفاوت بالای این دو رقم با سایر ارقام می‌باشد. در گروه پنجم سه رقم خارجی Kalamata، Corfolia و Abousatl قرار گرفتند (شکل ۲). با توجه به الگوی گروه‌بندی ارقام مختلف مشاهده می‌شود که در برخی موارد ارقام مورد ارزیابی بر اساس منشاء جغرافیایی خود در گروه‌های جداگانه‌ای از یکدیگر متمایز شده‌اند. علاوه بر این حضور برخی از ارقام خارجی در کنار ارقام ایرانی در یک گروه و بالعکس نیز دور انتظار نبوده و با توجه به قدمت کشت و حضور ارقام خارجی در کنار ارقام ایرانی تا حدودی قابل پیش بینی بود. در این راستا در مطالعه Haouane et al. (2011) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای از ارقام زیتون و بررسی الگوی گروه‌بندی با منشاء جغرافیایی گزارش شده‌است که اگرچه در مواردی رابطه خطی و معنی‌داری بین الگوی گروه‌بندی و منشاء جغرافیایی ارقام مشاهده شد، با این حال بسیاری از ارقام مربوط به نواحی غربی و شرقی مدیترانه در کنار یکدیگر و در یک گروه قرار گرفتند. همچنین الگوی گروه‌بندی ارقام در بررسی Belaj et al. (2002) نیز نشان داد که بسیاری از ارقام زیتون مربوط به نواحی مرکزی مدیترانه با ارقام مربوط به نواحی غربی در یک گروه قرار گرفتند و در مقابل

برخی از ارقام از هر دو ناحیه در گروه‌های مجزایی از هم تفکیک شدند. قرارگرفتن ژنوتیپ‌های با منشأ جغرافیایی متفاوت در یک گروه را به عواملی مانند مهاجرت (Terral et al. 2004; Baldoni et al. 2006) و اصلاح هدفمند با استفاده از ارقام و ژرم پلاسما بومی و خارجی (Belaj et al. 2002; Sarri et al. 2006) نسبت داده‌اند.

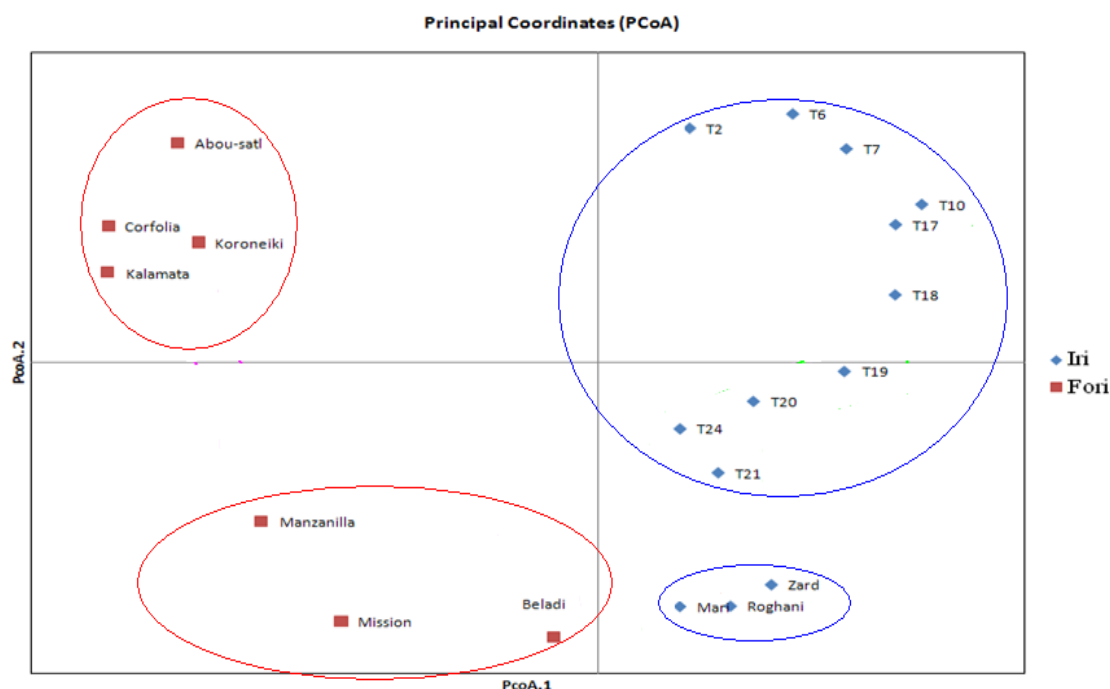


شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه دایس و گروه‌بندی حاصل از تجزیه ساختار جمعیت با $K=2$ و $K=3$ برای ارقام زیتون ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

Figure 2. Cluster analysis with UPGMA method and Dice similarity coefficient and the grouping using population structure analysis with $K = 2$ and $K = 3$ for Iranian and foreign olive cultivars using CBDP markers

جهت تأیید گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) انجام و نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. همانند تجزیه کلاستر، تجزیه به مختصات اصلی نیز توانست به خوبی دو گروه ارقام خارجی و ایرانی را از هم تفکیک نماید. همچنین تجزیه PCoA به خوبی توانست ارقام امیدبخش ایرانی را از ارقام تجاری ایرانی تفکیک کند و در نتیجه متفاوت بودن ارقام امیدبخش ایرانی را از ارقام تجاری ایرانی نشان داد (شکل ۳). از طرف دیگر تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت در ارقام مورد مطالعه با $K=2$ (شکل ۲) توانست نتایج حاصل از تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی را تأیید کند و دو گروه ارقام ایرانی و خارجی را به وضوح از هم تفکیک کند. تجزیه ساختار با $K=3$ نیز به خوبی توانست شباهت ژرم پلاسمای ارقام امیدبخش را با ارقام تجاری ایرانی و خارجی نشان دهد و مشاهده شد که رقم امیدبخش T24 با دارا بودن شباهت ژنتیکی به هر دو

گروه ارقام ایرانی و خارجی می‌تواند رقم ترکیبی کاندید مناسبی با دارا بودن خصوصیات مکمل هر دو گروه ارقام ایرانی و خارجی باشد (شکل ۲).



شکل ۳. بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ارقام زیتون ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

Figure 3. Biplot of principal coordinate analysis (PCoA) for Iranian and foreign olive cultivars using CBDP markers

نتیجه‌گیری

در این تحقیق کارایی و قدرت تمایز نشانگرهای CBDP با توجه به بالا بودن میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) آغازگرهای مورد استفاده تأیید شد. تنوع ژنی نی و شاخص شانون در ارقام خارجی نسبت به ارقام ایرانی بیشتر بودند. جریان ژنی بالایی بین ارقام زیتون مشاهده شد و با تجزیه واریانس ملکولی ۸۳ درصد از تغییرات ژنتیکی کل توسط تنوع درون گروهی ارقام ایرانی و خارجی توجیه شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) توانست به خوبی ارقام امیدبخش ایرانی را از ارقام تجاری ایرانی و خارجی تفکیک کند و رقم امیدبخش T24 و رقم خارجی Koroneiki با حداکثر تفاوت با بقیه هر کدام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. در جمع بندی کلی با تأیید میزان تنوع ژنتیکی بالا در ارقام زیتون ایرانی و خارجی و نیز تفاوت ارقام امیدبخش با ارقام تجاری مورد مطالعه، استنباط می‌گردد که رقم امیدبخش T24 با دارا بودن شباهت

ژنتیکی به هر دو گروه ارقام ایرانی و خارجی می‌تواند رقم کاندید مناسبی جهت تجاری سازی با دارا بودن خصوصیات مکمل هر دو گروه ارقام زیتون ایرانی و خارجی باشد.

سیاسگزارى

بدینوسیله از همکاران محترم آزمایشگاه ژنومیکس دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) که با فراهم ساختن امکانات آزمایشگاهی ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نماییم.

References

- Baldoni L, Tosti N, Ricciolini C et al. (2006) Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Ann Bot* 98, 935-942.
- Belaj A, Satovic Z, Rallo L, Trujillo I (2002) Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor Appl Genet* 105, 638-644.
- Benoist C, Ohare K, Breathnach R, Chambon P (1980) The ovalbumin gene sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res* 8, 127-142.
- Biton I, Shevtsov S, Ostersetzer O et al. (2012) Genetic relationships and hybrid vigour in olive (*Olea europaea* L.) by microsatellites. *Plant Breed* 131, 767-774.
- Bohn M, Utz HF, Melchinger AE (1999) Genetic similarities among wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci* 39, 228-237.
- Chiappetta A, Muto A, Muzzalupo R, Muzzalupo I (2017) New rapid procedure for genetic characterization of Italian wild olive (*Olea europaea*) and traceability of virgin olive oils by means of SSR markers. *Sci Hortic* 226, 42-49.
- Chumacero de Schawe C, Durka W, Tschardt T et al. (2013) Gene flow and genetic diversity in cultivated and wild cacao (*Theobroma cacao*) in Bolivia. *Am J Bot* 100, 2271-2279.
- Donfagsiteli TN, Waswa BW, Muchugi A et al. (2016) Genetic diversity and gene flow revealed by microsatellite DNA markers in some accessions of African Plum (*Dacryodes edulis*) in Cameroon. *Afr J Biotechnol* 15, 511-517.
- Doyle JJ, Doyle JK (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin* 19, 11-15.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Noori A et al. (2018) Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. *Biotech & Biotechnol Equi* 32, 610-617.

- Gismondi A, Canini A (2013) Microsatellite analysis of latial (*Olea europaea* L.) cultivars. Plant Biosyst 147, 686-691.
- Gomes S, Martins-Lopes P, Lopes J, Guedes-Pinto H (2009) Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. Plant Mol Biol Report 27, 365-373.
- Haouane H, El-Bakkali A, Moukhli A et al. (2011) Genetic structure and core collection of the world olive germplasm bank of marrakech: towards the optimized management and use of Mediterranean olive genetic resources. Genetica 139, 1083-1094.
- Heidari P, Etminan A, Azizinezhad R, Khosroshahli M (2017) Genomic variation studies in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) using CBDP, SCoT and ISSR markers. Indian J Genet Plant Breed 77, 379-386.
- Heikrujam M, Kumar J, Agrawal V (2015) Genetic diversity analysis among male and female jojoba genotypes employing gene targeted molecular markers, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. Meta Gene 5, 90-97.
- Landjeva S, Korzon V, Ganeva G (2006) Evaluation of genetic diversity among Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925-2003 using microsatellites. Genet Resour Crop Evol 53, 1605-1614.
- Linou A, Nikoloudakis N, Katsiotis A, Hagidimitriou M (2014) Genetic structure of the Greek olive germplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. Sci Hort 175, 33-43.
- Marra FP, Caruso T, Costa F et al. (2013) Genetic relationships, structure and parentage simulation among the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in southern Italy revealed by SSR markers. Tree Genet Genomes 9, 961-973.
- Omran-Sabbaghi A, Shahriari M, Falahati-Anbaran M et al. (2007) Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections. Sci Hort 112, 439-447.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA et al. (2017) Assessment of genetic diversity among Iranian Triticum germplasm using agro-morphological traits and start codon targeted (SCoT) markers. Cereal Res Commun 45, 574-586.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA et al. (2018) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some Aegilops and Triticum species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. Plant Biosyst 152, 694-703.
- Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breed 2, 225-238.
- Rajesh MK, Sabana AA, Rachana KE (2015) Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT Analysis. 3 bitech 5, 999-1006.

- Randi E, Lucchini V (2002) Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conserv Genet* 3, 29-43.
- Rolf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. NY: Exeter Publishing, Ltd. 1989.
- Roupevander JN, Van-Eck AM, Draaistravan J et al. (1998) An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol Breed* 4, 73-77.
- Sakar E, Unver H, Ercisli S (2016) Genetic diversity among historical olive (*Olea europaea* L.) genotypes from southern Anatolia based on SSR markers. *Biochem Genet* 54, 842-853.
- Sarri V, Baldoni L, Porceddu A et al. (2006) Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to defined populations. *Genome* 49, 1606-1615.
- Sesli M, Yegenoglu ED (2017) Genetic relationships in wild olives (*Olea europaea* ssp. *oleaster*) by ISSR and RAPD markers. *Biotechnol Biotechnol Equip* 31, 897-904.
- Shahmuradov IA, Gammerman AJ, Hancock JM et al. (2003) Plant Prom: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 31, 114-117.
- Singh AK, Rana MK, Singh S et al. (2014) CAAT box-derived polymorphism (CBDP): a novel promoter-targeted molecular marker for plants. *J Plant Biochem Biotechnol* 23, 175-183.
- Tams SH, Melchinger AE, Bauer E (2005) Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. *Plant Breed* 124, 154-160.
- Terral JF, Alonso N, Capdevila RB et al. (2004) Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material. *J Biogeogr* 31, 63-77.
- Yousefiazar-Khanian M, Asghari A, Ahmadi J et al. (2016) Genetic diversity of *Salvia* species assessed by ISSR and RAPD markers. *Not Bot Horti Agrobot* 44, 431-436.