پژوهش در علوم باغبانی
Journal of Reserch in Horticultural Science
جلد۱، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱ (ص۲۷۶-۲۶۳)
Vol. 1, No.2 Autumn and Winter 2022 (263-276)
تارنمای مجله: https://rhsj.areeo.ac.ir
مقاله علمی پژوهشی
10.22092/RHSJ.2023.361071.1045

بررسی میزان تنوع در رقم زیتون (*Olea europaea* L. CV. Zard) زرد با استفاده از ترکیب اسیدهای چرب و مارکرهای ریزماهواره

محمود عظیمی[1*] و عمار تقوی[2]

۱- استادیار بخش تحقیقات زراعی و باغی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی ارومیه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، دکترای بخش مولکولی آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک بیمارستان میلاد، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

چکیده

با توجه به پراکنش گسترده زیتون رقم زرد در ایران و استفاده از آن برای تولید روغن و تهیه کنسرو، مطالعه تنوع ژنتیکی در داخل این رقم ضروری می‌باشد. این پژوهش برای ارزیابی میزان تنوع در رقم زیتون (*Olea europaea* L.) زرد با استفاده از ترکیب اسیدهای چرب و مارکرهای ریزماهواره از سال ۱۳۸۱ به مدت پنج سال در منطقه طارم استان زنجان اجرا گردید. در این بررسی تک‌درخت‌های رقم زرد با کدهای st۱ تا st۱۱ و رقم زرد گلوله (st۲) به‌عنوان شاهد بودند. ابتدا ترکیب اسیدهای چرب روغن کلون‌ها اندازه‌گیری شد. برای استخراج DNA برگ‌های جوان کلون‌ها از روش CTAB تغییریافته استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط ۱۰ نشانگر اختصاصی زیتون انجام شد. برای محاسبه تعداد آلل‌ها، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص تثبیت ژنی، فراوانی آلل‌ها، شاخص اطلاعاتی شانون، احتمال یکسانی و تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها (AMOVA) از نرم‌افزار GeneAlex 6.41 استفاده شد. متوسط تعداد آلل در هر لوکوس ۳/۶۵، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی برای جمعیت کلون‌های زرد برابر با یک و متعلق به پنج مکان ژنی PUD099-011، PUD099-031، PUDO99-007، PUD099-039 و PssrOelGP7 و کم‌ترین میزان هتروزیگوسیتی برابر با ۰/۳۷۵ و متعلق به مکان ژنی PUDO99-036 بود. تغییرات اسیدهای چرب، مخصوصاً اسید چرب اولئیک در بین کلون‌های رقم زرد کم بود. از سوی دیگر چند شکلی‌های مشاهده شده برای کلون‌های رقم زرد نیز نشان داد که این کلون‌ها با همدیگر یکنواختی زیادی دارند.

واژگان کلیدی: زیتون، تنوع، اولئیک اسید، کلون، مارکر مولکولی

Evaluation of the intra-cultivar variation of the Zard olive cultivar (*Olea europaea* L. CV. Zard) using fatty acids composition and SSR markers

Mahmoud Azimi[1*] and Ammar Tagavi[2]

1-Agricultural and Horticultural Research Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural ResourcesResearch Center, AREEO, Urmia, Iran

2-Former master's student of Agriculture College of Zanjan University, PhD of Molecular Pathobiology and Genetics Laboratory of Milad Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Due to the widespread distribution of the Zard olive cultivar in Iran and its use for double-purpose, it is necessary to study the genetic diversity within this cultivar. To evaluate the amount of variation in the Zard olive (*Olea europaea* L.) cultivar, using the fatty acids combination and microsatellite markers, an experiment was carried out in 2002 for five years in the Tarom region of Zanjan province. This study used single trees of the Zard cultivar with the codes st1 to st11 and the Zard Golooleh cultivar (st2) as controls. First, the fatty acid composition of the evaluated clones was measured. To extract DNA from young leaves Clones of the Zard olive cultivar were used by the modified CTAB method. Polymerase chain reaction (PCR) was performed by 10 olive-specific markers. To calculate the number of alleles, observed and expected heterozygosity, gene stabilization index, and allele frequency. values, Shannon's information index, similarity probability, and analysis of molecular variance of the data (AMOVA) were used by GeneAlex 6.41 software. The average number of alleles per locus was 3.65, and the highest amount of heterozygosity for the population of Zard clones was equal to one and belongs to five gene locations PUD099-039, PUDO99-007, PUD099-031, PUD099-011 and PssrOelGP7 and the lowest amount of heterozygosity is equal to 0.375 and belonged to the location of PUDO99-036. The changes of fatty acids, especially oleic fatty acid was low among Zard clones. On the other hand, the polymorphisms observed for the clones of the Zard olive cultivar also showed that these clones were very uniform with each other.

Keywords: Mutation induction, EMS, Gamma radiation, Tissue culture, African violet

* نویسنده مسئول: azimiir@gmail.com

۱- مقدمه

زیتون یک درخت همیشه سبز و بومی آب و هوای نیمه‌خشک مدیترانه‌ای است. درختان زیتون در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت‌وکار می‌شوند (خوش‌زمان و همکاران، ۱۳۹۷). ارقام بومی زیتون متعددی در ایران شناخته شده است که در مناطق زیتون‌خیز کشور کشت و کار می‌شوند. مهم‌ترین این ارقام نیز زرد و روغنی هستند (Hosseini-Mazinani *et al.,* 2004). رقم زرد یکی از مهم‌ترین ارقام بومی زیتون ایران است که بیش از ۸۵ درصد سطح زیر کشت منطقه طارم استان زنجان را تشکیل می‌دهد. این رقم دومنظوره بوده و تحقیقات نشان داده است که از نظر کیفیت روغن یکی از مهم‌ترین ارقام تجاری به شمار می‌رود (زینانلو و همکاران، ۱۳۹۴).

یکی از روش‌های اصلاحی رایج در زیتون استفاده از به‌گزینی کلونی است. برنامه‌های به‌گزینی کلونی بر اساس معیارهای انتخابی متفاوتی مانند عملکرد بالا، کاهش تناوب باردهی و سهولت تکثیر رویشی برنامه‌ریزی می‌شود. سپس، کلون‌های انتخاب شده تکثیر و برای کاشت در مناطق توصیه شده توزیع می‌شوند (Gregoriou, 1996). برنامه به‌گزینی کلونی زیتون برای تحمل به آفات و بیماری‌های مهم زیتون مثل بیماری لکه طاووسی، پژمردگی ورتیسیلیومی و پروانه سرشاخه‌خوار زیتون برنامه‌ریزی و در کشورهای آمریکا و ایتالیا عملیاتی شده است (Fab-bri *et al.,* 2009). در برنامه به‌گزینی کلونی روی رقم Chemlali Sfax ، شش کلون با درصد روغن بالا در ماده خشک میوه، مقدار پلی‌فنل و اسید چرب اولئیک بیشتر انتخاب شد (Grati Kamoun *et al.,* 2002). دو رقم زیتون Haouzia و Menara از طریق به‌گزینی کلونی برای کشت در مراکش (Zaher *et al.,* 2011) انتخاب شدند. ارزیابی برنامه به‌گزینی کلونی رقم آربکین نشان داد امید بخش‌ترین کلون این رقم IRTA-i18 بود که در بهار سال ۱۹۹۸ به‌عنوان یک کلون تجاری مطلوب معرفی شد (Tous and Romero, 1999). لی‌تائو و همکاران (Leitao *et al.,* 1996) هم در برنامه به‌گزینی کلونی رقم Negrinha معیارهای عملکرد بالا و عاری بودن از بیماری‌های ویروسی مدنظر قرار گرفتند). در برنامه به‌گزینی کلونی رقم زیتون Kryps Berati در آلبانی پنج کلون برای شاخص سال-آوری، چهار کلون برای اندازه میوه و نسبت گوشت به هسته و دو کلون نیز برای درصد روغن انتخاب شدند (Ismaili *et al.,* 2015).

تکنیک‌های مولکولی با داشتن قابلیت تکرارپذیری، اطمینان بالا و عدم وابستگی به شرایط محیطی برای تعیین خصوصیات ژنتیکی دقیق، تعیین منشأ و پراکنش ژنوتیپ‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Poljuha *et al.,* 2008). در ابتدا برای تمایز ارقام زیتون از یکدیگر، از نشانگرهای مولکولی DNA مانند RAPDs (Gomes *et al.,* 2008; Erfatpour *et al.,* 2011; Ozka-ya et al., 2006) و AFLPs (Angiolillo *et al.*, ۱۹۹۹; Rotondi *et al*., ۲۰۰۳) استفاده شد. متعاقباً، نشانگرهای ریزماهواره (SSRs) برای زیتون توسعه یافتند (جمشیدی جم و همکاران، ۱۳۹۳ Caruso *et al.,* 2014; Carriero *et al.,* 2002; Cipriani *et al.,* 2002; Shabanimofrad *et al.*, 2011). این نشانگرها با موفقیت برای شناسایی ارقام زیتون مورد استفاده قرار گرفتند (Rallo *et al.,* 2000; Gil *et al.,* 2006; Baldoni et al., ۲۰۰۹). نشانگرهای ریزماهواره به دلیل درجه تنوع بالای آنها برای تشخیص ژنوتیپ‌های نزدیک به هم مناسب هستند (Kumar *et al.*, 2009). ارزیابی‌های مولکولی (RAPD-PCR) و مورفولوژی بین رقم استاندارد

Derik Halhali و نمونه‌های انتخابی این رقم، تنوع زیادی را داخل این رقم تثبیت نمود (Ozkaya *et al.*, 2006). بررسی تنوع ژنتیکی درون رقمی دو رقم زیتون کرونیکی و کالاماتا با دو روش مولکولی RAPD و ISSR، در داخل هر دو رقم تنوع ژنتیکی زیادی نشان داد (Despotaki *et al.*, 2011). از سوی دیگر بررسی ژنتیکی کلون‌های رقم Cobrançosa با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR تنوع ژنتیکی درون رقمی گسترده در بین کلون‌ها را نشان داد. همچنین این نشانگرها تنوع بیش‌تری را در کلون‌ها نسبت به خاستگاه‌های جغرافیایی مختلف نشان دادند (Martins-Lopes *et al.*, 2009). بررسی انجام یافته در بین کلون‌های ارقام زرد و روغنی نشان داد که بین و درون کلون‌های ارقام زرد و روغنی مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود دارد (جمشیدی جم و همکاران، ۱۳۹۳).

هدف از این تحقیق ارزیابی ترکیب اسیدهای چرب روغن کلون‌های انتخابی رقم زیتون زرد و تعیین روابط ژنتیکی تک درخت‌های انتخابی این رقم در منطقه طارم بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی

این بررسی از سال ۱۳۸۱ به مدت پنج سال در شهرستان طارم استان زنجان اجرا گردید. مشخصات جغرافیایی ایستگاه تحقیقات زیتون طارم ۳۶ درجه، ۴۷ دقیقه و ۴۹ درجه، ۵۰ دقیقه شرقی است. ارتفاع از سطح دریا ۳۶۰ متر، میانگین دمای سالیانه ۱۷/۴ درجه سانتی‌گراد، میانگین دمای تابستان ۲۷/۲ درجه، بیشترین و کمترین دمای سالیانه ۴۳ و ۸- درجه سانتی‌گراد است.

مواد آزمایشی مورد بررسی در این تحقیق تک درخت‌های رقم زرد با کدهای st۱ تا st۱۱ و رقم زرد گلوله ((st۲ به‌عنوان شاهد بودند. برای ارزیابی ترکیب اسیدهای چرب روغن کلون‌های مورد ارزیابی مقدار دو کیلوگرم میوه تازه از روی درختان جمع‌آوری شده، ترکیب اسیدهای چرب در آزمایشگاه صنایع غذایی شرکت صنایع بهپاک بهشهر اندازه‌گیری شد.

۲-۲- استخراج DNA

استخراج DNA از برگ‌های جوان کلون‌های رقم زرد با روش CTAB تغییریافته (Saghai-Maroof *et al.*, 1984) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. نمونه‌های DNA برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حدود غلظت ۲۵ ng/µl رقیق شدند.

۲-۳- سنجش ریزماهواره‌ها

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط ۱۰ نشانگر اختصاصی زیتون UDO099–007، UDO099–009، UDO099–011، UDO099–031، UDO099–034، UDO099–035، UDO099–036، UDO099–039 (Cipriani et al., 2002)، PssrOeIGP7 و PssrOeIGP18 (Sefc et al., 2000) انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، دو میکرولیتر بافر 1X، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم پلیمراز بود.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

locus	Repeat motif	Primer sequences (5'→3')	Allele size range	T°c
UDO99–007	(GT)21	F: GTGTTCTTTATTTGAAGGAATCTT R: TCGCTTTTGTGTTACATATTCG	94-141	57
UDO99–009	(AG)16	TTGATTTCACATTGCTGACCA CATAGGGAAGAGCTGCAAGG	83-119	60
UDO99–011	(CT)7(CA)10(CT)2(CA)2CT(CA)2CT(CA)9	TGA CTC CCT TTA AAC TCA TCA GG TGC GCA TGT AGA TGT GAA TAT G	105-132	62
UDO99–031	(TG)21(TATG)6	TAT CCT CTA TGT GGC GAT G TTG GTT AAA AGG ATT GAT ACA	114-155	58
UDO99–034	(TG)23	CTC TCG GGC ATG TAT CAT TT TTG CAT ATT TGT ATG ATT CAT TT	80-122	60
UDO99–035	(CA)15	AAT TTA ATG GTC ACA CAC AC ATT GCG AAA TAG ATC TAC GA	136-168	56
UDO99–036	(GT)19(AG)5	AAC ACT GTG CCA CCT CAA CA GAA CCC AAC CCC CAT CTT AC	145-167	62
UDO99–039	(AT)5(GT)11	AAT TAC CAT GGG CAG AGG AG CCC CAA AAG CTC CAT TAT TGT	172-183	55
ssrOeIGP18	(CA)4CT(CA)3(GA)19	CCC CTT CTT TTC TTT CTT TTG CAC CCA CAA AAT CCA AAC CC	99-161	54
ssrOelIGP7	(AG)19	GGACATAAAACATAGAGTGCTGGGG AGGGTAGTCCAACTGCTAATAGACG	127-169	60

برنامه گرمایی PCR در یک ترموسایکلر (Bio-Rad) شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و سپس تعداد ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته DNA در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. محصولات PCR به مقدار ۱۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و پس از چند دقیقه گرم کردن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سرد کردن در یخ، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک ژل آکریلامید هفت درصد بارگذاری و جهت رنگ‌آمیزی قطعات DNA از نیترات نقره استفاده شد.

۲-٤- اندازه‌گیری اسیدهای چرب

برای تعیین میزان اسیدهای چرب روغن کلون‌های رقم زرد، مقدار دو کیلوگرم میوه از درختان هر کدام از کلون‌ها برداشت و روغن آنها در ایستگاه تحقیقات زیتون رودبار توسط دستگاه روغن‌کشی آزمایشگاهی استخراج شد.

برای تعیین اسیدهای چرب، مقدار ۰/۱ گرم روغن زیتون هر کدام از کلون‌های مورد ارزیابی وزن شده و متیل استرهای اسیدهای چرب با استفاده از ۰/۲ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم متانولی استخراج شدند. مقدار ۰/۵ میکرولیتر از متیل استرهای استخراج شده به دستگاه GC (Shimadzu LC- 10A، ژاپن)

تزریق شدند. ستون GC از نوع Thermo به طول ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴/۵ میلی‌متر و سرعت جریان محلول نیز یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. برنامه دمایی آون از ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد شروع و به مدت ۵ دقیقه در این دما قرار داشت و سپس با سرعت ۰/۵ درجه بر دقیقه به ۱۹۰ درجه سانتیگراد رسید. دمای دتکتور و انژکتور نیز ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دتکتور از نوع SPD- M10A vp DAD بود و اندازه‌گیری از طریق نرمال کردن سطوح انجام شد. نتایج به صورت درصد سطح زیر نمودار بیان گردید (Bannon *et al*., 1982).

برای تعیین شاخص پراکسید روغن زیتون پنج گرم روغن زیتون در ۳۰ میلی‌لیتر از محلول استیک استیک – کلروفروم نسبت حجمی (۲:۳) ریخته شده و مخلوط مذکور تکان داده شد تا روغن بخوبی حل شود. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محلول یدور پتاسیم اشباع به آن اضافه شده و به‌مدت یک دقیقه در شرایط تاریک نگهداری شد. مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف نشاسته اضافه و عمل تیتراسیون با تیوسولفات سدیم ۰/۱ نرمال انجام شد. عدد پراکسید بر حسب میلی اکی‌والان اکسیژن در ۱۰۰ گرم روغن زیتون محاسبه شد (Firestone, 1994).

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

در الگوی نواری حاصل از واکنش PCR نمونه‌ها برای هر نشانگر به صورت وجود (یک) برای مشاهده آلل یا عدم وجود باند (صفر) در صورت عدم مشاهده آلل امتیازدهی شدند (شکل ۱). تجزیه خوشه‌ای داده‌ها به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه ژاکارد (Sneath and Sokal, 1973) و ضریب کوفنتیکی به منظور تعیین میزان برازش ماتریس تشابه با دندروگرام حاصله با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ۲,۰۲ (Rohlf, 1998) انجام شد. به منظور محاسبه تعداد آلل‌ها، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص تثبیت ژنی، فراوانی آلل‌ها، شاخص اطلاعاتی شانون، احتمال یکسانی و تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها (AMOVA) از نرم‌افزار GeneAlex 6.41 (Peakall and Smouse, 2006) استفاده شد.

برای گروه‌بندی کلون‌های زیتون رقم زرد از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. برای تفسیر نتایج در این تجزیه روش UPGMA بر مبنای ضریب ژاکارد انتخاب گردید. برش کلاستر از محل اتصال کلون St۲ (رقم زرد گلوله) صورت گرفت (شکل ۲). برای انجام تجزیه کلاستر و تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های PCR و تجزیه آماری اسیدهای چرب و پراکسید از نرم افزار SAS 8.1(Institute Inc., Cary, NC, USA) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

تجزیه کیفی روغن (اسیدهای چرب) کلون‌های رقم زرد نشان داد (جدول ۲) میزان اسید چرب اولئیک کلون‌های رقم زرد از ۶۴ تا ۷۱ درصد متغیر بود. کلون St5 با ۷۰/۷ درصد و St2 (رقم زرد گلوله) با ۶۴/۵ درصد به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار اسید چرب اولئیک را داشتند. همچنین میزان پراکسید کلون‌ها از ۶۱/۵ تا ۱۴/۳ میلی‌اکیوالان بر کیلوگرم در داخل کلون‌ها متفاوت بود. در بین کلون‌های مورد ارزیابی، بیش‌ترین مقدار پراکسید مربوط به کلون St3 و کم‌ترین آن به St11 تعلق داشت. چهار کلون St4، St6، St5 و St3 به‌دلیل داشتن اسید چرب اولئیک بالا، از کلون‌های برتر محسوب می‌شوند. از سوی دیگر این کلون‌ها دارای اسید چرب لینولئیک و لینونیک کم‌تری در مقایسه با دیگر کلون‌ها بودند.

طارم یکی از قطب‌های مهم زیتون کاری کشور بوده و رقم زرد نیز یکی از مهم‌ترین ارقام بومی کشت شده در منطقه طارم می‌باشد. تغییرات اسید

چرب اولئیک در بین کلون‌های رقم زرد نشان داد تفاوت آن در بین کلون‌های این رقم کم بود. از سوی دیگر چند شکلی‌های مشاهده شده برای کلون‌های رقم زرد (شکل ۱) نشان داد که کلون‌های رقم زرد یکنواختی زیادی داشته و از نظر ژنتیکی نیز با همدیگر تفاوتی نداشتند. تفاوت‌های مشاهده شده در صفات مورفولوژی نیز می‌تواند در نتیجه تغییرات عوامل محیطی باشد. بررسی‌های مورفولوژیک و مولکولی (RAPD) (ابدالی و همکاران، ۱۳۹۰) و ارزیابی ریخت‌شناسی (نظامی‌وند چگینی و همکاران، ۱۳۹۴) ارقام زیتون بومی کشور نشان داد که یکنواختی زیادی در داخل رقم زرد جمع‌آوری شده از زیتون‌کاری‌های مناطق شمال کشور (رودبار، منجیل و طارم) وجود داشت. ترکیب اسیدهای چرب به‌ویژه مقدار اولئیک اسید بالا، یکی از مهم‌ترین اهداف اصلاحی برای روغن زیتون تعریف شده است (Rallo *et al.*, 2008). علاوه بر این، در سال‌های اخیر برنامه‌های اصلاحی متعددی روی اجزای روغن زیتون انجام شده است (Manaï *et al.*, 2018; Mousavi *et al.*, 2018). بررسی کلون‌های رقم سوری (Souri) نشان داد که از نظر صفات مورفولوژیک (درصد روغن، وزن تر و خشک میوه و عملکرد) در داخل این رقم تنوع وجود داشت اما از نظر مارکرهای مولکولی (SNPs و SSR) تفاوتی مشاهده نشد (Ben-Ari *et al.*, 2014). بررسی تنوع مورفولوژیک و ژنتیکی (مارکرهای SSR) نمونه‌های داخل سه رقم کرنیکا (Crnica)، لومباردشکا (Lumbardeška) و بارکینجا (Barkinja) در کشور مونته نگرو نشان داد از نظر مورفولوژیک و ژنتیکی در داخل ارقام تنوع وجود داشت (Lazović *et al.*, 2014).

۱-۳- تعیین روابط ژنتیکی بین کلون‌های رقم زرد با استفاده از نشانگرهای SSR

۱-۱-۳- تعداد آلل‌ها

یکی از پارامترهای اندازه‌گیری شده تعداد آلل‌های مشاهده شده در داخل جمعیت‌ها است. مکان‌های ژنی ریزماهواره‌ای به علت ماهیت ناپایدار خود و در اثر جهش‌های متوالی، آلل‌های زیادی دارند که در داخل جمعیت خود را نشان می‌دهند (شکل ۱). آلل‌ها به صورت جفت باز اندازه‌گیری شده و ثبت می‌شوند. در جمعیت کلون‌های زرد

جدول ۲: تغییرات ترکیب اسیدهای چرب در بین کلون‌های زیتون رقم زرد.

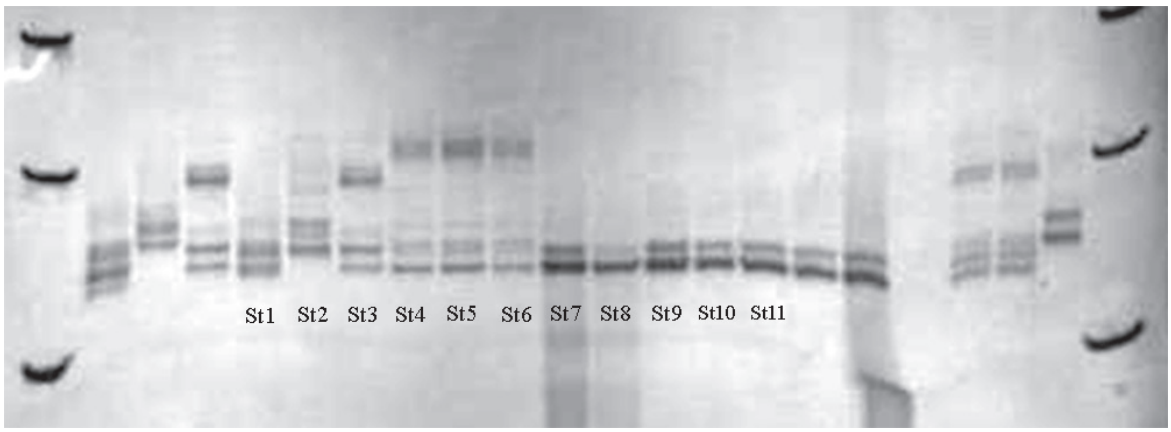
اسید چرب	پالمتیک اسید C16:0	پالمیتولئیک اسید C16:1	استاریک اسید C18:0	اولئیک اسید C18:1	لینولئیک اسید C18:2	لینولنیک اسید C18:3	آراشیدیک اسید C20:0	ایکوسنوئیک اسید C20:1	بهنیک اسید C22:0	پوروسیک اسید C22:1	سایر اسیدهای چرب
کلون											
St1	۱۲/۹۸^{ab}	۰/۸۵^{ab}	۲/۸۳^{a}	۶۶/۵۵^{ab}	۱۱/۷۸^{ab}	۰/۵۹^{a}	۰/۴۱^{a}	۰/۲۳^{a}	۰/۰۸^{a}	۰/۴۲^{a}	۳/۵۸^{ab}
St2	۱۳/۶۹^{a}	۱/۸^{a}	۲/۳۹^{a}	۶۴/۵۶^{b}	۱۱/۷۱^{ab}	۰/۶۰^{a}	۰/۳۰^{a}	۰/۱۹^{ab}	۰/۰۸^{a}	۰/۲۰^{b}	۴/۵۶^{a}
St3	۱۲/۷۵^{ab}	۰/۸۲^{ab}	۲/۹۲^{a}	۶۸/۸۷^{ab}	۹/۹۹^{b}	۰/۵۰^{a}	۰/۴۱^{a}	۰/۲۵^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۳۴^{ab}	۳/۱۵^{ab}
St4	۱۳/۵۶^{a}	۰/۹۳^{ab}	۲/۸۳^{a}	۶۹/۳۷^{a}	۹/۵۴^{b}	۰/۵۰^{a}	۰/۳۹^{a}	۰/۰۹^{b}	۰/۰۷^{a}	۰/۳۶^{ab}	۲/۶۶^{b}
St5	۱۲/۵۱^{b}	۰/۶۷^{b}	۳/۶۷^{a}	۷۰/۷۴^{a}	۹/۱۳^{b}	۰/۵۲^{a}	۰/۳۹^{a}	۰/۰۳^{b}	۰/۰۸^{a}	۰/۴۰^{a}	۳/۲۶^{ab}
St6	۱۲/۶۴^{ab}	۰/۸۳^{ab}	۲/۸۳^{a}	۶۹/۲۱^{a}	۱۰/۰۳^{b}	۰/۵۵^{a}	۰/۳۲^{a}	۰/۲۶^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۳۶^{a}	۲/۶۸^{b}
St7	۱۳/۶۳^{a}	۰/۹۲^{ab}	۲/۶۵^{a}	۶۴/۸۵^{b}	۱۳/۴۵^{a}	۰/۶۳^{a}	۰/۳۸^{a}	۰/۲۴^{a}	۰/۰۸^{a}	۰/۴۷^{a}	۲/۷۸^{b}
St8	۱۳/۵۱^{a}	۰/۸۳^{ab}	۲/۶۵^{a}	۶۵/۲۰^{ab}	۱۳/۱۹^{a}	۰/۵۹^{a}	۰/۳۱^{a}	۰/۲۶^{a}	۰/۰۸^{a}	۰/۵۹^{a}	۲/۶۸^{b}
St9	۱۳/۳۰^{a}	۱/۰۳^{a}	۲/۷۳^{a}	۶۵/۳۰^{ab}	۱۲/۸۵^{ab}	۰/۵۸^{a}	۰/۴۱^{a}	۰/۲۴^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۴۶^{a}	۳/۰۳^{ab}
St10	۱۳/۱۷^{a}	۱/۰۷^{a}	۲/۹۲^{a}	۶۵/۴۱^{ab}	۱۲/۸۷^{ab}	۰/۵۶^{a}	۰/۳۹^{a}	۰/۲۴^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۴۴^{a}	۲/۸۶^{b}
St11	۱۳/۰۸^{a}	۰/۹۴^{ab}	۳/۱۲^{a}	۶۵/۲۸^{ab}	۱۲/۶۹^{ab}	۰/۵۲^{a}	۰/۳۹^{a}	۰/۲۳^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۴۲^{a}	۳/۲۶^{ab}
MS	۰/۵۱۱^{ns}	۰/۳۷۷^{ns}	۰/۱۰۹^{ns}	۱۴/۸۹*	۰/۰۰۵۸*	۰/۰۰۵۸^{ns}	۰/۰۰۳۳^{ns}	۰/۰۱۷*	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۲۸*	۰/۹۳۴*

ns و * به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۵ درصد.

بیش‌ترین تعداد آلل‌های مشاهده شده مربوط به جایگاه ژنی PssrOeIGP7 با تعداد ۱۰ آلل و کم‌ترین تعداد آلل‌ها در جایگاه ژنی PssrOeIGP18 با چهار آلل مشاهده شد. تعداد موثر آلل‌ها (ne) در واقع حاکی از تعداد آلل‌هایی است که در یک جمعیت و برای یک جایگاه مورد انتظار می‌باشد. در جمعیت کلون‌های زرد آلل c در جایگاه PUDO99-036 با فراوانی ۰/۶۵۶ رایج‌ترین آلل جمعیت بود (جدول ۳). به طور کلی تنوع در میانگین تعداد آلل به دست آمده در هر جایگاه به تنوع در مکان‌های مورد مطالعه و هم‌چنین تعداد ژنوتیپ‌ها و موقعیت آنها وابسته است (Lopes *et al.*, 2004) و اگر تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر بیشتر باشد نشان دهنده تنوع بیشتر در جمعیت مورد مطالعه است (جمشیدی‌جم و همکاران، ۱۳۹۳). در بررسی‌های بلاج و همکاران (Belaj *et al.*, 2004)، نورمحمدی و همکاران (Noormohammadi *et al.*, 2007) و عمرانی صباغی و همکاران (Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007) به‌ترتیب میانگین آلل برای هر مکان را ۷/۵، ۵/۶ و ۹ اعلام نمودند.

جدول ۳: تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر جایگاه

مکان ژنی	جمعیت کلون‌های رقم زرد	
	Na	Ne
PUDO99-O39	۷	۳/۸۲
PUDO99-O07	۷	۴/۴۱
PUDO99-O31	۵	۲/۶۵
PUDO99-O34	۵	۲/۹۶
PUDO99-O35	۸	۳/۹۵
PUDO99-O36	۸	۲/۲۱
PUDO99-O11	۷	۴/۳۳
PssrOelIGP7	۱۰	۴/۸۱
PssrOelIGP18	۴	۳/۶۸
میانگین	۶/۸	۳/۶۵



شکل ۱: چند شکلی مشاهده شده برای کلون‌های رقم زرد.

۳-۱-۲- میزان هتروزیگوسیتی

ارقام زیتون دارای ویژگی‌هایی هستند که به طور طبیعی در جمعیت‌ها شکل می‌گیرند. در گیاهان دگرگشن به‌دلیل این‌که افراد هتروزیگوت دارای میزان عملکرد بالایی هستند، همیشه به صورت طبیعی در طول تکامل یا در طی برنامه‌های اصلاحی گزینش می‌شوند. گزینش برای گیاهان هتروزیگوت در طول دوره اهلی شدن زیتون بر اساس صفات مطلوب زراعی تشدید شده و به‌دلیل این‌که این گیاه به صورت رویشی تکثیر می‌شود، درصد بالای هتروزیگوسیتی در آن تثبیت گردیده است. هتروزیگوسیتی مشاهده شده براساس جدول آللی برای هر جایگاه محاسبه گردیده است. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی برای جمعیت کلون‌های زرد برابر با یک و متعلق به پنج مکان ژنی PUD099-039، PUDO99-007، PUD099-011، PUD099-031 و PssrOelGP7 بود و کم‌ترین میزان هتروزیگوسیتی برابر با ۰/۳۷۵ و متعلق به مکان ژنی PUDO99-036 می‌باشد (جدول ۴ و ۵). در بررسی‌های خداری و همکاران (Khadari et al., 2008)، نورمحمدی و همکاران (Noormohammadi et al., 2007)، آیپک و همکاران (Ipek et al., 2012) و مناصری رحمانی و همکاران (Mnasri Rahmani et al., 2019) میانگین هتروزیگوسیتی را به ترتیب ۰/۶۱، ۰/۶۶، ۰/۶۷ و ۰/۶۲ گزارش نمودند.

جدول ٤: هتروزیگوسیتی مشاهده شده به تفکیک جایگاه در جمعیت‌های تحت مطالعه

مکان ژنی	هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت کلون‌های زرد
pUDO99-O39	۱
pUDO99-O07	۱
pUDO99-O31	۱
pUDO99-O34	۰/۹۴۱
pUDO99-O35	۰/۹۴۱
pUDO99-O36	۰/۳۷۵
pUDO99-O11	۱
PssrOelIGP7	۱
PssrOelIGP18	۰/۸۸۲
میانگین	۰/۹۰۰

جدول ٥: میزان هتروزیگوسیتی و میانگین آل‌ها در جمعیت کلون‌های رقم زرد

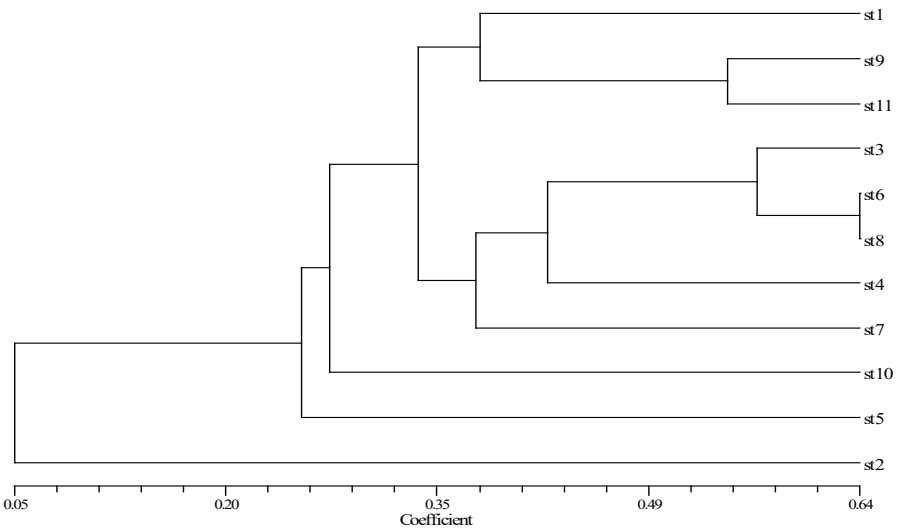
میانگین آل‌های موثر	میانگین آل‌های مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	جمعیت
۳/۶۵	۶/۷۸	۰/۷	۰/۹	کلون‌های رقم زرد

با توجه به نتایج حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای مشاهده شد که شباهت بین این کلون‌های رقم زرد بسیار زیاد بود (شکل ۲). با توجه به این‌که تمامی کلون‌های رقم زرد توسط روش‌های غیر جنسی تکثیر شده‌اند، وجود شباهت زیاد بین این کلون‌ها قابل پیش‌بینی بود. بر اساس این گروه‌بندی، کلون‌ها در دو گروه قرار گرفتند. رقم زرد گلوله یک گروه مجزا را تشکیل داد که قابل پیش‌بینی بود. گروه دوم نیز کلون‌های رقم زرد بودند. نکته قابل توجه در این گروه شباهت زیاد دو کلون St6 و St8 با هم و با کلون St3، هم‌چنین شباهت زیاد کلون‌های St9 و St11 با همدیگر و کلون St1 بود.

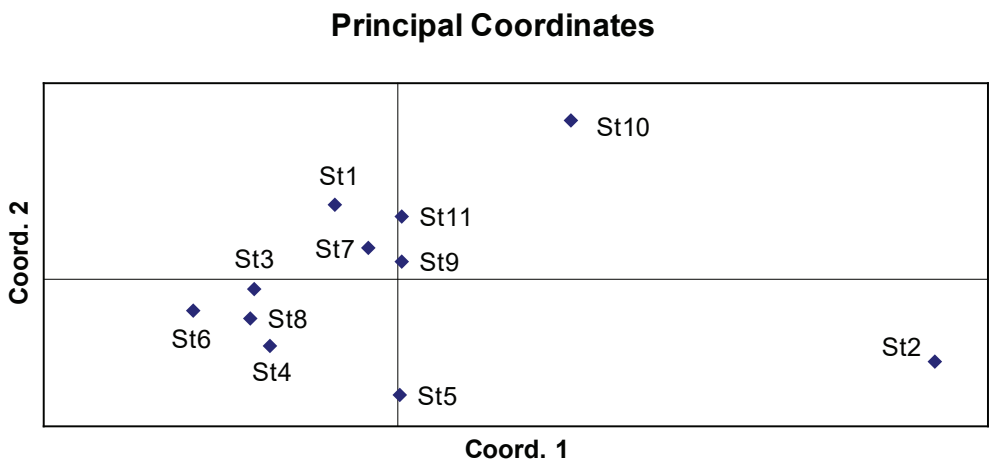
نورمحمدی و همکاران (Noormohammadi *et al.*, 2007) برای شناسایی و گروه بندی ارقام مهم بومی از مارکرهای ریزماهواره (SSR) استفاده نمودند. ارقام زرد و فیشومی بدلیل شباهت زیاد در یک گروه قرار گرفتند. زرد گلوله نیز گروه مستقلی را تشکیل داد. عمرانی صباغی و همکاران (Omrani-Sabbaghi *et al.*, 2007) هم با استفاده از مارکر ریزماهواره ارقام بومی را از ارقام خارجی جدا کردند. در این ارزیابی ارقام زرد، روغنی، شنگه و ماری در گروه‌های مستقل قرار گرفتند. خدری و همکاران (Khadari *et al.*, 2008) نیز با استفاده از مارکر ریزماهواره ژنوتیپ‌های بومی شمال را از ژنوتیپ‌های گسترش یافته در جنوب مراکش از همدیگر متمایز نمودند.

۳-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی

دو مولفه اصلی اول ۴۸/۳۸ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند که سهم مولفه اول ۲۵/۹۷ درصد و سهم مولفه دوم ۲۲/۴۱ درصد بود. نتایج حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی با نتایج تجزیه کلاستر مطابقت زیادی داشت. در این تجزیه نیز همانند تجزیه کلاستر، St2 یا رقم زرد گلوله در فاصله دوری نسبت به کلون‌های رقم زرد قرار داشته و به تنهایی در یک گروه قرار گرفت. کلون‌های (St3, 4, 6, 8) از یک سو و کلون‌های (St1, 7, 9, 11) شباهت‌های زیادی به همدیگر داشتند. کلون‌های *St5* و *St10* همانند تجزیه کلاستر به صورت پراکنده در محورهای اصلی قرار گرفتند. با توجه به این نتایج، آغازگرهای *SSR* توانستند هم‌نامی بین کلون‌ها را مشخص نمایند. با استفاده از داده-های این تحقیق می‌توان ارقام را شناسایی نموده و برای احداث باغات یکنواخت عمل نمود (شکل ۳). روبوس و همکاران (Roubos et al., 2010) در ارزیابی شناسایی مولکولی ارقام زیتون



شکل ۲: نتایج حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه ژاکارد و الگوریتم UPGMA



شکل ۳: نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی کلون‌های رقم زیتون زرد

یونان و مناصری رحمانی و همکاران (Mnasri Rahmani et al., 2019) برای شناسایی ارقام بومی تونس با استفاده از مارکرهای ریزماهواره شباهت زیادی را بین تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان دادند.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی سطوح چندشکلی میان ارقام زیتون برای محقق یک روش مطمئن در کنار ارزیابی‌های مورفولوژیک برای شناسایی ارقام و کلون‌های مختلف زیتون است. نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات اسیدهای چرب در بین کلون‌های زیتون رقم زرد نشان داد بین کلون‌ها تغییرات زیادی وجود نداشته و نتایج مارکر مولکولی نیز یکنواختی ژنتیکی این کلون‌ها را آشکار نمود. نتایج هر دو روش همدیگر را تایید نمودند. بنابراین لازم است از هر دو روش برای استخراج نتایج متقن در مطالعات ژنتیکی و گزینش کلون‌ها به‌صورت مکمل استفاده نمود.

تضاد و تعارض منافع: نویسنده هر گونه تعارض و تضاد منافع اعم از تجاری و غیر تجاری و شخصی را که در ارتباط مستقیم یا غیر مستقیم با اثر منتشر شده است رد می نمایند.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پروژه پژوهشی با شماره ۸۱۲۵۱-۱۲-۱۱۱ می‌باشد که با حمایت‌های مالی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و دانشگاه زنجان انجام گردید. بدین‌وسیله نگارندگان تشکر و سپاس خود را اعلام می‌دارند.

منابع

ابدالی، ن.، حسینی مزینانی، م.، عطایی، س.، حسینی، س.م. و نقوی، م. ر. (۱۳۹۰). بررسی میزان تنوع در چهار رقم زیتون ایرانی با مطالعه صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله زیست شناسی ایران، ۲۴(۶)، ۸۷۹-۸۶۸.

بی‌نام. ۱۳۸۴. http://213.176.84.4/baghat/product.asp. وزارت جهادکشاورزی. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصاد.

جمشیدی‌جم، ف.، ربیعی، و.، جعفری، ح.، فتوت، ر. و طاهری، م. (۱۳۹۳). تنوع ژنتیکی کلون‌های زیتون ارقام زرد و روغنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۱-۳۰ (۲)، ۳۴۵-۳۲۷.

خوش‌زمان، ت.، ا.، گلچین، م.، طاهری، م.، عظیمی و د.، زارع حقی. (۱۳۹۷). عکس‌العمل نهال زیتون (*Olea europaea* L.) به تنش توام شوری و تراکم خاک در شرایط کمبود اکسیژن خاک. مجله تحقیقات خاک و آب ایران، ۴۹ (۲)، ۳۱۵-۳۰۳.

زینانلو، ع.ا.، ارجی، ع.، تسلیم پور، م.ر.، رمضانی ملک رودی، م. و عظیمی، م. (۱۳۹۴). اثر رقم و شرایط اقلیمی بر ترکیب اسیدهای چرب روغن زیتون. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۶ (۲)، ۲۴۲-۲۳۳.

زینانلو، ع. ا. (۱۳۷۹). تعیین مناسبترین زمان برداشت زیتون با تعیین درصد روغن در طول مراحل رشد و نمو میوه طارم زنجان. گزارش پژوهشی بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.

نظامیوند چگینی، ز.، سمیع‌زاده لاهیجی، ح.، رمضانی ملک‌رودی، م. و محسن‌زاده گلفزانی، م. (۱۳۹۴). نوع ژنتیکی چهار رقم زیتون از طریق نشانگرهای ریخت‌شناختی. به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی، ۳(۲)، ۲۱۳-۲۰۱.

Angilillo, A., Mencuccini, M. and Baldoni, L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 411-421.

Baldoni, L., Cultrera, N. G. M., Mariotti, R., Ricciolilni, C., Arcion, S., Vendramin, G.G., Bounamici, A., Porceddu, A., Sarri, V., Ojeda, M. A., Trujillo, I., Rallo, L., Belaj, A., Perri, E., Salimonti, A., Muzzalupo, I., Casagrande, A., Lain, O., Messina, R. and Testolin, R. (2009). A consensus list of microsatellite markers for genotyping. *Molecular Breeding*, 24, 1-19.

Bannon, C. D., Craske, J. D., Hai, N. T., Harper, N. L. and O'rourke, K. L. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. methylation of fats and oils with boron

trifluoride methanol. *Journal of Chromatography*, 247(1), 63-69.

Bartolini, G., R. Petruccelli, Toponi, M. A. and Di Monte, G. (1994). Morphological and biochemical evaluation of Olea europaea L. cv. Leccino. *Acta Horticulturae*, 356, 78-81.

Belaj, A., Cipriani, G., Testolin, R., Rallo, L. and Trujillo, I. (2004). Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. *HortScience*, 39, 1557-1561.

Ben-Ari, G., Biton, I., Mani, Y., Avidan, B. and Lavee, S. (2014). The Diversity in Performance of Commercial Olive Clones Selected from the Autochthonous cv. Souri Population for Intensive Irrigated Cultivation. *Hortscience*, 49(4), 425-429.

Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F. and Giorgio, G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*,104, 301-307.

Caruso, T., Marra, F. P., Costa, F., Campisi, G., Macaluso, L. and Marchese, A. (2014). Genetic diversity and clonal variation within the main Sicilian olive cultivars based on morphological traits and microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, 180, 130-138.

Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A. and Testolin, R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient varieties. *Theoretical and Applied Genetics*,104, 223-228.

Despotaki, E., Linos , A. and Hagidimitriou, M. (2011). Studing the genetic variation among clones of "Kalamon" and "Koroneiki" using molecular techniques. *Acta Horticulturae*, 924, 335-339.

Erfatpour, M., Hamidogli, Y., Kaviani, B., Fatahi, R., Falahati, M., Javadi, D. and Hashemabadi, D. (2011). Assessment of genetic diversity among some Iranian hazelnut genotypes using SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1286-1291.

Fabbri, A., Lambardi, M. and Ozden-Tokatli, Y. (2009). Olive Breeding: Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species; Jain, S. M. and Priyadarshan, P. M. (eds.), *Springer Science+Business Media*, 423-465.

Firestone, D. (1994). Determination of the iodine value of oils and fats: summary of collaborative study. *Journal of AOAC International*, 77, 674-676.

Gil, F. S., Busconi, M., Da Câmara Machado, A. and Fogher, C. (2006). Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea. Molecular Ecology*, 6, 1275-1277.

Gomes, S., Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Meirinhos, J., Lopes, J., Martins, A. and Guedes-Pinto, H. (2008). Evidence for clonal variation in 'Verdeal-Transmontana' olive using RAPD, ISSR and SSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83, 395-400.

Grati Kamoun, N., Khlif, M., Ayadi, M. and Karray, B. (2002). Clonal Selection of Olive Tree Variety "Chemlali Sfax": Preliminary Results. *Acta Horticulturae*, 586, 147-150.

Ismaili, H., Veshaj, Z., Llambro, A., Xhelili, L. and Meço, Z. (2015). Clonal selection of variety Kryps Berati of olive. Scientific Symposium "Mentor Permeti" for the genetic improvement of plants. 9-10 December 2015, Tirana Albanie.

Khadari. B., Breton. C., Moutiren. N., Roger. J.P., Besnard. G., Brevile. A., Dosba. F. (2003). the use of molecular markers for germplasm management of France olive collection. *Theoretical and Applied Genetics,* 106, 521-529.

Khadari, B., Charafi, J., Moukhli, A., and Ater, M. (2008). Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree Genetics & Genomes*, 4(2), 213-221.

Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R. and Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2, 141-162.

Lazović, B., Adakalić, M., Bandelj, D. Perović, T. (2014). Assessment of variability in three olive

varieties from Montenegro. Proceedings of the 5th International Conference Olivebioteq, 3-6 November, 2014 Amman, Jordan, 101-106.

Leitao, F. A., Serrano, J. F., Potes, M. F., Clara, M. I. E, Rei, F. T. and Pinto, G. (1996). Studies on clonal selection of olive cv."Negrinha" in the province of Tras-os-Montes. *Olivae*, 62, 38-45.

Lopes, M. S., Mendonca, D., Sefc, K. M., Gil, F. S., and Machado, A. C. (2004). Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *Horticultural Science*, 39(7), 1562-1565.

Loreti, F., Guerriero, R., Triolo, E. and Vitagliano, C. (1993). Proposed method for clonal and plant health selection in olive cultivation. *Olivae*, 47, 60-66.

Manaï H., Oueslati, I., Manuel, A., Cañas, M., Zarrouk, M., Sánchez-Casas, J. (2018). Improvement of the Sterol and Triacylglycerol Compositions of Chemlali Virgin Olive Oils through Controlled Crossing with Mediterranean Cultivars. *Journal of Oleo Science*, 67(4), 379-388.

Mnasri Rahmani, S., Saddoud Debbabi, O. and Ben Naceur, M. (2019). Molecular markers: an important tool to analyze the genetic diversity of local Tunisian olive varieties. Euro-Mediterranean *Journal for Environmental Integration*, 4, 29.

Martins, A., L. Santos, J. Lopes, and J. Gouveia. 1997. Selection long–standing varieties: Galega and Cobrancosa. *Olivae*, 66, 46-50.

Martins-Lopes, P., Gomes, S., Lima-Brito, J., Lopes, J. and Guedes-Pinto, H. (2009). Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 123, 82-89.

Mousavi, S., Mariotti, R., Breidi, M., Vanacore, S., Baglivo, F., Aggelou, N., Mencuccini, M., Bufacchi, M. (2018). Olive oil quality in crossbred progeny of 'Leccino'. *Acta Horticulturae*, 1199.85, 535-542.

Noormohammadi, Z., Hosseini-Mazizani, S. M., Trujillo, I., Rallo, L., Belaj, A., and Sadeghzadeh, M. (2007). Identification and classification of main Iranian olive cultivars using microsatellite markers. *Horticultural Science*, 42, 1545-1550.

Omrani-Sabbaghi, A., 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 olive (Olea europaea L.) collection. *Scientia Horticulturae*, 112, 439-447.

Ozkaya, M. T., Cakir, E., Gokbayrak, Z., Ercan, H. and Taskin, N. (2006). Morphological and molecular characterization of Derik Halhali olive (*Olea europaea* L.) accessions grown in Derik-Mardin province of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 108, 205-209.

Poljuha, D., Sladonja, B., Brkic Bubolo, K., Radulovic, M., Brscic, K., Setic, E., Krapac, M. and Milotic, A. (2008). A multidisciplinary approach to the characterisation of autochthonous Istrian olive (*Olea europea* L.) varieties. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 347-354.

Rallo L., Barranco, D., De La Rosa, L., Leon, L. (2008). Chiquitita olive. *HortScience*, 43, 529-531.

Rallo, P., Dorado, G. and Martin, A. (2000). Development of Simple sequence repeat (SSRs) in olive tree. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 984-989.

Rotondi, A., Magli, M. and Baldoni, L. (2003). Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive varieties. *Euphytica*, 132, 129-137.

Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNAs-epacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 8014-8019.

Sefc, K. M., Lopes, M. S., Mendonca, D., Rodrigues Dos Santos, M., Laimer Da Camara Machado, M. and Da Camara Machado, A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (Olea europaea) and their characterisation in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, l9, 1171-1193.

Serrano, J. M. F. 1990. Clonal selection in modern olive farming. *Olivae*, 31, 34-37.

Shabanimofrad, M., Yusop, M. R., Saad, M. S., Wahab, P. E. M., Biabani khanehkahdani, A. and Latif, M. A. (2011). Diversity of physic nut (Jatropha curcas) in Malaysia: application of DIVA-geographic information system and cluster analysis. *Australian Journal of Crop Science*, 5(4), 361-368.

Tous, J., A. Romero, and J. Plana. 1999. ”IRTA-i.18”: A clonal of the “Arbequina” olive variety. *Olivae*, 77, 50-52.

Zaher, H., Boulouha, B., Baaziz, M., Sikaoui, L., Gaboun, F. and Udupa, S. M. (2011). Morphological and genetic diversity in olive (*Olea europaea subsp. europaea* L.) clones and varieties. *Plant Omics Journal*, 4(7), 370-376.