

The study of genetic diversity of basil genotypes treated with salt stress using SCoT molecular marker

Reyhane Abdoli Toghroljerdi 

Graduate Master of Science, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: reyhaneabdoli77@gmail.com

Amin Baghizadeh 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: aminbaghizadeh@yahoo.com

Mehdi Rahimi 

Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: mehdi83ra@yahoo.com

Abstract

Objective

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of basil using SCoT molecular markers and to identify markers associated with traits through regression analysis.

Materials and Methods

In this research, ten SCoT primers were used to investigate the genetic diversity of five basil genotypes under salinity stress conditions in the greenhouse of the Faculty of Environmental Sciences at the University of Graduate Studies and Advanced Technology in 2023. The experiment followed a split-plot design based on a completely randomized design, with salinity stress as the main factor and basil genotype as the secondary factor.

Results

The results showed that among the eight primers used, the highest polymorphism was observed, resulting in a total of 105 bands. Of these, 103 were polymorphic bands, with an average of 12.63 polymorphic bands per primer. Primer SCoT1 produced the highest number of bands with 17 bands, while primer SCoT28 had the lowest number of polymorphic bands with four bands. The

polymorphism percentage in basil genotypes ranged from 85.71% to 100% across different primers, with an average polymorphism percentage of 96.52%. Polymorphic information content (PIC) values ranged from 0.35 to 0.40, with an average of 0.38. Expected heterozygosity (EH) for SCoT markers ranged from 0.38 to 0.45, with a mean expected heterozygosity of 0.42. The marker index (MI) varied among SCoT markers, with primer SCoT11 showing the highest MI (0.38) and primer SCoT16 showing the lowest (0.20). The average heterozygosity (Havp) ranged from 0.03 to 0.07 for the studied markers. Primers SCoT28, followed by SCoT10, exhibited the highest average heterozygosity, indicating their high efficiency in detecting polymorphism.

The genetic diversity index of reed among the studied primers was 0.426 in the studied population. Primers SCoT1 and SCoT10 demonstrated the highest genetic diversity index values, highlighting their strong capacity to capture genetic diversity. The average Shannon coefficient for SCoT markers was 0.614, indicating a moderate level of diversity in the studied populations. SCoT1 and SCoT10 primers had the highest Shannon index values, respectively, confirming their ability to detect genetic variation. The number of effective alleles varied between 1.652 and 1.843, with an average of 1.769 in the studied population.

Conclusions

In general, the use of SCoT molecular markers proved to be a suitable method for investigating the genetic diversity of basil cultivars under environmental stress conditions, particularly salinity stress.

Keywords: black basil, heterozygosity, particolored basil, polymorphism, shannon index

Paper Type: Research Paper.

Citation: Abdoli Toghroljerdi R, Baghizadeh A, Rahimi, M (2025) Investigating genetic diversity of basil genotypes treated with salt stress using SCoT molecular marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 17 (1), 71-96.

Agricultural Biotechnology Journal 17 (1), 71-96.

DOI: 10.22103/jab.2024.22177.1512

Received: October 24, 2024.

Received in revised form: December 27, 2024.

Accepted: December 28, 2024.

Published online: January 30, 2025.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ریحان تیمار شده با تنش شوری با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات از طریق رگرسیون

ریحانه عبدلی طغراجردی 

فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: reyhaneabdoli77@gmail.com

امین باقی زاده 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: aminbaghizadeh@yahoo.com

مهدی رحیمی 

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: mehdi83ra@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸

چکیده

هدف: این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ریحان تیمار شده با تنش شوری با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات از طریق رگرسیون انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از ده آغازگر SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵ ژنوتیپ ریحان در شرایط تنش شوری در گلخانه دانشکده علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی و فناوری پیشرفته در سال ۱۴۰۲ به صورت آزمایش اسپلیت پلات بر پایه طرح کاملاً تصادفی (عامل اصلی تنش شوری و عامل فرعی ژنوتیپ ریحان) انجام شد.

نتایج: نتایج بررسی حاضر نشان داد از بین آن‌ها هشت آغازگر چندشکلی نشان دادند که در مجموع ۱۰۵ باند به دست آمد. از بین این باندها، ۱۰۳ باند چندشکل بودند که میانگین آن ۱۲/۶۳ نوار چندشکلی در هر آغازگر بود. پرایمر SCoT1 با ۱۷ باند بیشترین تعداد باند را نشان داد، در حالی که آغازگر SCoT28 با چهار باند کمترین تعداد باند چندشکل را داشت. درصد پلی مورفیسم

مشاهده شده در ژنوتیپ‌های ریحان از ۸۵/۷۱٪ تا ۱۰۰٪ در پرایمرهای مختلف، با میانگین درصد پلی مورفیسم ۹۶/۵۲٪ متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۳۵ تا ۰/۴۰، با میانگین ۰/۳۸ متغیر بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (EH) برای نشانگرهای SCoT از ۰/۳۸ تا ۰/۴۵ با میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۲ بود. شاخص نشانگر (MI) در بین نشانگرهای SCoT متفاوت بود، پرایمر SCoT11 بالاترین MI (۰/۳۸) و آغازگر SCoT16 کمترین (۰/۲۰) را نشان داد. میانگین هتروزیگوسیتی (Havp) از ۰/۰۳ تا ۰/۰۷ برای نشانگرهای مورد مطالعه متغیر بود. پرایمرهای SCoT28 و به دنبال آن SCoT10 بالاترین میانگین هتروزیگوسیتی را داشتند که نشان دهنده کارایی بالای آنها در تشخیص پلی مورفیسم است. شاخص تنوع ژنی در بین آغازگرهای مورد مطالعه با میانگین ۰/۴۲۶ در جمعیت مورد مطالعه قرار داشت. پرایمرهای SCoT1 و SCoT10 به ترتیب بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. میانگین ضریب شانون برای نشانگرهای SCoT برابر با ۰/۶۱۴ بود که نشان دهنده سطح متوسط تنوع در جمعیت‌های مورد بررسی است. پرایمرهای SCoT1 و SCoT10 به ترتیب بالاترین مقادیر شاخص شانون را داشتند که نشان می‌دهد این آغازگرها تنوع ژنتیکی بیشتری را در جمعیت به دست آورده‌اند. تعداد آلل‌های موثر بین ۱/۶۵۲ تا ۱/۸۴۳ با میانگین ۱/۷۶۹ در جمعیت مورد مطالعه متغیر بود. براساس نتایج خوشه بندی ژنوتیپ‌های سیاه و ابلق کمترین فاصله ژنتیکی را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: به طور کلی می‌توان بیان نمود که استفاده از مارکرهای مولکولی SCoT روش مناسبی در جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام ریحان در شرایط تنش محیطی به خصوص تنش شوری است.

کلیدواژه‌ها: پلی مورفیسم، شاخص شانون، ریحان سیاه، ریحان ابلق، هتروزیگوسیتی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عبدلی طغرالجردی ریحانه، باقی زاده امین، رحیمی مهدی (۱۴۰۴) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ریحان تیمار شده با تنش شوری با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات از طریق رگرسیون. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۱)، ۷۱-۹۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاهی علفی، یکساله و متعلق به خانواده نعنائیان است که با داشتن ارقام متنوع یکی از مهمترین سبزی‌های برگی به شمار می‌رود (Badakhshan et al. 2018). در بین گونه‌های جنس *Ocimum*، ریحان

اقتصادی‌ترین گونه محسوب شده و تقریباً در تمام مناطق گرم و معتدل کشت و کار میشود (Rezaee Moadab & Nabavi, 2012). این گیاه علاوه بر مصرف تازه خوری، پیکر رویشی آن خشک شده و به عنوان ادویه و همچنین یک گیاه دارویی مورد مصرف قرار می‌گیرد (Sadeghi et al. 2009). این گیاه با دارا بودن ویژگیهای آنتی‌اکسیدانی ضد میکروبی برای پیشگیری یا درمان اختلالات قلبی-عروقی، دیابت، گرفتگی قاعدگی، اختلالات گوارشی و عصبی و غیره کاربرد دارد (Purushothaman et al. 2018). منشأ این گیاه، ایران، هند و افغانستان گزارش شده است. ریحان در ایران و افغانستان به‌طور خودرو می‌روید ولی تولید فعلی آن در ایران صد درصد از کشت در مزرعه به دست می‌آید. این گیاه در ایران به‌طور وحشی در اطراف تهران، همدان، خراسان در ارتفاع ۲۳۰۰ متری از سطح دریا و در کرمانشاه در ارتفاع ۱۵۰۰ متری و همچنین در خرمشهر، بلوچستان و آذربایجان در اطراف تبریز می‌روید (Binesh et al. 2018).

آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسما گیاهی ضمن حفظ ذخائر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آنها را در برنامه‌های اصلاحی تعیین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان سازماندهی ژرم پلاسما و تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد (Virk et al. 1995). بیشتر به نژادگران معتقدند که کمبود تنوع ژنتیکی پیشرفت‌های اصلاحی را در آینده مختل می‌کند. ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر توارثی، حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در گونه گیاهی برای انتخاب والدین جهت رسیدن به هیبرید مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است (Singh 2003). تنوع ژنتیکی می‌تواند به وسیله تخمین فاصله ژنتیکی با استفاده از اطلاعات شجره یا با استفاده از نشانگرهای مولکولی شناسایی شود (Stachel et al. 2000). به منظور تخمین این تنوع انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط به نژادگران گیاهی استفاده می‌شود که از جمله آنها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی شامل بیوشیمیایی و DNA اشاره کرد (Farshadfar et al. 2020). نشانگرهای DNA امکان شناسایی مستقیم تنوع توالی ژنومی را در بین گیاهان فراهم می‌کنند که می‌تواند در تکمیل اطلاعات شجره نامه مورد استفاده قرار گیرند (Soleimani et al. 2002). نشانگر مولکولی (Start codon targeted) SCoT یا کدون‌های آغاز هدف واقع شده، روشی است که در آن پرایمرها براساس توالی‌های آغازگر (ATG) طراحی شده و نواحی بین کدون‌های آغازگر طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر می‌شود و تفاوت‌ها آشکار می‌شود (Kalendar 2007). مزایای این روش آسان و کم هزینه بودن نسبت به نشانگرهای دیگر است، همچنین تفکیک باندها در این روش بر روی ژل آگارز انجام می‌شود. از این نشانگر می‌توان در آزمایشگاه‌هایی که فقط ابزار استفاده از ژل آگارز وجود دارد در تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی، غربال به روش بالک و شناسایی QTL نیز استفاده کرد (Collard & Mackill 2009).

پژوهشگران دریافته‌اند که استفاده از نشانگر مولکولی (Start codon targeted) SCoT در مقایسه با نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع بیشتری را در گیاهان دارویی ریحان (Abuhashem et al. 2023; Ahmad et al. 2021)، (جاتروفا (*Jatropha curcas* L) و کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L) نشان داد (Mulpuri et al. 2013; Zamani et al. 2016).

محققین با ارزیابی مقایسه ای نشانگرهای CBDP و SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های مختلف *Aegilops* دریافتند که شاخص های تعیین کننده کارایی نشانگرهای مولکولی برای آغازگرهای SCoT بیشتر از CBDP بود و همچنین با استفاده از این این نشانگرها قطعات چندشکل تکثیر شد (Pour-Aboughadareh et al. 2020). محققین همچنین دریافتند که نشانگر مولکولی SCoT قابلیت تفکیک جمعیت‌های خشخاش کبیر را دارد و ابزاری کارآمد در مطالعه تنوع زنتیکی و ساختار جمعیت‌های این گیاه است، زیرا اطلاعات مربوط به چندشکلی، شاخص قدرت تفکیک آغازگرها و واریانس درون و بین جمعیت‌ها را در این گونه گیاهی به خوبی و با حداکثر مقادیر برآورد کرده است (Shaghaghi et al. 2019). در تحقیقی دیگر محققین دریافتند که استفاده از ۲۵ آغازگر SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۲ نمونه کاکوتی از مناطق مختلف جغرافیایی ایران سبب تکثیر ۲۰۹ قطعه با ۶۶ درصد چندشکلی در آن‌ها شد. همچنین ضریب تشابه ۰/۷ سبب تقسیم بندی کاکوتی‌های مورد بررسی به ۷ گروه شد (Zamani et al. 2016). بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های از رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) براساس ریخت شناسی و نشانگر مولکولی SCoT نشان داد که بیشترین وراثت پذیری به صفت تعداد ساقه اصلی تعلق داشت و همچنین آغازگرهای SCoT در مجموع ۵۵ باند تولید کردند و شاخص‌های مولکولی شامل محتوای اطلاعات چندشکلی برابر با ۰/۳۶، شاخص نشانگری برابر ۱/۸۲، نسبت چندگانه برابر با ۴/۸۰ و شاخص قدرت تفکیک برابر با ۵/۸۶ بودند (Nikkerdar et al. 2018). پژوهشگران با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنه براساس نشانگرهای مولکولی IRAP، ISSR و SCoT دریافتند که هر سه نشانگر تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت بنه نشان دادند. همچنین براساس این نشانگرها معلوم شد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های بنه در جنگل‌های زاگرس از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بیشتر است (Shah-Ghobadi et al. 2018). همچنین از نشانگر SCoT در بررسی روابط ژنتیکی میان گونه‌های دیپلوئید جنس *Triticum* و *Aegilops* (Ashraf Mehrabi & Shirvani 2022)، در بررسی تمایز دو گونه *Lolium perenne* و *Lolium multiflorum* Farshadfar et al. 2018)، بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) (Nikkerdar et al. 2018)، در تمایز جمعیت‌های خارشتر (*Alhagi maurorum*) (Zabet et al. 2022) استفاده شده است. در پژوهشی دیگر محققین با بررسی تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی شش توده ریحان (*Ocimum basilicum* L) به وسیله نشانگر AFLP دریافتند که با توجه به تشابه ژنتیکی پایین توده‌های اردستان و مهیار در برنامه‌های اصلاحی می توان به عنوان والد استفاده شوند تا نتایج تنوع ژنتیکی بالا تولید گردد و همچنین توده افغان می تواند در برنامه‌های اصلاحی مقاوم به تنش به عنوان والد مطلوب لحاظ شود (Shabahang et al. 2022). امروزه برخی برنامه‌های اصلاحی گیاهان برپایه انتخاب براساس فنوتیپ و خصوصیات مرفولوژیکی استوار است. ولی عیب این گونه گزینش‌ها محدود بودن تعداد نشانگرهای مرفولوژیکی و متاثر بودن این نشانگرها از عوامل محیطی است که سبب شده است تا این کمتر نشانگرها به کار بروند (Zaccardelli et al. 2003). ولی راهکارهای دیگری مانند استفاده از نشانگرهای مولکولی به خصوص نشانگرهای مبتی بر DNA سبب ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر شده‌اند و از طریق بی تاثیر کردن اثرهای ناشی از عوامل محیطی، سبب شده‌اند تا

مشکلات مربوط به نشانگرهای مرفولوژیک تا حدودی بر طرف شود (Mengoni et al. 2000). با این تفاسیر تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مرفولوژیک، می‌تواند به عنوان روشی موثر در استفاده گزینشی جمعیت‌های گیاهی باشد (Abdollahi Mandoulakani & Azizi 2018). همچنین بیان شده است که پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمی، محتمل‌ترین روش توجهی برای وجود ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است (Virk et al. 1996). علاوه بر این مشخص گردیده است که پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، سبب تسریع در فرآیند اصلاح نباتات شده است و در این روش به جای ارزیابی صفات، انتخاب غیرمستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته صورت می‌گیرد (Abdollahi Mandoulakani et al. 2011). گزارش شده است که استفاده از ۲۱۰ نشانگر تک‌نیری در گیاه کتان ایرانی سبب شد تا ۲۱ نشانگر (۱۳ نشانگر REMAP و ۸ نشانگر IRAP) با ۱۱ صفت مربوط به عملکرد کتان ایرانی پیوستگی داشته باشند (Abbasi Holasou et al., 2020). همچنین گزارش کردند که مقدار شاخص R² (ضریب تغییرات فنوتیپی توجیه شده) در گیاه کتان با استفاده از نشانگرهای REMAP و IRAP دامنه‌ای بین ۰/۰۹ تا ۰/۲۳ بود (Abbasi Holasou et al. 2020). محققین با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباط، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی را در جو شناسایی کردند (Ivandic et al. 2002). علاوه بر این مشخص شده است که با روش تجزیه ارتباط، ۵ نشانگر SSR مرتبط با سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و ۴ نشانگر مرتبط با ضریب آلودگی نهایی در گیاه گندم برای مقاومت به بیماری زنگ زرد معرفی شد (Khodarahmi et al. 2009). محققین دریافته‌اند که استفاده از نشانگر SNP سبب جداسازی ژنوتیپ‌های مختلف جو شد که خصوصیات مرفولوژیکی متفاوتی از جمله تعداد ردیف سنبله در خوشه داشتند، شد (Ataie et al. 2016). معلوم شده است که بین نشانگرهای SSR صفات عملکردی گندم از جمله خصوصیات مربوط به عملکرد و اجزای عملکرد و ارتفاع بوته گندم ارتباط چشمگیری وجود دارد (Maleki Rad et al. 2022). محققین با استفاده از تجزیه رگرسیون برای شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات مرفولوژیک پرداختند. نتایج این محققین نشان داد که نشانگرهای مرتبط با صفات وزن خشک کل و وزن خشک برگ یکسان بودند، همچنین نشانگرهای مرتبط با صفات تعداد برگ و نسبت وزن خشک برگ و وزن خشک ساقه به ترتیب Kourda و UBC849 بودند (Abdollahi Mandoulakani et al. 2011). همچنین سایر محققین از نشانگرهای SSR برای شناسایی ژنوتیپ‌های برنج متحمل به شرایط تنش خشکی استفاده کردند (Karim Koshteh & Sabouri 2016). در تحقیقی دیگر از نشانگرهای ریزوماهواره پیوسته با ژن‌های کنترل کننده تحمل به تنش خشکی برای بررسی تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای از ۲۰ رقم برنج ایرانی استفاده شد (Amininasab et al. 2012). با توجه به موارد ذکر شده در بالا، هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و مورفو-فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های ریحان تیمار شده با سطوح مختلف تنش شوری با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات از طریق رگرسیون در شرایط گلخانه‌ای است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش پنج ژنوتیپ ریحان (جدول ۱) تهیه شده از شرکت سپاهان رویش اصفهان به صورت آزمایش اسپلیت پلات پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار که فاکتور اصلی شامل تنش شوری در سه سطح (نرمال، تنش متوسط و تنش شدید) و عامل فرعی شامل ژنوتیپ (۵ سطح)، در گلدان و در شرایط گلخانه‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند. این آزمایش در سال زراعی ۱۴۰۲ در دانشگاه تحصیلات تکمیلی کرمان با طول جغرافیایی ۵۷ درجه و ۱۷ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۱ دقیقه شمالی با ارتفاع ۲۰۲۰ متر از سطح دریای آزاد در شرایط کشت گلخانه‌ای انجام شد. پس از ضدعفونی با مایع سفید کننده (هیپوکلرید سدیم) با غلظت ۲ درصد و دوبر آبشویی در پتری دیش کشت شدند و بعد از جوانه زدن (بعد از ۷ روز) به گلدان انتقال یافتند. آبیاری در هفته اول هر روز صورت می‌گرفت و پس از انتقال دان‌های ریحان به بستر کشت در گلدان ۴ کیلوگرمی حاوی نسبت‌های ۲:۱:۱ پرلایت، کوکوپیت و خاک منتقل شده و پس از رسیدن به مرحله ۶ برگی، تیمار شوری در سه سطح ۰، ۷۵ و ۱۳۵ میلی‌مولار کلرید سدیم هر ۲ روز یک‌بار با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر (به اندازه‌ای که آب از ته گلدان‌ها خارج می‌شد) اعمال گردید، و هر هفته یک‌بار آبشویی انجام گرفت تا نمک‌های انباشته شده از گلدان‌ها خارج شود. دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت ۶۵-۵۵ درصد در گلخانه بر روی گیاهان اعمال شد.

جدول ۱. نام ژنوتیپ‌های ریحان مورد مطالعه

Table 1. List of studied genotypes of Basil

ردیف Row	نام ژنوتیپ Genotype nam	مبدا Origin	ردیف Row	نام ژنوتیپ Genotype name	مبدا Origin
1	بنفش ایرانی Iranian Purpl	ایران Iran	4	ابلق Particolored	ایران Iran
2	سیاه Black	ترکیه Turkey	5	قرمز آتشین Red Rubin	دانمارک Denmark
3	سبز ایرانی Iranian Green	ایران Iran			

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌های جوان ژنوتیپ‌های ریحان با استفاده از روش CTAB

(Doyle 1991) با اندکی تغییرات در آزمایشگاه انجام گرفت. پس از استخراج DNA، کیفیت نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و کمیته با استفاده از روش اسپکترومتری تعیین شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از ده آغازگر SCOT (جدول ۲) که در مطالعات محققین دیگر تعداد باند و تنوع خوبی نشان داده بودند، استفاده شد (Collard & Mackill 2009; (Abuhashem et al. 2023; Ahmad et al. 2021).

جدول ۲. مشخصات آغازگر SCoT مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Specifications of SCoT primer used in this study

ردیف Row	آغازگرها Primers	توالی Sequence	دمای اتصال Annealing temperature	درصد GC % GC content
1	SCoT1	5'-CAACAATGGCTACCACCA-3'	48	50
2	SCoT10	5'-CAACAATGGCTACCAGCC-3'	50	56
3	SCoT11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	48	50
4	SCoT12	5'-ACGACATGGCGACCAACG-3'	52	61
5	SCoT16	5'-ACCATGGCTACCACCGAC-3'	52	61
6	SCoT21	5'-ACGACATGGCGACCCACA-3'	52	61
7	SCoT28	5'-CCATGGCTACCACCGCCA-3'	55	67
8	SCoT35	5'-CATGGCTACCACCGCCC-3'	57	72
9	SCoT37	5'-CAATGGCTACCACTAGCC-3'	50	56
10	SCoT48	5'-ACAATGGCTACCACTGGC-3'	50	56

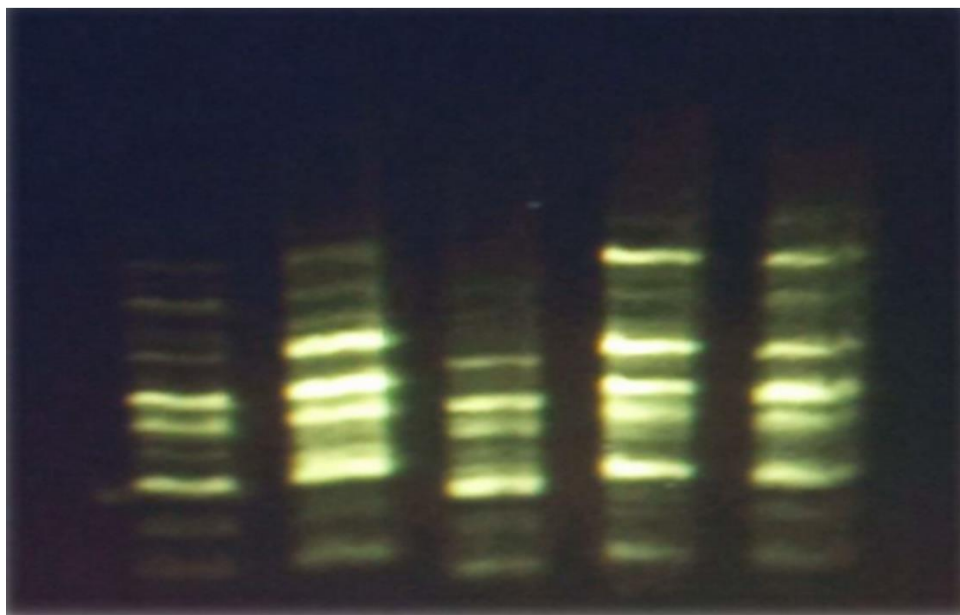
تکثیر DNA: واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد و غلظت نهایی DNA ژنومی ۴۰-۵۰ نانوگرم، dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ mM، MgCl₂ با غلظت نهایی 2 mM، آنزیم Taq پلیمرز با غلظت 1 Unit، بافر PCR با غلظت نهایی 1X، آغازگر با غلظت نهایی ۰/۵ μM استفاده شدند. چرخه حرارتی شامل ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴°C، سپس ۳۵ چرخه بصورت ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال آغازگر (بسته به آغازگر متفاوت بود، جدول ۲)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲°C و ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲°C بود. الکتروفورز محصولات PCR و آشکارسازی نوارها روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد و برای عکس برداری از ژل‌ها، از دستگاه ژل داک (Bio-Rad) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: امتیازدهی نوارها در ژل بر اساس صفر و یک (صفر، عدم وجود نوار و یک، وجود نوار) صورت گرفت. تعداد نوارهای تکثیر شده، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر بدست آمد و ماتریس صفر و یک به دست آمده برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و همچنین برآورد شاخص‌ها مورد استفاده قرار گرفت. محتوای اطلاعات چندشکل (Polymorphism Information Content) (Botstein et al. 1980)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Expected heterozygosity) (Liu 1998)، شاخص نشانگری (Marker Index)، نسبت چندگانه موثر (Effective Multiplex Ratio) (Powell et al. 1996) (Mean heterozygosity) و قدرت تشخیص نشانگر (Tessier et al. 1999) با استفاده از برنامه اکسل محاسبه شدند. تعداد آلل موثر، شاخص شانون (Shannon 2001) و تنوع ژنی (Nei 1972) با استفاده از نرم افزار POPGEN نسخه ۱/۳۱ تعیین گردید (Yeh 1999). تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های ریحان براساس داده‌های مولکولی استفاده شد. برای تجزیه خوشه‌ای داده‌های فنوتیپی ابتدا تفاوت‌ها و مشابهت ژنوتیپ‌های ریحان براساس معیارهای متفاوت فاصله و برای داده‌های مولکولی ابتدا تفاوت‌ها و مشابهت ژنوتیپ‌های ریحان براساس معیارهای متفاوت تشابه تهیه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش‌های مختلف حداقل واریانس وارد، دورترین همسایه‌ها، UPGMA، متوسط

فاصله بین و درون خوشه‌ها، مرکزی، میانه‌ای و نزدیک‌ترین همسایه‌ها رسم شد و از بین آن‌ها روش خوشه‌ای که بیشترین ضریب همبستگی کوفتیک را داشت و همچنین دندروگرام آن حالت زنجیره‌ای (Chaining effect) نداشت، انتخاب گردید. همچنین از روش بیشترین گسیختگی در فاصله ادغام خوشه‌ها برای برش و تعیین تعداد گروه‌ها استفاده شد و صحت گروه‌بندی با تجزیه تابع تشخیص مورد بررسی قرار گرفت. محاسبه تجزیه خوشه‌ای و تعیین رابطه بین داده‌های مولکولی نشانگرهای ScoT و صفات مورد مطالعه از طریق رگرسیون گام به گام در هر سه شرایط از نرم افزار PAST (Hammer et al. 2001) استفاده شد. همچنین همبستگی فنوتیپی با پکیج corrplot و با نرم افزار R انجام گردید (Wei et al. 2017).

نتایج و بحث

در این پژوهش از ده آغازگر ScoT استفاده شد و از بین آن‌ها هشت آغازگر چندشکلی نشان دادند که در مجموع ۱۰۵ باند به دست آمد. از بین این باندها، ۱۰۳ باند چندشکل بودند که میانگین آن ۱۲/۶۳ نوار چندشکلی در هر آغازگر بود (جدول ۴). پرایمر ScoT1 با ۱۷ باند بیشترین تعداد باند را نشان داد (شکل ۱)، در حالی که آغازگر ScoT28 با چهار باند کمترین تعداد باند چندشکل را داشت (جدول ۴). درصد پلی‌مورفیسم مشاهده شده در ژنوتیپ‌های ریحان از ۸۵/۷۱٪ تا ۱۰۰٪ در پرایمرهای مختلف، با میانگین درصد پلی‌مورفیسم ۹۶/۵۲٪ متغیر بود (جدول ۴). محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۳۵ تا ۰/۴۰، با میانگین ۰/۳۸ (جدول ۴) متغیر بود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (EH) برای نشانگرهای ScoT از ۰/۳۸ تا ۰/۴۵ با میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۲ بود (جدول ۴). شاخص نشانگر (MI) در بین نشانگرهای ScoT متفاوت بود، پرایمر ScoT11 بالاترین MI (۰/۳۸) و آغازگر ScoT16 کمترین (۰/۲۰) را نشان داد (جدول ۴). میانگین هتروزیگوسیتی (Havp) از ۰/۰۳ تا ۰/۰۷ برای نشانگرهای مورد مطالعه متغیر بود. پرایمرهای ScoT28 و به دنبال آن ScoT10 بالاترین میانگین هتروزیگوسیتی را داشتند که نشان دهنده کارایی بالای آنها در تشخیص پلی‌مورفیسم است (جدول ۴). ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ارقام و جمعیت‌ها اغلب شامل ارزیابی شاخص تنوع ژنتیکی است. شاخص تنوع ژنی در بین آغازگرهای مورد مطالعه با میانگین ۰/۴۲۶ در جمعیت مورد مطالعه قرار داشت (جدول ۴). پرایمرهای ScoT1 و ScoT10 به ترتیب بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. میانگین ضریب شانون برای نشانگرهای ScoT برابر با ۰/۶۱۴ بود که نشان دهنده سطح متوسط تنوع در جمعیت‌های مورد بررسی است. پرایمرهای ScoT1 و ScoT10 به ترتیب بالاترین مقادیر شاخص شانون را داشتند که نشان می‌دهد این آغازگرها تنوع ژنتیکی بیشتری را در جمعیت به دست آورده‌اند (جدول ۴). تعداد آلل‌های موثر بین ۱/۶۵۲ تا ۱/۸۴۳ با میانگین ۱/۷۶۹ در جمعیت مورد مطالعه متغیر بود (جدول ۴).



شکل ۱. چند شکلی نشانگر SCoT برای پنج ژنوتیپ ریحان با استفاده از آغازگر SCoT1.

Figure 1. SCoT marker profiles for 25 basil genotypes using SCoT1.

ارزیابی روش‌های مختلف تحلیل خوشه‌ای با استفاده از معیارهای شباهت مختلف نشان داد که روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) با شاخص شباهت دایس بالاترین مقدار ضریب همبستگی کوفتیک (۰/۹۱) را نشان داد. شکل ۴ نتایج خوشه‌بندی به دست آمده با استفاده از این روش را نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های ریحان بر اساس داده‌های مولکولی به سه گروه مجزا تقسیم شدند که با داده‌های فنوتیپی کاملاً همسو بودند و صحت آن با تجزیه تابع تشخیص ۱۰۰ درصد بود. ژنوتیپ‌های سیاه و ابلق در گروه ۱، ژنوتیپ‌های قرمز آتشین و سبز ایرانی در گروه ۲ و ژنوتیپ بنفش ایرانی هم در گروه ۳ قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های سیاه و ابلق کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین شباهت (۰/۵۹) را نشان دادند که نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی بالای آنها است. از سوی دیگر، ژنوتیپ‌های سیاه و بنفش ایرانی (۰/۲۷) کمترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند. نتایج خوشه‌بندی شباهت‌ها و تفاوت‌های بین جمعیت‌های هر گروه را برجسته می‌کند. فاصله‌ها یا شباهت‌های ژنتیکی مشاهده شده ممکن است به ترکیبات ژنتیکی متفاوت یا سایر عوامل محیطی موثر بر صفات مورد مطالعه نسبت داده شود.

در این تحقیق در شرایط نرمال در مجموع ۱۵ نشانگر (آلل) با صفات مورد مطالعه رابطه معنی‌داری پیدا کردند و در مدل رگرسیونی قرار گرفتند (جدول ۵). مشخص شد که برخی از این نشانگرها بر روی صفات متعدد تأثیر می‌گذارند، و در نتیجه تعداد نهایی نشانگرهای انتخابی نه نشانگر بود که به طور مؤثری تغییرات فنوتیپی این صفات را توضیح دادند. این نشانگرها می‌توانند در شناسایی ژنوتیپ‌های برتر بر اساس صفات مورد مطالعه موثر باشند. البته لازم به ذکر است که سایر نشانگرها تأثیر معنی‌داری بر مدل نشان ندادند.

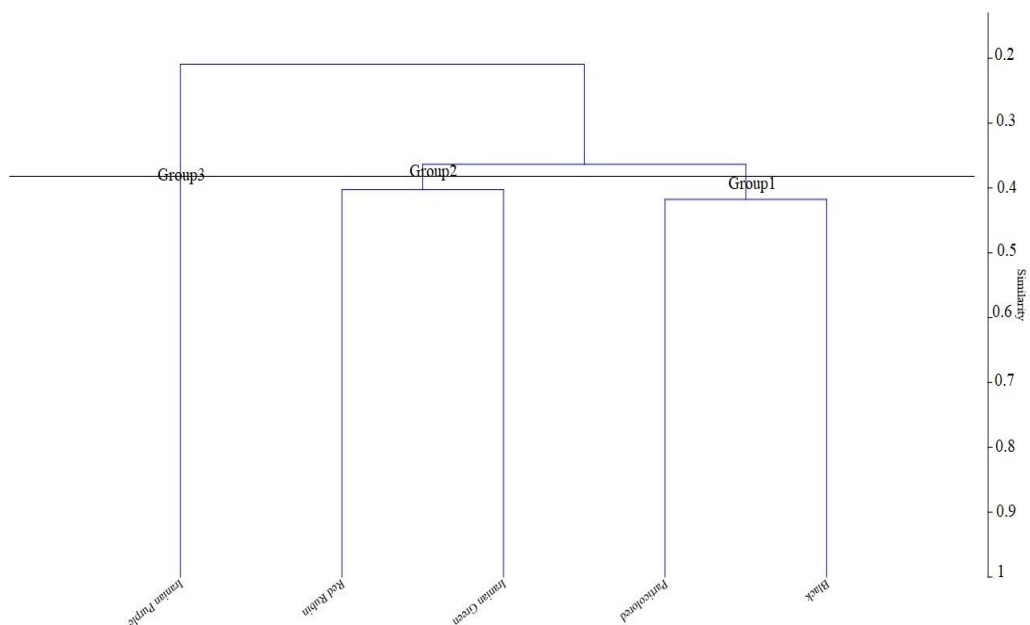
جدول ۴. مشخصات و شاخص‌های مطالعه آغازگرهای SCoT مورد استفاده در بررسی ژنوتیپ‌های ریحان

Table 4. Characteristics and study indices of SCoT primers of basil genotypes

قدرت تشخیص Discriminating power	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	محتوی اطلاعات چند شکل Polymorphism Information Content	تعداد نوار چند شکلی Polymorphism band	تعداد کل نوار Total band	درصد چند شکلی Polymorphism percentage	نام آغازگرها Primers
-2.800	0.452	0.400	17	17	100	SCoT1
-1.600	0.448	0.397	10	10	100	SCoT10
-3.500	0.387	0.348	12	13	92.31	SCoT11
-3.000	0.384	0.346	15	15	100	SCoT12
0.100	0.413	0.369	12	14	85.71	SCoT16
-2.000	0.440	0.390	16	17	94.12	SCoT21
-0.700	0.420	0.374	8	8	100	SCoT28
-2.800	0.436	0.387	11	11	100	SCoT35
-2.038	0.423	0.376	12.63	13.13	96.52	Average
0.277	8.600	0.032	1.843	0.643	0.452	SCoT1
0.298	5.400	0.055	1.833	0.638	0.448	SCoT10
0.378	7.400	0.051	1.731	0.600	0.412	SCoT11
0.312	7.600	0.041	1.652	0.569	0.384	SCoT12
0.196	4.000	0.049	1.735	0.601	0.413	SCoT16
0.259	7.400	0.035	1.810	0.630	0.440	SCoT21
0.276	3.800	0.073	1.753	0.608	0.420	SCoT28
0.348	6.800	0.051	1.800	0.626	0.436	SCoT35
0.293	6.375	0.048	1.769	0.614	0.426	Average
0.452	0.643	1.843	0.032	8.600	0.277	SCoT1
0.448	0.638	1.833	0.055	5.400	0.298	SCoT10
0.412	0.600	1.731	0.051	7.400	0.378	SCoT11
0.384	0.569	1.652	0.041	7.600	0.312	SCoT12
0.413	0.601	1.735	0.049	4.000	0.196	SCoT16
0.440	0.630	1.810	0.035	7.400	0.259	SCoT21
0.420	0.608	1.753	0.073	3.800	0.276	SCoT28
0.436	0.626	1.800	0.051	6.800	0.348	SCoT35
0.426	0.614	1.769	0.048	6.375	0.293	Average

تعداد نشانگرهای شناسایی شده برای صفات تعداد برگ، وزن اندام هوایی، کلروفیل کل، پرولین و ارتفاع بوته یک نشانگر بود و برای صفات عرض برگ، عملکرد برگ، طول ریشه، وزن خشک اندام هوایی و عملکرد برگ خشک دو نشانگر بود. همچنین قابل ذکر است که هیچ نشانگری با صفات کلروفیل a و b، طول برگ و کارتنوئید در شرایط نرمال رابطه معنی‌داری نشان نداد (جدول ۵). این نشانگرهای شناسایی شده برای صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال، همبستگی مثبتی با صفات داشتند. نسبت تغییرات فنوتیپی (R^2) توجیه شده توسط هر نشانگر برای صفات مورد مطالعه در جدول ۷ ارائه شده است و از مقدار ۷۷٪ تا ۱۰۰٪ برای صفات مورد مطالعه متغیر بود. مثلاً، نشانگر SCoT21-3 با صفت محتوی طول برگ همبستگی داشت و ۹۹/۸ درصد از تغییرات فنوتیپی آن را توجیه کرد. به طور مشابه، نشانگر SCoT21-3 رابطه معنی‌داری با وزن اندام هوایی نشان داد و ۸۴ درصد از تغییرات فنوتیپی آن را توضیح داد. علاوه بر این، دو نشانگر SCoT12-2 و SCoT21-3 با صفت عملکرد برگ همبستگی داشتند و در

مجموع ۹۸/۹ درصد از تغییرات آن را به خود اختصاص دادند. با محاسبه مقادیر استاندارد شده β این نشانگرها برای صفت عملکرد برگ در شرایط نرمال مشخص شد که SCoT21-3 اهمیت بیشتری و اثر افزایشدهی بر این صفت داشته است (جدول ۵).



شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های ریحان با روش UPGMA براساس نشانگرهای SCoT

Figure 2. Dendrogram obtained from cluster analysis of basil genotypes with UPGMA method based on SCoT markers

در مجموع ۱۲ نشانگر (آلل) با صفات مورد مطالعه در شرایط تنش شوری رابطه معنی‌داری داشتند و وارد مدل رگرسیونی شدند (جدول ۵). برخی از این نشانگرها همزمان بر روی چند صفت تأثیر گذاشتند و در نهایت تعداد نشانگرهای انتخابی در شرایط نرمال به هشت نشانگر کاهش پیدا کرد که به طور مؤثری تغییرات فنوتیپی این صفات را توضیح دادند. تعداد نشانگرهای شناسایی شده در شرایط تنش شوری برای صفات عرض برگ، تعداد برگ، وزن اندام هوایی، کلروفیل a، کاروتنوئید و ارتفاع بوته یک نشانگر بود در حالی که برای صفات طول برگ، عملکرد برگ و پرولین دو نشانگر شناسایی شد. همچنین قابل ذکر است که در شرایط تنش شوری هیچ نشانگری با صفات کلروفیل کل و b، طول ریشه، وزن خشک اندام هوایی و عملکرد برگ خشک رابطه معنی‌داری نشان نداد (جدول ۵). همبستگی نشانگرهای شناسایی شده با صفات مورد مطالعه مثبت بود. نشانگر SCoT11-5 هم با صفت تعداد برگ و هم عملکرد برگ، ارتباط داشت. صفت پرولین و طول برگ هم با نشانگر SCoT1-15 ارتباط داشتند. نشانگر SCoT12-2 با صفات عملکرد برگ و پرولین ارتباط داشت و در هر دو صفت هم حالت افزایشدهی داشت. نسبت تغییرات فنوتیپی (R^2) توجیه شده

توسط هر نشانگر برای صفات مورد مطالعه در شرایط تنش شوری بین ۷۹/۲٪ تا ۹۹/۱٪ متغیر بود. به عنوان مثال، نشانگرهای SCoT11-5 و SCoT12-2 با صفت عملکرد برگ همبستگی داشتند و ۹۹/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی آن را توجیه کردند و مقادیر استاندارد شده β برای آنها نشان داد که نشانگر SCoT12-2 اهمیت بیشتر و افزایشده‌ای بر صفت عملکرد برگ در شرایط تنش شوری داشت (جدول ۵).

بحث

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در مجموعه ژرم پلاسما می‌تواند سبب دسته‌بندی واقع‌گرایانه ارقام شود و همچنین شناسایی زیرمجموعه‌های با احتمال سودمندی زیاد را برای اهداف اصلاحی خاص تسهیل کند (Tripathi & Tripathi 2003). به نحوی که نسبت درصد قطعات چندشکل که حاصل از تقسیم تعداد قطعات چندشکل به کل قطعات تولید شده است یکی از مهمترین شاخص‌های در جهت نشان دادن تنوع ژنتیکی در مطالعه جمعیت‌هاست (Zamani et al. 2016). به طور کلی می‌توان بیان نمود که تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی می‌تواند توسط یکی از مکانیسم‌های: جهش، نوترکیبی ژنتیکی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده‌شدگی ژنتیکی و گزینش به وجود آید (Mehrabi & Shirvani, 2022). براساس نتایج تحقیق حاضر، مشخص شده است که استفاده از آغازگرهای نشانگر مولکولی SCoT می‌تواند سبب ایجاد تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپ‌های ریحان شود و همچنین سبب ایجاد چند شکلی قابل توجهی براساس نشانگر مولکولی SCoT در بین ژنوتیپ‌های ریحان شد. محققین تنوع ژنتیکی ۷۷ فرد از ۸ توده مختلف گیاه دارویی مریم نخودی را با نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج بررسی حاضر مشخص شد که استفاده از نشانگر مولکولی SCoT سبب ایجاد درصد چندشکلی بالایی (در ژنوتیپ‌های ریحان از ۸۵/۷۱٪ تا ۱۰۰٪ در پرایمرهای مختلف) شد که با نتایج انجام شده با نشانگر مولکولی SCoT بر روی نخود (*Cicer. Sp*)، انبه (*Mangifera indica*) و رمی (*Boehmeria nivea* L. Gaudich) (Amirmoradi et al. 2012; Luo et al. 2012; Satya et al. 2015) مطابقت دارد. یکی از شاخص‌های اصلی جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) است که از نظر قدرت تمایز آن‌ها به شمار می‌رود و مقادیر بالای این شاخص، عامل چندشکلی بالا در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمیاز نقش قابل توجهی ایفا می‌کند (Farshadfar et al. 2020). از طرفی، نشانگرهای با محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) زیاد برای تمایز ژنوتیپ‌ها و ارقام خویشاوند نزدیک مفید و حائز اهمیت هستند (Thimmappaiah et al., 2008). شاخص محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) محدوده‌ای صفر تا نیم در نشانگر غالب را در بر می‌گیرد و هر چه این عدد بیشتر باشد نشان دهنده‌ی بالا بودن قابلیت پرایمر یا نشانگر مورد استفاده شده در غربال نمودن ژنوتیپ‌هاست (Farshadfar et al. 2020). یکی دیگر از شاخص‌های مهم برای انتخاب پرایمر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) است، زیرا هم افراد دارای باند و هم تعداد آلل تاثیر پذیری دارد (Altıntaş et al. 2008).

جدول ۵. تجزیه رگرسیون گام به گام صفات مورد مطالعه (متغیر وابسته) و آغازگرهای SCoT (متغیرهای مستقل) مورد استفاده در ژنوتیپ‌های ریحان تحت شرایط نرمال و تنش شوری

Table 5. Stepwise regression analysis of studied traits (dependent variable) and SCoT markers (independent variables) in Basil under normal and drought conditions

صفت Trait	Marker	R	R ²	E	R ² change	F of R2 change	Standardize d beta coefficients	t-value
شرایط نرمال Normal Condition (S0)								
محتوی کلروفیل a Chlorophyll a content	SCoT21-3	0.892	0.726	0.12	0.726	11.74*	0.892	3.43*
محتوی کلروفیل b Chlorophyll b content	SCoT21-1	0.882	0.703	0.026	0.703	10.49*	-0.882	-3.239*
	SCoT21-3	0.993	0.972	0.008	0.269	69.18*	0.500	5.405*
محتوی کارتنوئید Carotenoid content	SCoT12-2	0.890	0.722	0.009	0.722	11.387*	-0.890	-3.374*
محتوی پرولین Proline content	SCoT21-6	0.952	0.874	0.284	0.874	28.81*	0.952	5.368*
کل وزن تازه Total fresh mass	SCoT11-5	0.933	0.828	1.21	0.828	20.25*	0.993	4.500*
	SCoT1-12	0.994	0.976	0.458	0.148	80.88*	0.347	4.374*
ارتفاع ساقه Shoot height	SCoT11-5	0.889	0.721	0.083	0.721	11.33*	0.889	3.367*
طول برگ Leaf length	SCoT21-3	0.985	0.961	0.500	0.961	99.75*	0.985	9.988*
	SCoT12-5	0.999	0.996	0.166	0.035	461.40**	-0.180	25.311*
عرض برگ Leaf width	SCoT1-2	0.925	0.809	0.530	0.809	17.89	0.925	4.230*
تعداد برگ Leaf number	SCoT11-5	0.953	0.877	0.001	0.877	29.53*	0.953	5.435*
وزن خشک برگ Leaf dry mass	SCoT11-5	0.928	0.815	1.196	0.815	18.56*	0.928	4.309*
	SCoT1-15	0.995	0.979	0.406	0.164	92.56*	-0.363	-4.902*
ارتفاع ریشه Root height	SCoT11-5	0.880	0.699	3.47	0.699	10.29*	0.880	3.208*
	SCoT12-2	1	0.999	0.142	0.300	3969.3*	0.482	42.309*
وزن تر اندام هوایی Shoot fresh mass	SCoT11-5	0.912	0.775	167.2	0.775	14.79*	0.912	3.847*
	SCoT28-4	0.993	0.942	59.48	0.167	69.37*	-0.430	-4.661*
وزن خشک اندام هوایی Shoot dry mass	SCoT11-5	0.993	0.980	0.007	0.980	201.60*	0.993	14.199*
	SCoT12-2	1	0.999	0.001	0.019	1908.6*	-0.130	-7.348*
Salt Stress 75 mM (S1) تنش شوری ۷۵ میلی مولار								
Chlorophyll b content	SCoT16-5	0.947	0.862	0.241	0.897	26.04*	0.947	5.103*
Total chlorophyll content	SCoT21-3	0.908	0.765	0.118	0.824	14.05*	-0.908	-3.748*
	SCoT21-2	0.995	0.982	0.032	0.176	108.17*	-0.517	-6.036*
Carotenoid content	SCoT28-4	0.985	0.961	0.005	0.971	100.24*	-0.985	-10.01*
Proline content	SCoT28-4	0.985	0.962	0.273	0.971	100.98*	-0.985	-10.04*
	SCoT12-14	1	0.998	0.058	0.029	1120.64*	-0.183	-7.920*
Total fresh mass	SCoT21-1	0.932	0.824	1.902	0.868	19.73*	0.932	4.443*
Total dry mass	SCoT21-1	0.899	0.744	0.436	0.808	12.638*	0.899	3.555*
	SCoT1-2	0.992	0.969	0.151	0.192	64.187*	0.426	7.797*
Shoot height	SCoT1-1	0.905	0.759	0.232	0.819	13.617*	0.905	3.690*
	SCoT1-2	0.999	0.997	0.025	0.181	706.613*	0.977	36.23**
Leaf length	SCoT1-1	0.919	0.792	0.408	0.844	16.20*	0.919	4.025*
Leaf width	SCoT1-12	0.983	0.956	0.012	0.967	87.690*	-0.983	-9.364*
Leaf number	SCoT28-4	0.985	0.961	0.009	0.971	98.85*	-0.985	-9.943*
Leaf fresh mass	SCoT21-9	0.972	0.926	0.85	0.944	50.913*	-0.972	-7.135*
Leaf dry mass	SCoT21-6	0.955	0.883	1.21	0.912	31.06*	0.955	5.574*
Root height	SCoT12-2	0.945	0.89	1.76	0.894	25.21*	-0.945	-5.021*
Shoot fresh mass	SCoT28-4	0.882	0.704	56.01	0.778	10.51*	-0.882	-3.243*
	SCoT21-3	1	0.998	4.21	0.222	1192.9**	-0.761	-35.99*
Salt Stress 135 mM (S2) تنش شوری ۱۳۵ میلی مولار								
Chl a content	SCoT1-15	0.889	0.720	0.035	0.790	11.27*	-0.889	-3.358*
Chl b content	SCoT1-2	0.974	0.930	0.003	0.948	54.368*	-0.974	-7.373*
Carotenoid content	SCoT12-5	0.926	0.811	0.001	0.858	18.150**	-0.926	-4.260*
Proline content	SCoT1-15	0.892	0.727	0.411	0.795	11.66*	-0.892	-3.415*
Total fresh mass	SCoT1-15	0.914	0.780	0.291	0.835	15.144*	-0.914	-3.892*
Total dry mass	SCoT1-15	0.917	0.789	0.284	0.842	15.938*	-0.917	-3.992*
	SCoT11-5	0.921	0.798	0.0004	0.848	1677*	0.921	4.096*
Leaf number	SCoT21-9	0.993	0.974	0.0001	0.152	76.156*	1.088	12.33**
Leaf fresh mass	SCoT35-5	0.963	0.903	0.638	0.927	38.317**	0.963	6.190**
Root height	SCoT35-5	0.940	0.965	0.808	0.884	22.777*	0.940	4.773*
Shoot dry mass	SCoT12-1	0.945	0.985	0.050	0.892	24.850*	-0.945	-4.985*

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively. * و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

در حالت کلی و براساس کلیه شاخص‌های مورد بررسی در این تحقیق، مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی ژنوتیپ‌های ریحان در شرایط تنش شوری، آغازگرهای SCoT1 و SCoT10 تعیین شد که پیشنهاد می‌گردد برای آنالیز و بررسی مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپ‌های این گونه در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرند. پژوهشگران در بررسی خود بر روی برخی اکوتیپ‌های متنوع گیاه مریم نخودی با استفاده از نشانگر ISSR براساس شاخص‌های درصد چندشکلی، قدرت تفکیک (RP) و محتوی اطلاعات چندشکلی نیز مانند بررسی حاضر، آغازگرهای برتر را در جهت آنالیز ژرم پلاسما این گونه معرفی کردند. در این بررسی میانگین تشابه برابر با ۰/۴۲۴ بود که پایین بودن تشابه ذکر شده را می‌توان عامل نشان دهنده تنوع ژنتیکی مطلوب و قابل قبول در بین ژنوتیپ‌های ریحان براساس آغازگرهای مورد بررسی باشد (Esfandyari et al. 2017). که این موضوع می‌تواند یک روش مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در گیاه دارویی ریحان باشد.

ارزیابی روش‌های مختلف تحلیل خوشه‌ای با استفاده از معیارهای شباهت مختلف نشان داد که روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) با شاخص شباهت دایس بالاترین مقدار ضریب همبستگی کوفتیک (۰/۹۱) را نشان داد. شکل ۴ نتایج خوشه‌بندی به دست آمده با استفاده از این روش را نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های ریحان بر اساس داده‌های مولکولی به سه گروه مجزا تقسیم شدند که با داده‌های فنوتیپی کاملاً همسو بودند. محققین در تحقیق خود بر روی روابط ژنتیکی میان گونه‌های دیپلوئید جنس *Aegilops* و *Triticum* دریافتند که براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ضرایب فاصله جاکارد، جمعیت‌ها در ۵ گروه قرار گرفتند و گونه‌ها به طور صد در صد از یکدیگر تفکیک شدند (Ashraf Mehrabi & Shirvani 2022). پژوهشگران در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های مریم نخودی ایران با استفاده از مارکر مولکولی RAPD به تنوع قابل قبولی در بین جمعیت‌های مورد بررسی دست یافتند و بیان کردند که این نشانگر کارآیی بالایی در تفکیک کردن جمعیت‌ها از یکدیگر دارد (Pesaraklu et al. 2012). همچنین محققین دریافتند براساس تجزیه خوشه‌ای با الگوریتم UPGMA، در ضریب تشابه ۰/۷ نمونه‌های کاکوتی به ۷ گروه تقسیم شدند (Zamani et al. 2016).

شاخص نشانگر (MI) یک برآورد دقیق و مناسب برای کارآیی آغازگرها بوده که به تعداد نوارهای چندشکلی به دست آمده و به پوشش بالای ژنوم توسط نشانگر نسبت داده می‌شود (Timmappaiah et al. 2009). همچنین مشخص شده است که بالا بودن شاخص نشانگر، نشان از فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد نور چندشکلی بیشتر است. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از مهمترین شاخص‌ها جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این شاخص، دلیل بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه داشته و در تفکیک و تمایز افراد نقش قابل توجهی دارد (Timmappaiah et al. 2009). در بررسی حاضر شاخص نشانگر (MI) در بین نشانگرهای SCoT متفاوت بود، پرایمر SCoT11 بالاترین MI (۰/۳۸) و آغازگر SCoT16 کمترین (۰/۲۰) را نشان داد (جدول ۴). در تحقیقی دیگر نیز مشخص شد که شاخص نشانگر در آغازگرهای SC6، SC11، SC36 و SC20 از مقادیر بالایی برخوردار بودند و برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما گونه‌های *Aegilops* و *Triticum*

در تحقیقات بعدی استفاده خواهد شد (Mehrabi et al. 2022). محققین در بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف جنس پنبرک و مریم نخودی با استفاده از مارکر مولکولی SCoT براساس پارامترهای نشانگری PIC، RP، EMR و MI آغازگرهای مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مورد مطالعه معرفی کردند (Noorian 2020; Farshadfar et al. 2018).

در تحقیق حاضر میانگین هتروزیگوسیتی (Havp) از ۰/۰۳ تا ۰/۰۷ برای نشانگرهای مورد مطالعه متغیر بود. پرایمرهای SCoT28 و به دنبال آن SCoT10 بالاترین میانگین هتروزیگوسیتی را داشتند که نشان دهنده کارایی بالای آنها در تشخیص پلی مورفیسم است (جدول ۴). ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ارقام و جمعیت‌ها اغلب شامل ارزیابی شاخص تنوع ژنتیکی است. شاخص تنوع ژنی در بین آغازگرهای مورد مطالعه با میانگین ۰/۴۲۶ در جمعیت مورد مطالعه قرار داشت (جدول ۴). پرایمرهای SCoT1 و SCoT10 به ترتیب بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. میانگین ضریب شانون برای نشانگرهای SCoT برابر با ۰/۶۱۴ بود که نشان دهنده سطح متوسط تنوع در جمعیت‌های مورد بررسی است. پرایمرهای SCoT1 و SCoT10 به ترتیب بالاترین مقادیر شاخص شانون را داشتند که نشان می‌دهد این آغازگرها تنوع ژنتیکی بیشتری را در جمعیت به دست آورده‌اند (جدول ۴). محققین با تحقیق بر گونه‌های *Aegilops* و *Triticum* دریافتند که فاصله بین جمعیت‌ها برابر با ۰/۳۰۷ بود و بیان کردن که پایین بودن فاصله ژنتیکی یاده شده می‌تواند به دلیل طول باند آغازگرهای SCoT و تکثیر انتخابی‌تر باشد. علاوه بر این براساس نظر این محققین مشخص شده است که هیبراسیون بین جمعیت‌ها با فاصله ژنتیکی زیاد می‌تواند یک روش مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در گیاهان باشد. همچنین این محققین معتقدند که نشانگر مولکولی SCoT تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌ها براساس مناطق ژنی (تکثیر نواحی با کدون آغاز) نشان می‌دهد (Ashraf Mehrabi & Shirvani 2022).

در تحقیق حاضر در مجموع ۱۲ نشانگر (آلل) با صفات مورد مطالعه در شرایط تنش شوری رابطه معنی‌داری داشتند و وارد مدل رگرسیونی شدند (جدول ۵). برخی از این نشانگرها همزمان بر روی چند صفت تأثیر گذاشتند و در نهایت تعداد نشانگرهای انتخابی در شرایط نرمال به هشت نشانگر کاهش پیدا کرد که به طور مؤثری تغییرات فنوتیپی این صفات را توضیح دادند. تعداد نشانگرهای شناسایی شده در شرایط تنش شوری برای صفات عرض برگ، تعداد برگ، وزن اندام هوایی، کلروفیل a، کاروتنوئید و ارتفاع بوته یک نشانگر بود در حالی که برای صفات طول برگ، عملکرد برگ و پرولین دو نشانگر شناسایی شد. همچنین قابل ذکر است که در شرایط تنش شوری هیچ نشانگری با صفات کلروفیل کل و b، طول ریشه، وزن خشک اندام هوایی و عملکرد برگ خشک رابطه معنی‌داری نشان نداد (جدول ۵). همبستگی نشانگرهای شناسایی شده با صفات مورد مطالعه مثبت و یا منفی بود. نشانگر SCoT11-5 هم با صفت تعداد برگ و هم عملکرد برگ، ارتباط داشت. صفت پرولین و طول برگ هم با نشانگر SCoT1-15 ارتباط داشتند. نشانگر SCoT12-2 با صفات عملکرد برگ و پرولین ارتباط داشت و در هر دو صفت هم حالت افزایش‌دهی داشت. نسبت تغییرات فنوتیپی (R²) توجیه شده توسط هر نشانگر برای صفات مورد مطالعه در شرایط تنش شوری بین ۷۹/۲٪ تا ۹۹/۱٪ متغیر بود. به عنوان مثال، نشانگرهای SCoT12-2 و SCoT11-5 با صفت عملکرد برگ همبستگی داشتند و ۹۹/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی آن را توجیه کردند و مقادیر استاندارد شده β برای آنها نشان داد که نشانگر SCoT12-2 اهمیت بیشتر و افزایش‌دهی

بر صفت عملکرد برگ در شرایط تنش شوری داشت (جدول ۵). همچنین محققین برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیت های یونجه زراعی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای ISSR استفاده نمودند. آنها کمترین تعداد نشانگر را برای صفات تعداد برگ و وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه گزارش نمودند و نشانگر UBC849، ۳۷٪ از تغییرات وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه را توجیه کردند (Mandoulakani & Azizi 2018). استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباط، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیم های مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند (Ivandic et al. 2002). در تحقیقی دیگر استفاده از نشانگرهای SSAP، ۳۲ نشانگر در گندم دوروم شناسایی نمودند که حداقل با یکی از صفات زراعی مورد بررسی رابطه معنی داری داشت (Rashidi monfared et al. 2008). علاوه بر این محققین برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام زمینی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR استفاده و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان های آگاهی بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای موثر حاصل از این مطالعات می تواند در برنامه های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت های نقشه یابی استفاده شوند (Mandoulakani et al. 2011). محققین دیگر نیز ۱۴ مکان پیوسته با ۷ صفت مورفولوژیک گیاهان ریحان شناسایی کردند و همچنین در بررسی آن ها دامنه تغییرات فنوتیپی توجیه شده بین ۳ الی ۲۹٪ متغیر بود (Aghaali et al. 2018).

نتیجه گیری: در مجموع با توجه به تنوع ژنتیکی بالایی که در ژنوتیپ های ریحان در این تحقیق دیده شد می توان از این خصوصیات در جهت اصلاح سایر ژنوتیپ های ریحان به منظور افزایش بهره وری بیشتر از ریحان در جهت مصارف دارویی و ادویه ای استفاده نمود. همچنین هیبراسیون بین ژنوتیپ ها یک توده و توده های مختلف ریحان می تواند یک روش مناسب برای برنامه های اصلاحی در ریحان باشد. از آنجایی که نشانگر SCoT تنوع را براساس تنوع در مناطق ژنی نشان می دهد، استفاده از نتایج این بررسی برای تلاقی نمونه های با فواصل ژنتیکی زیاد مانند ژنوتیپ های سیاه و بنفش ایرانی حائز اهمیت است.

سپاسگزاری: از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می شود.

منابع

- اشرف مهرابی علی، شیروانی هومن (۱۴۰۱) ارزیابی کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی روابط ژنتیکی میان گونه های دیپلوئید جنس *Aegilops* و *Triticum*. پژوهش های سلولی و مولکولی ۳۵(۱)، ۱۲-۱.
- آقاعلی زهرا، درویش زاده رضا، آقایی محمد. (۱۳۹۶) تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک در توده های ایرانی ریحان با استفاده از نشانگر ISSR. زیست فناوری مدرس ۹، ۹۳-۱۰۲.
- امینی نسب رضا، ابراهیمی محمدعلی، عبادی علی اکبر (۱۳۹۱) بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برنج ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورا پیوسته با ژن های مقاومت به خشکی. مجله زیست فناوری گیاهان زراعی ۲، ۱۰-۱.

بدخشان فرزانه، صدیقی دهکردی فریده، مرتضوی سیدمحمدحسین (۱۳۹۸) اثر تراکم کاشت و رقم بر خصوصیات مرفولوژیکی، عملکرد و صفات کیفی ریحان (*Ocimum basilicum L.*) در کشت هیدروپونیک. علوم باغبانی ۳۲، ۲۶۳-۲۷۲.

بینش سحر، اکبری غلامعباس، سلطانی الیاس، امینی فاطمه (۱۳۹۷) کمی سازی واکنش جوانه زنی توده های مختلف ریحان (*Ocimum basilicum L.*) به دما. به زراعی کشاورزی ۲۰، ۴۲۷-۴۳۸.

پورابوقداره علیرضا، اطمینان علیرضا، شوشتی لیلا، ملکی تبریزی ندا (۱۳۹۸) ارزیابی مقایسه ای نشانگرهای SCoT و CBDP در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در توده های مختلف *Aegilops* مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱، ۱۷۴-۱۵۳.

رشیدی منفرد سجاد، مردی محسن، حسین زاده عبدالهادی، تقوی محمدرضا (۱۳۸۷) تجزیه ارتباطی بین صفات زراعی مهم و نشانگرهای رتروترانسپوزونی SSAP در نمونه های گندم دوروم. ژنتیک نوین ۳، ۳۵-۲۹.

زمانی نوید، زمانی وحید، میرزایی خالد (۱۳۹۵) بررسی تنوع ژنتیکی کاکوتی (*Ziziphora tenuior L.*) با استفاده از نشانگر SCoT. ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۴، ۱۷۷-۱۸۹.

رضایی مودب علیرضا، نبوی کلات سید محسن (۱۳۹۱) اثر کاربرد ورمی کمپوست و کودهای زیستی بر عملکرد بذر و ازجیا عملکرد ریحان (*Ocimum basilicum L.*). اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی ۲، ۱۵۷-۱۵۰.

عطایی رضا، محمدی ولی اله، طالعی علیرضا، تقوی محمدرضا (۱۳۹۵) نقشه یابی ارتباطی عملکرد و برخی صفات زراعی مهم در جو (*Hordeum vulgare L.*). ژنتیک نوین ۱۲، ۴۲۳-۴۱۱.

شاه قبادی هانیه، شعبانیان نقی، خدیوی علی، رحمانی محمد شفیع (۱۳۹۷) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های بنه (*Pistacia atlantica Desf.*) در جنگل های زاگرس براساس نشانگرهای مولکولی ISSR، IRAP و SCoT. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۶، ۱۹۵-۱۷۷.

شقایق جواد، کردنائیج علاء الدین، قادری اردشیر (۱۳۹۸) ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت های گیاه *Papaver bractaetum Lindl.* رشته کو البرز با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۸، ۹۰-۱۰۲.

شاهنگ روجا، صمصام پور داود، زینلی حسین، ابراهیمی مرتضی، فرهای علی. (۱۴۰۱) بررسی تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی شش توده ریحان (*Ocimum basilicum L.*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۳، ۷۱-۵۶.

عباسی لاهو حسین، عبدالهی مندولکانی بابک، حسن زاده قورت تپه عبدالله (۱۳۹۹) تجزیه ارتباط عملکرد و برخی صفات گیاهی در ژنوتیپ های کتان ایرانی با استفاده از نشانگرهای REMAP و IRAP. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۳۳، ۴۹۵-۴۸۴.

ضابط محمد، پیش قدم سمانه، علیزاده زهره (۱۴۰۱) کارایی نشانگرهای مولکولی RAPD و SCoT در تمایز جمعیت های خارشتر (*Alhagi maurorum*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۳۰، ۳۸-۱۶.

عبدالهی مندولکانی بابک، عزیزی حیدر (۱۳۹۳) شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مرفولوژیک در جمعیت های یونجه ایرانی (*Medicago sativa L.*). مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۲۷، ۲۶۸-۲۶۰.

عبدالهی مندولکانی بابک، اعلمی علی، اصفهانی مسعود (۱۳۸۹) تجزیه ارتباط برای صفات مرفولوژیک در بادام زمینی (*Arachis hypogea L.*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. مجله علوم زراعی ایران ۱۲، ۵۱۹-۵۱۰.

فرشادفر محسن، مرادزاده نازنین، فرشادفر عزت اله، شیروانی هومن (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های از رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) براساس ریخت شناسی و نشانگر مولکولی SCoT. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۵، ۲۳۱-۲۱۲.

شیروانی هومن، امجدیان مصطفی، نوریان عبدالمهدی (۱۳۹۹) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گونه مریم نخودی (*Teucrium polium* L.) در غرب ایران با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT. مجله پژوهش‌های گیاهی ۳۳، ۳۵۳-۳۴۳.

ملکی راد زینب، زینلی نژاد خلیل، پهلوانی محمد هادی (۱۴۰۰) بررسی وجود ارتباط بین نشانگرهای SSR با صفات مرتبط با عملکرد در گندم نان. ژنتیک نوین ۱۶، ۸۵-۹۰.

کریم کشته رضا، صبوری حسین (۱۳۹۴) شناسایی ژنوتیپ‌های برنج متحمل به تنش خشکی یا تجزیه و تحلیل چند متغییره. مجله بوم شناسی گیاهان زراعی ۱۱، ۱۳-۲۴.

فرشادفر محسن، شیروانی، هومن، امجدیان مصطفی، و یاقوتی پور آمنه (۱۳۹۷) کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تمایز دو گونه *Lolium multiflorum* و *Lolium perenne*. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۶، ۲۰۷-۲۲۰.

نیک کردار فریبا، فرشادفر محسن، ابراهیمی محمد علی، شیروانی هومن (۱۳۹۶) ارزیابی کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*). اصلاح گیاهان زراعی ۹، ۹۵-۱۰۲.

نوریان مهدی (۱۳۹۹) بررسی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های ایرانی پنیرک (*Malva neglecta*) با استفاده از کدون آغاز هدف واقع شده (SCoT). مجله پژوهش‌های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۳، ۱۱۶-۱۲۵.

References

- Abbasi Holasou H, Abdollahi Mandoulakani B, Hassanzadeh Ghorttaped A (2020) Association analysis for yield and plant characteristics in Iranian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.) using IRAP and REMAP markers. Cell Mol Res (Iran J Biol) 33, 484-495 (In Persian).
- Abdollahi Mandoulakani B, Alami A, Esfahani M (2010) Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. Iran J Crop Sci 12, 510-519 (In Persian).
- Abdollahi Mandoulakani B, Azizi H (2014) Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. Cell Mole Res (Iran J Biol) 27, 260-268 (In Persian).
- Abuhashem YS, Khalil HB, El-Tahawey MAFA et al. (2023) Exploring the morphological and genetic diversity of Egyptian basil landraces (*Ocimum* sp.) for future breeding strategies. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci 12, 70.
- Afzal S, Saleem M, Yasmin R, et al. (2010) Pre and post cloning characterization of a beta-1, 4-endoglucanase from *Bacillus* sp. Mol Bio Res 37, 23-1717.

- Aghaali Z, Darvishzadeh R, Aghaei M (2018) Association Analysis for Morphological Traits in Iranian Basil Accessions Using ISSR Marker. *Mod J Biotech* 9(1), 93-102 (In Persian).
- Ahmed TYA, Hussein MH, El-Maaty SA, Moghaieb REA (2021) Detection of genetic variation among five basil species by using ISSR, SCOT and SRAP markers. *Inter J Health Sci* 6(S6), 9909–9922.
- Akyol I, Comlekcioglu U, Kar B, et al. (2009) Cloning of a xylanase gene xyn2A from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia* 64, 664–670.
- Altıntaş S, Toklu F, Kafkas S et al (2008) Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant breed* 127, 9-14.
- Amininasab A, Ebrahimi MA, Ebadi AA, and Ghodsi M (2012) Study of genetic variation in Iranian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using by molecular markers linked with drought resistance genes. *Crop biotech* 2, 15-25 (In Persian).
- Amirmoradi B, Talebi R, Karami E (2012) Comparison of genetic variation and differentiation among annual Cicer species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant system evolu* 298, 1679-1688.
- Ashraf Mehrabi A, Shirvani H (2022) Evaluation of the efficiency of SCoT molecular marker in the study of genetic relationships between *Aegilops* and *Triticum* diploid species. *Cell Mole Res (Iran J Biol)* 35, 105-121 (In Persian).
- Ataie R, Mohammadi VA, Talei AR and Taqvi MR (2015) Relationship mapping of yield and some important agricultural traits in barley (*Hordeum vulgare* L). *Mod Gen J* 12(3), 411-433 (In Persian).
- Badakhshande F, Sedighi Dehkordi F, Mortazavi SHM (2018) The Effect of Plant Density and Cultivar on Morphological Characteristics, Yield and Quality Traits of Basil (*Ocimum basilicum* L.) in Hydroponic System. *J Horti Sci* 32, 263-272 (In Persian).
- Bhardwaj N, Kumar B, Verma P (2019) A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresour Bioprocess* 6, 40.
- Bilgin S, Ulusu Y, Kudug H, Gokce I (2018) Cloning, Expression and Characterization of Xylanase (xyn-akky1) from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. *Sakarya Uni J Sci* 22, 1508–1517.
- Binesh S, Akbari GhA, Soltani E, Amini F (2018) Quantifying the germination response of different Basil accessions (*Ocimum basilicum* L.) to temperature. *Crop Improve (J Agri Crops Pro)* 20, 427-439 (In Persian).

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314–331.
- Collard BC, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant mole biol report* 27, 86-93.
- Dhiman SS, Sharma J, Battan B (2008) Industrial applications and future prospects of microbial xylanases. *Bio Resource* 3, 1377–1402.
- Doyle J (1991) DNA protocols for plants. In: *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, 283-293.
- Engberg M, Hedemann S, Steinfeldt S, Jensen B (2004) Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract. *Poult Sci* 83, 925–938.
- Fajardo P, Pastrana L, Endez J, et al. (2012) Effects of Feeding of Two Potentially Probiotic Preparations from Lactic Acid Bacteria on the Performance and Faecal Microflora of Broiler Chickens. *The Sci World J* 23, 1–9.
- Farshadfar M, Moradzade N, Farshadfar E, Shirvani H (2017) Genetic diversity among fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers. *Iran J Range Fore Plant Breed Gene Res* 25, 212-231 (In Persian).
- Farshadfar M, Shirvani H, Amjadian M, Yaghotipoor A (2018) Application of SCoT marker to discriminate *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* species. *Iran J Range Fore Plant Breed Gene Res* 26, 206-220 (In Persian).
- Farshadfar MF, Faraz Sh, Farshadfar A, Jafar AA (2017) Identification of microsatellite markers in a part of field alfalfa (*Medicago sativa* L.) of Iran. *Mod Gene J* 5, 57-66 (In Persian).
- Glickman JF, Schmid A (2007) Farnesyl pyrophosphate synthase: real-time kinetics and inhibition by nitrogen-containing bisphosphonates in a scintillation assay. *Assay Drug Dev Technol* 5, 205–214.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4, 9-15.
- Hristov AN, Oh J, Lee C, et al. (2013) Mitigation of greenhouse gas emissions. In Gerber, PJ, Henderson, B and Makkar, HPS. Eds. *Livestock production—a review of technical options for non-CO2 emissions*. FAO Anim Prod Health Paper 177.
- Ivandic V, Hackett CA, Nevo E et al. (2002) Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Mole Biol* 48, 511-527.
- Jie H, Li Z, Wang P, et al. (2017) A simple method based on Sanger sequencing and MS Word wildcard searching to identify Cas9-induced frameshift mutations. *Lab Invest* 97, 1500–1507.

- Kalendar R (2007) Fast PCR: a PCR primer and probe design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Helsinki, Finland.
- Karim Koshteh R, Sabouri H (2015) Ricedrought-tolerant genotypes recognition using multivariate analysis. *Agro J* 11(4), 13-24 (In Persian).
- Khodarahmi M, Mohammadi S, Jalalkamali M (2009) Identification of informative marker for yellow rust resistant related cultivars. In: The 6th national biote conger Iran, 13-15.
- Laemmler UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laura R, Jarboe AB, Ping LB, et al. (2012) Optimization of enzyme parameters for fermentative production of biorenewable fuels and chemicals. *Comput Struct Biotechnol J* 3, e10005.
- Liu BH (1998) Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Luo C, He X-H, Chen H et al. (2012) Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis. *Gene res crop evolu* 59, 1505-1515.
- Ma L, Aizhan R, Wang X, et al. (2020) Cloning and characterization of low-temperature adapted GH5-CBM3 endo-cellulase from *Bacillus subtilis* 1AJ3 and their application in the saccharification of switchgrass and coffee grounds. *AMB Expr* 10, 42.
- Maleki Rad Z, Zaynali Nezhad K, Pahlavani MH (2021) Assessment of SSR marker-trait association for yield related characters in bread wheat. *Mod Gene J*, 16:85-90 (In Persian).
- Mao S, Lu Z, Zhang CH et al. (2013) Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9. *Appl Biochem Biotechnol* 169, 960–975.
- McCleary BV (2001) Analysis of feed enzymes. In: *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, M.R. Bedford and G.G. Partridge (Eds.). CAB International, 406.
- Mengoni A, Gori A, Bazzicalupo M (2000) Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant breed* 119, 311-317.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31, 426–428.
- Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M, et al. (2016) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Open J Anim Sci* 6, 1-8.
- Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGF β 3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agric Biotech J* 5, 125-136 (In Persian).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 679-685.

- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malay Appl Biol* 47, 85–90.
- Mulpuri S, Muddanuru T, Francis G (2013) Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. *Plant sci* 207, 117-127.
- Ndazigaruye G, Kim DH, Kang CH, et al. (2019) Effects of Low-Protein Diets and Exogenous Protease on Growth Performance, Carcass Traits, Intestinal Morphology, Cecal Volatile Fatty Acids and Serum Parameters in Broilers. *Anim* 9, 226.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The Am Nat* 106, 283-292.
- Nikkerdar F, Farshadfar M, Ebrahimi MA, Shirvani H (2018) Genetic Diversity among Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Landrace using Scot Markers . *J Crop Breed* 9 :95-102 (In Persian).
- Noorian M (2020) Genetic variation among Iranian genotypes of Malva (*Malva neglecta*) using Start codon targeted (SCoT). *Cell Mole Res (Iran J Biol)* 33, 116-125 (In Persian).
- Osek M, Milczarek A, Janocha A, Świnarska R (2010) Effect of triticale as a partial or complete wheat and maize substitute in broiler chicken diets on growth performance, slaughter value and meat quality. *Ann Anim Sci* 10, 275–283.
- Pastor FIJ, Gallardo O, Sanz-Aparicio J (2007) Xylanases: molecular properties and applications. In: Polaina J, MacCabe AP (eds) *Industrial enzymes*. Springer, 65–82.
- Pour-Aboughadareh AR, Etminan AR, Shoostari L, Maleki-Tabrizi N (2019) Comparative assessment of SCoT and CBDP markers for investigation of genetic diversity existing in different aegilops species. *Agri Biotech J* 11, 153-174 (In Persian).
- 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.
- Purushothaman B, PrasannaSrinivasan R, Suganthi P et al. (2018) A comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *J Natural Rem*, 71-85.
- Rashidi Monfared S, Mardi S, Hosseinzadeh A, Taqavi MR (2008) Correlation analysis between important agronomic traits and SSAP retrotransposon markers in durum wheat samples. *Mod Gene J* 3(2), 29-35 (In Persian).
- Rezaee Moadab A, Nabavi Kalat SM (2012) The Effect of Vermicompost and Biological Fertilizer Application on Seed Yield and Yield Components of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Crop Ecophysio* 6, 22: 157-170 (In Persian).
- Sadeghi S, Rahnavard A, Ashrafi ZY (2009) The effect of plant density and sowing date on yield of Basil (*Ocimum basilicum* L.) in Iran. *J Agri Technol* 5, 413-422.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Satya P, Karan M, Jana S et al. (2015) Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. *Meta gene* 3, 62-70.
- Shabahang R, Samsampoor D, Zeinali H, Ebrahimi (2022) Evaluation of genetic and biochemical variation in six basil (*Ocimum basilicum* L.) populations. *Irani J Range Forest Plant Breed Gene Res* 30, 56-71 (In Persian).
- Shaghghi, J., kordenaeej, A, qaderi, A (2019) Evaluation of Genetic Diversity of *Papaver bractaetum* Lindl. Populations in Alborz Mountain Using SCoT Molecular Markers. *J Med Plants* 18 (72), 90-102 (In Persian).
- Shah-Ghobadi H, Shabanian N, Khadivi A, Rahmani MS (2018) Analysis of genetic diversity of *Pistacia atlantica* Desf. populations from Zagros forests using ISSR, IRAP and SCoT molecular markers. *I Irani J Range Forest Plant Breed Gene Res* 26, 177-195 (In Persian).
- Shannon CE (2001) A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE mobile comput communicat rev* 5, 3-55.
- Shirvani H, Amjadian M, noorian AM (2020) Genetic variation study of *Teucrium polium* genotypes in the west of Iran using SCoT molecular markers. *Cell Mole Res (Iran J Biol)* 33, 343-353 (In Persian).
- Singh S (2003) Cluster analysis for heterosis in wheat [*Triticum aestivum* (L.) em. Theil.]. *Indian J Gen Plant Breed* 63, 249-250.
- Soleimani V, Baum B, Johnson D (2002) AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn.]. *Theor Appl Gen* 104, 350-357.
- Stachel M, Lelley T, Grausgruber H, Vollmann J (2000) Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theor App Gene* 100, 242-248.
- Tessier C, David J, This P et al. (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet* 98, 171– 177.
- Timmappaiah W, Shobha G, Melwyn S (2009) Assessmant of genetic diversity in Cashew germplasm using and ISSR markers. *Sci Hortic* 120, 411-417.
- Tripathi L, Tripathi JN (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop J pharma res* 2, 243-253.
- Vasudevan R, Gale GAR, Schiavon AA, et al. (2019) CyanoGate: A modular cloning suite for engineering cyanobacteria based on the plant MoClo syntax. *Plant Physiol*, 01401.
- Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, et al. (2019) Benefits and Inputs from Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Front Microbiol* 11, 10–57.

- Virk P, Ford-Lloyd B, Jackson M et al. (1996) Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. In: Rice Genetics III: (In 2 Parts). World Sci, 307-316.
- Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Newbury HJ (1995) Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. Heredity 74, 170-179.
- Wang J, Zhang H, Wu M, Tang C (2011) Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usarii*. Biotechnol Lett 33, 1029–1038.
- Wang W, Yan-long J, Yi-chun L, et al. (2018) Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. Sci Report 7, 10416.
- Wei T, Simko V, Levy M et al. (2017) Package ‘corrplot’. Statistician 56, e24.
- Yeh FC (1999) POPGENE (version 1.3.1). Microsoft window-bases freeware for population genetic analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- Zabet M, Pishghadam S, Alizadeh Z (2022) Efficiency of RAPD and SCoT molecular markers in the differentiation of camelthorn (*Alhagi maurorum*) populations. Iran J Rang Fores Plant Breed Gene Res 30, 16-38 (In Persian).
- Zaccardelli M, Gnocchi S, Carelli M, Scotti C (2003) Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bio-agronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breed 122, 61-65.
- Zamani N, Zamani V, Mirzaei Kh (2016) Genetic diversity analysis of *Ziziphora tenuior* L. using SCoT markers. Iran J Rang Fores Plant Breed Gene Res 24(2), 177-189 (In Persian).
- Yadav P, Maharjan J, Korpole S, et al. (2018) Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase From *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. Bioeng Biotechnol 6, e65.