

Using regression to investigate the relationship between SCoT molecular markers and agronomic and physiological traits of basil under drought stress conditions

Atousa Keshavarzi 

M.Sc. Student, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: a2sa.kshvrzi1999@gmail.com

Mehdi Rahimi 

*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: mehdi83ra@yahoo.com

Amin Baghizadeh 

Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: amin_4156@yahoo.com

Abstract

Objective

Basil (*Ocimum basilicum*) is one of the most important medicinal as well as vegetables plants that are cultivated and consumed worldwide. One of the essential aspects of plant breeding programs is to study the correlation between DNA polymorphisms and phenotypic trait diversity. The purpose of this research is to investigate the genetic diversity of five basil cultivars under drought stress conditions using SCoT markers and traits, and also to analyze the relationship between traits and markers by stepwise regression.

Materials and methods

In this research, five basil genotypes were studied under drought stress in the form of a split plot based on a completely randomized design with three replications in pots and under greenhouse conditions. The main plot included drought stress in two levels (normal and drought stress) and the sub plot factor included genotype (5 levels) and their morphological and physiological traits were evaluated. Also, their genomic DNA was extracted from the leaves, and the genotypic diversity of the genotypes was investigated based on eight SCoT primers, and finally, the relationship between the traits and markers was determined by stepwise regression.

Results

Correlation of traits in two conditions showed that leaf yield had a positive and significant correlation with traits of plant height and total chlorophyll. The results showed that the traits of root length, chlorophyll a and total chlorophyll in dry conditions had the highest decrease of 65.04, 61.92 and 58.04%, while the traits of shoot dry weight (17.14%) and proline (1.51%) showed the highest percentage increase. Cluster analysis based on percentage reduction of traits placed the genotypes in three groups and the traits in three groups. Eight primers amplified a total of 101 polymorphic bands and ScoT1 produced the most bands with 17 polymorphic bands. Cluster analysis by UPGMA and dice similarity criterion based on SCoT data were placed five basil genotypes in three groups. The results of regression analysis showed that in normal and drought stress conditions, 15 and 12 markers (alleles) had a significant relationship with the studied traits, respectively.

Conclusions

Selection based on molecular markers provides a rapid method for breeding programs. The obtained genetic information of markers in this study showed their important role. Therefore, in addition to traits, it is possible to select superior genotypes and high value populations in breeding programs. The findings showed that certain markers are associated with multiple traits and emphasized the critical importance of this trait in plant breeding for simultaneous improvement of multiple traits. Insights from this study on markers have potential for application in basil breeding programs.

Keywords: Association analysis, Grouping, Molecular marker, Trait correlation.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Keshavarzi A, Rahimi M, Baghizadeh A (2024) Using regression to investigate the relationship between SCoT molecular markers and agronomic and physiological traits of basil under drought stress conditions. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 25-50.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 25-50.

DOI: 10.22103/jab.2024.22765.1541

Received: January 08, 2024.

Received in revised form: March 09, 2024.

Accepted: March 10, 2024.


Published online: May 31, 2024.

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




© the authors


استفاده از رگرسیون برای بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی SCoT با صفات زراعی و فیزیولوژیک ریحان تحت شرایط تنش خشکی

آنوسا کشاورزی 

دانشجوی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: a2sa.kshvrzi1999@gmail.com

مهدی رحیمی 

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

امین باقی‌زاده 

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: amin_4156@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

چکیده

هدف: ریحان (*Ocimum basilicum*) یکی از گیاهان دارویی و سبزی بسیار مهم است که در سطح جهان کشت و مصرف می‌شود. یکی از جنبه‌های ضروری برنامه‌های اصلاح نباتات مطالعه همبستگی بین چندشکلی DNA و تنوع صفات فنوتیپی است. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی پنج رقم ریحان در شرایط تنش خشکی با استفاده از نشانگر SCoT و صفات و همچنین انجام تجزیه و تحلیل ارتباط بین صفات و نشانگرها با رگرسیون گام به گام است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، پنج ژنوتیپ ریحان تحت شرایط تنش خشکی به صورت طرح اسپیلت پلات بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلدان و در شرایط گلخانه‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند. فاکتور اصلی شامل تنش خشکی در دو سطح (نرمال و تنش خشکی) و عامل فرعی شامل ژنوتیپ (۵ سطح) بود و صفات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک آن‌ها ارزیابی گردیدند. همچنین

DNA ژنومی آن‌ها از برگ استخراج گردید و تنوع ژنوتیپی ژنوتیپ‌ها بر اساس هشت آغازگر SCOT بررسی شد و در نهایت ارتباط بین صفات و نشانگرها با رگرسیون گام به گام مشخص گردید.

نتایج: همبستگی صفات در دو شرایط نشان داد که عملکرد برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری با صفات ارتفاع بوته و کلروفیل کل داشت. نتایج نشان داد که صفات طول ریشه، کلروفیل a و کلروفیل کل در شرایط خشکی به میزان ۶۵/۰۴، ۶۱/۹۲ و ۵۸/۰۴ درصد بیشترین کاهش صفات را داشتند در حالی که صفات وزن خشک اندام هوایی (۱۷/۱۴٪) و پرولین (۱/۵۱٪) بیشترین درصد افزایش را نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای براساس درصد کاهش صفات، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه و صفات را نیز در سه گروه قرار داد. هشت آغازگر در مجموع تعداد ۱۰۱ نوار چندشکل تکثیر کردند و ScoT1 با ۱۷ نوار چندشکل، بیشترین نوار رو تولید کرد. تجزیه خوشه‌ای به روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی و معیار شباهت دایس بر اساس داده‌های SCOT، پنج ژنوتیپ ریحان را در سه گروه قرار دادند. نتایج تجزیه رگرسیون نشان داد که به ترتیب در شرایط نرمال و تنش خشکی، ۱۵ و ۱۲ نشانگر (آل) با صفات مورد مطالعه رابطه معنی‌داری پیدا کردند.

نتیجه‌گیری: انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی روشی سریع برای برنامه‌های اصلاحی ارائه می‌دهد. اطلاعات ژنتیکی به دست آمده نشانگرها در این مطالعه نقش مهم آنها را نشان داد. بنابراین در کنار صفات، انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و جمعیت‌های با ارزش بالا در برنامه‌های اصلاحی امکان‌پذیر است. یافته‌ها نشان داد که نشانگرهای خاصی با صفات متعدد مرتبط هستند و بر اهمیت حیاتی این ویژگی در اصلاح گیاهان برای بهبود همزمان صفات متعدد تأکید کرد. بینش این مطالعه در مورد نشانگرها دارای پتانسیل برای کاربرد در برنامه‌های به‌نژادی ریحان است.

کلیدواژه‌ها: تجزیه ارتباط، گروه‌بندی، نشانگر مولکولی، همبستگی صفات.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کشاورزی آنوسا، رحیمی مهدی، باقی‌زاده امین (۱۴۰۳) استفاده از رگرسیون برای بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی SCOT با صفات زراعی و فیزیولوژیک ریحان تحت شرایط تنش خشکی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۲)، ۲۵-۵۰.

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



© the authors

مقدمه

از مهمترین اهداف توسعه کشورها، تأمین امنیت غذایی است که نیازمند مطالعات و بررسی‌های زیربنایی در بخش کشاورزی است. عوامل اصلی کاهش دهنده‌ی تولید محصولات زراعی و همچنین موانع اصلی رسیدن به پتانسیل عملکرد بالا در محصولات

گیاهان مختلف همواره تنش‌های مختلف محیطی (تنش‌های زنده و یا غیرزنده) بوده‌اند. لذا توجه به واریته‌های متحمل‌زرعی از دیدگاه به‌نژادی همواره مورد توجه بوده است (Pawlak & Kołodziejczak 2020). ریحان (*Ocimum basilicum*) گیاهی علفی است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا و مرکز آمریکای جنوبی به صورت یک‌ساله رشد کرده و جز خانواده‌ی نعناع (Lamiaceae) بوده و بین ۵۰ تا ۱۵۰ گونه و زیرگونه متفاوت دارد (Javanmardi et al. 2002; Labra et al. 2004). ریحان (*Ocimum basilicum*) گیاهی علفی یک‌ساله از خانواده‌ی نعناع (Lamiaceae) است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا و مرکز آمریکای جنوبی رشد می‌کند. این گیاه بین ۵۰ تا ۱۵۰ گونه و زیرگونه متفاوت دارد (Javanmardi et al. 2002; Labra et al. 2004). اسانس ریحان خواص ضد قارچی و ضد باکتری دارد و حشرات را دور می‌کند و این اسانس در صنایع مختلفی مانند بهداشت دهان و دندان، غذایی و عطرسازی استفاده می‌شود (Khalid 2006). عملکرد دارویی ریحان نیز بخاطر از بین بردن تب، مقابله با مالاریا، کاهش درد و افسردگی است (Lee et al. 2005). اصلاح‌نیاتات بر تنوع و انتخاب تکیه دارد و تنوع ژنتیکی نقش مهمی در دیده شدن فعالیت‌های اصلاحی و انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای برنامه‌های اصلاحی ایفا می‌کند (Louwaars 2018). اساس تنوع در هر گونه گیاهی در ذخایر ژنتیکی آن نهفته است، به ویژه اکوتیپ‌ها و جمعیت‌های وحشی، که به عنوان اجزای ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی عمل می‌کنند. تنوع این فرآیند مستلزم بررسی دقیق تنوع ژنتیکی در ژرمپلاسم است (Begna 2021). آگاهی از میزان تنوع و روابط بین صفات، از جمله همبستگی آنها با صفات مهم و اقتصادی مهم مانند عملکرد، مینایی را برای شناسایی و انتخاب موثر و دقیق گیاهان مادری تشکیل می‌دهد و برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان برای توسعه حیاتی است (Reynolds et al. 2020). برنامه‌های موثر اصلاحی و حفظ ذخایر ژنتیکی برای دستیابی به افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات گیاهی و همچنین استفاده بهینه از منابع ژنتیکی، جمع‌آوری، ذخیره‌سازی، توصیف و ارزیابی مواد ژنتیکی ضروری است (Pathirana & Carimi 2022). ارزیابی تنوع در درجه اول بر اساس ارزیابی‌های مورفولوژیکی شامل صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، زراعی و بیوشیمیایی بود. این ارزیابی‌های مورفولوژیکی به دلیل سادگی و مناسب بودن برای اهداف تحقیقاتی خاص و سطوح مورد نظر به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حالی که تنوع مورفولوژیکی می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی به میزان بیشتری در مقایسه با تنوع مولکولی قرار گیرد، اما همچنان یک ابزار ارزشمند در بین گونه‌های مختلف گیاهی است. شناسایی تنوع مورفولوژیکی نه تنها به مدیریت ژرمپلاسم‌های گیاهی کمک می‌کند، بلکه بیش‌های ارزشمندی را در اختیار محققان در زمینه اصلاح‌نیاتات قرار می‌دهد (Bhandari et al. 2017; Khadka et al. 2020). در سال‌های اخیر، افزایش قابل توجهی در استفاده از ابزارهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی، مکان‌یابی QTL، و اجرای برنامه‌های حفاظتی در گیاهان و سایر موجودات وجود داشته است. اطلاعات به دست آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی به عنوان یک پارامتر ارزشمند برای مطالعه جمعیت‌های متنوع و درک تمایزات ژنتیکی بین آنها عمل می‌کند (Henry 2012; Kordrostami & Rahimi 2015). از جمله موثرترین نشانگرها برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و شناسایی تغییرات آلی در جایگاه‌های خاص، نشانگرهای مولکولی Start codon targeted (SCoT) است. نشانگر SCoT یک سیستم نشانگر مبتنی بر

DNA است که شبیه به RAPD و ISSR بوده و بر اساس مناطق حفاظت شده اطراف کدون شروع (ATG) در ژن های گیاهی عمل می کند. این تکنیک دارای مزایای شاخص های RAPD و ISSR می باشد و همچنین روشی ساده و سریع، اقتصادی و با قابلیت تکرار بالا می باشد. این نشانگر، مانند RAPD و ISSR، ماهیت غالبی دارد و برای مطالعه تنوع ژنتیکی، نقشه ژنتیکی، تجزیه و تحلیل و جداسازی ژن ها و مکان یابی QTL استفاده می شود (Luo et al. 2010; Luo et al. 2009; Collard & Mackill 2011). توالی آغازگر این نشانگر طولانی تر از RAPD است و این نشانگر را می توان در بین نشانگرهای مولکولی مهم قرار داد (Sawant et al. 1999). در پژوهشی Gonda et al. (2020) تنوع ژنتیکی ۱۷ ژنوتیپ *Ocimum* از ۵ گونه مختلف *O. basilicum*، *O. americanum*، *O. sanctum*، *O. gratissimum* و *O. Polystachyon* را با استفاده از نشانگرهای DNA چندشکلی تقویت شده تصادفی و تکرارهای توالی ساده مورد بررسی قرار دادند. با نشانگرهای ISSR، ۲۳۸ جایگاه تولید شد که ۲۳۴ جایگاه آنها چندشکلی بودند. مقدار PIC از ۰/۸۹۲ تا ۰/۹۴۳ با میانگین ۰/۹۲۳ متغیر بود. میانگین ضریب شباهت جاکارد بر اساس RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۵۲ بود. الگوی خوشه بندی دندروگرام تولید شده با استفاده از داده های تلفیقی RAPD و ISSR، همه ژنوتیپ های *Ocimum* را در دو سطح برش (۰/۴۹ و ۰/۴۲) در خوشه های متعلق به گونه های خود قرار دادند. آل های منحصر به فرد گونه خاص با نشانگرهای RAPD و ISSR تکثیر و شناسایی شدند که بیشترین آنها در *O. sanctum* بودند. در تحقیق Stankovic et al. (2019) تنوع ژنتیکی ۲۸ توده ریحان از شش گونه *Ocimum* و شش گونه *O. basilicum* را با استفاده از نشانگرهای مولکولی، محتوای DNA هسته ای و شمارش کروموزوم مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که جنس *Ocimum* به دو شاخه جدا شد که در یکی از آنها *O. minimum* با *O. basilicum* و در دیگری *O. africanum americanum*، *O. basilicum* var. *purpurascens* قرار داشتند. *O. tenuiflorum* بیشترین فاصله ژنتیکی، کمترین اندازه ژنوم و کمترین تعداد کروموزوم را داشت. در مطالعه دیگری بر روی ۲۵ اکوتیپ بومی ریحان تنوع ژنتیکی با استفاده از ۱۱ آغازگر SCoT بررسی شد که سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی را در بین اکوتیپ های بومی با طیف وسیعی از تنوع چندشکلی نشان داد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک دو کلاس مجزا را شناسایی کرد که بینش های ارزشمندی را در مورد تنوع ژنتیکی و روابط بین نژادهای مختلف ارائه داد (Abuhashem et al. 2023). تنوع ژنتیکی با نشانگر SCoT در گیاهان دیگر نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Pandey et al. 2023; Rahimi & Ranjbaran 2023; Sheller et al. 2023). یکی از جنبه های ضروری برنامه های اصلاح نباتات شامل مطالعه همبستگی بین چندشکلی DNA و تنوع صفات فنوتیپی است. این تحقیق کاربردهای متعددی از جمله بررسی روابط فیلوژنتیکی بین ژنوتیپ ها و جمعیت های ناشناخته، شناسایی آل های صفت مطلوب در مجموعه های ژرم پلاس، شناسایی محل دقیق جایگاه صفات کمی، و تایید ژن های کاندید مرتبط با صفات کمی دارد. شناسایی نواحی ژنومی صفات کمی متکی بر عدم تعادل پیوندی است و از طریق دو رویکرد اصلی تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباط به دست می آید. تجزیه و تحلیل ارتباط نشانگر - صفت به طور گسترده در گونه های مختلف گیاهی، از جمله گیاهان دارویی به کار گرفته

شده است. با این حال، مطالعات محدودی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی در سطوح فنوتیپی و مولکولی در شرایط تنش خشکی، و همچنین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و فنوتیپها در ریحان انجام شده است (Gebhardt et al. 2004). تنوع ژنتیکی در گیاه ریحان با نشانگرهای مختلف در مطالعات مختلفی بررسی شده است (De Masi et al. 2006; Aghaei et al. 2012; Giachino et al. 2014). تجزیه و تحلیل ارتباط نشانگر-صفت به طور گسترده در گونه های مختلف گیاهی (AbdoliNasab & Rahimi 2020)، از جمله گیاهان دارویی استفاده شده است (Azizi et al. 2016; Rahimi et al. 2018; Rahimi et al. 2019; Rahimi 2021). این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی پنج رقم ریحان در شرایط تنش خشکی با استفاده از نشانگر SCoT و صفات و همچنین انجام تجزیه و تحلیل ارتباط بین صفات و نشانگرها با رگرسیون انجام شده است. بدون شک، یافته های این مطالعه، بینش های ارزشمندی را برای تحقیقات بیشتر و برنامه های اصلاحی متمرکز بر این گیاه دارویی و سبزی ارائه می دهد. با مطالعه تنوع ژنتیکی ریحان در شرایط نرمال و تنش، می توان ژنوتیپ های مختلف را با صفات متمایز شناسایی و مشخص کرد و پتانسیل آنها را برای اهداف مختلف، انتخاب و اصلاح کرد. این دانش می تواند توسعه واریته های بهبودیافته با کیفیت های دارویی و تغذیه ای بهتر و همچنین سازگاری بهتر با محیط های مختلف را تسهیل کند.

مواد و روش ها

در این آزمایش پنج ژنوتیپ ریحان (جدول ۱) از فروشگاه اینترنتی پوپینک تهیه گرد و به صورت طرح اسپیلت پلات بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلدان و در شرایط گلخانه ای مورد مطالعه قرار گرفتند. فاکتور اصلی شامل تنش خشکی در دو سطح (نرمال و تنش خشکی) و عامل فرعی شامل ژنوتیپ (۵ سطح) بود و 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 انجام شد. آبیاری روزانه تا دو هفته بعد از کشت ادامه یافت. بذرها پس از پنج روز شروع به جوانه زنی کردند و دور آبیاری برای شرایط نرمال هر ۲ روز و شرایط تنش خشکی هر ۴ روز یکبار آبیاری اعمال شد.

جدول ۱. نام ژنوتیپ های ریحان مورد مطالعه

Table 1. List of studied genotypes of Basil

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

پس از تنش و رشد کامل گیاه، پنج بوته تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب شدند و صفات مورفولوژیکی آنها شامل ارتفاع بوته (سانتی متر)، طول ریشه (سانتی متر)، طول برگ (سانتی متر)، عرض برگ (سانتی متر)، تعداد برگ، وزن برگ تر یا عملکرد برگ

(گرم)، وزن خشک برگ، وزن تر اندام هوایی (گرم) و وزن خشک اندام هوایی (گرم) گیاه اندازه‌گیری شدند و میانگین آنها به عنوان داده‌ی هر تیمار ثبت شد. همچنین پس از اعمال تنش در مرحله رویشی، برگ‌هایی از هر واحد آزمایشی برای سنجش صفات بیوشیمیایی برداشت و فوراً در ازل مایع منجمد و تا زمان سنجش صفات بیوشیمیایی در فریزر ۲۰- نگهداری شدند تا برای ارزیابی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مورد استفاده قرار گیرند. این صفات شامل میزان رنگدانه‌ها کلروفیل، کاروتنوئید و میزان پرولین بودند. برای اندازه‌گیری رنگدانه‌ها از روش لیختن تالر (Lichtenthaler 1987) استفاده شد. ابتدا ۰/۲ گرم از برگ تازه با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به خوبی سائیده شده تا بافت برگ به خوبی با استن مخلوط گردد. پس از صاف کردن و سانتریفیوژ مخلوط حاصل، جذب محلول بدست آمده بلافاصله با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر بدست آمد و غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از روابط زیر و برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه شدند:

$$\text{Chl}_a (\text{mg/gfw}) = (12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}) \quad \text{رابطه ۱)}$$

$$\text{Chl}_b (\text{mg/gfw}) = (21.21 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}) \quad \text{رابطه ۲)}$$

$$\text{Tchl} (\text{mg/gfw}) = (\text{Chl}_a + \text{Chl}_b) \quad \text{رابطه ۳)}$$

$$\text{Total carotenoids} \left(\frac{\text{mg}}{\text{gfw}} \right) = [1000A_{470} - 1.8\text{Chl}_a - 85.02 \text{Chl}_b] / 198 \quad \text{رابطه ۴)}$$

میزان پرولین برگ با روش بیتس سنجیده شد (Bates et al. 1973). ابتدا ۰/۲ گرم برگ فریز شده با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ در هاون چینی سائیده شد. سپس عصاره حاصل ۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. از مایع رویی به میزان ۲ میلی‌لیتر برداشته و با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید در یک لوله آزمایش ترکیب گردید. ترکیب حاصل یک ساعت در بنماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس در یخ قرار گرفت. بعد از آن ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول قبلی اضافه و تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله‌ی آزمایش، دو فاز قرمز و سفید در لوله ایجاد گردید. جذب فاز قرمز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر خوانده شد و مقدار پرولین با منحنی استاندارد به میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

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 اسپکتروفوتومتری تعیین شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از هشت آغازگر SCoT که در مطالعات محققین (Collard & Mackill 2009; Rahimi et al. 2018; Rahimi & Ranjbaran 2023) دیگر تعداد باند و تنوع خوبی نشان داده بودند، استفاده شد (جدول ۲).

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 نوارها، از دستگاه ژل داگ (Bio-Rad) استفاده شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگر SCoT مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Specifications of SCoT primer used in this study

ردیف Row	آغازگر 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'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	57	72
9	SCoT37	5'-CAATGGCTACCACTAGCC-3'	50	56
10	SCoT48	5'-ACAATGGCTACCACTGGC-3'	50	56

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای داده‌های فنوتیپی ریحان، محاسبه درصد تغییرات صفات در شرایط نرمال نسبت به شرایط تنش برای هر ژنوتیپ و کل ژنوتیپ‌ها محاسبه گردید. همچنین همبستگی‌ها بین صفات جداگانه در هر دو شرایط انجام شد. برای شناسایی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مشابه از درصد تغییرات صفات در تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. 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 به‌دست آمده برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و همچنین برآورد شاخص‌ها مورد استفاده قرار گرفت. محتوای اطلاعات چندشکل (Polymorphism Information Content) (Botstein et al. 1980)، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (Expected heterozygosity) (Liu 1998)، شاخص نشانگری (Marker Index)، نسبت چندگانه موثر (Effective Multiplex Ratio) و میانگین هتروزایگوسیتی (Mean heterozygosity) (Powell et al. 1996) و قدرت تشخیص نشانگر (Tessier et al. 1999) با استفاده از برنامه نوشته شده توسط نویسندگان در اکسل محاسبه شدند. تعداد آلل موثر، شاخص شانون (Shannon 2001) و تنوع ژنی نی (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. تجزیه خوشه‌ای، تجزیه تابع تشخیص، تعیین رابطه بین داده‌های مولکولی نشانگرهای ScoT و صفات مورد مطالعه از طریق رگرسیون گام به گام در هر دو شرایط با نرم افزار PAST (Hammer et al. 2001) انجام شد. همچنین همبستگی فنوتیپی با پکیج corrplot و با نرم افزار R انجام گردید (Wei et al. 2017).

نتایج و بحث

فنوتیپی: نتایج درصد تغییرات صفات در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال به صورت کلی و همچنین برای هر ژنوتیپ در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که صفات طول ریشه، کلروفیل a و کلروفیل کل در شرایط خشکی به میزان ۶۵/۰۴ و ۶۱/۹۲ و ۵۸/۰۴ درصد بیشترین کاهش صفات را داشتند درحالی که صفات وزن خشک اندام هوایی (۱۷/۱۴٪) و پرولین (۱/۵۱٪) بیشترین درصد افزایش را نشان دادند. همچنین جدول ۳ نشان داد که درصد تغییرات صفات در ژنوتیپ‌ها متفاوت بود و بعضی ژنوتیپ‌ها برای یک صفت در شرایط تنش کاهش نشان دادند در حالی که بعضی ژنوتیپ‌های دیگر افزایش نشان دادند. از آنجایی که افزایش صفاتی مثل پرولین، طول ریشه، عملکرد برگ تر و صفات مرتبط با آن در شرایط تنش می‌تواند مرتبط با تحمل به تنش آن ژنوتیپ باشد. بنابراین ژنوتیپ‌های ابلق و سیاه با توجه به اینکه برای این صفات در شرایط تنش افزایش نشان دادند یا کمترین کاهش را داشتند به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل در نظر گرفته شدند (جدول ۳). این مطالعه نشان داد که تنش رطوبتی باعث کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان می‌شود. احتمالاً این کاهش ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن است که سبب اکسیداسیون و تجزیه کلروفیل می‌شوند (Wang et al. 2018). با توجه به اینکه صفت تعداد برگ به میزان ۱۸/۰۸ درصد کمترین کاهش را داشت، به نظر می‌رسد این صفت بر خلاف کلروفیل‌ها کمتر تحت تأثیر تنش رطوبتی قرار گرفته است. پرولین در شرایط تنش متوسط رطوبتی نسبت به شرایط بدون تنش افزایش یافت. اگرچه این میزان، افزایش چشمگیری را نشان نمی‌دهد اما تولید آن یکی از راه‌های تنظیمی گیاه برای حفظ پتانسیل آب و تعادل اسمزی است (Kafi & Mahdavi Damghani 2003). پرولین یک ماده آلی است که در گیاهان در شرایط تنش رطوبتی، بیشتر تولید می‌شود. این ماده دارای قسمت‌های آب دوست و آب گریز است و می‌تواند با پروتئین‌های مختلف تعامل داشته و از تغییر شکل آلبومین جلوگیری کند. این ویژگی پرولین به این دلیل است که پرولین

با قسمت‌های آب‌گریز پروتئین‌ها در ارتباط است و با افزایش قسمت‌های آب‌دوست پروتئین‌ها، ثبات آنها را بالا می‌برد و از تغییر ماهیت آنها جلوگیری می‌کند.

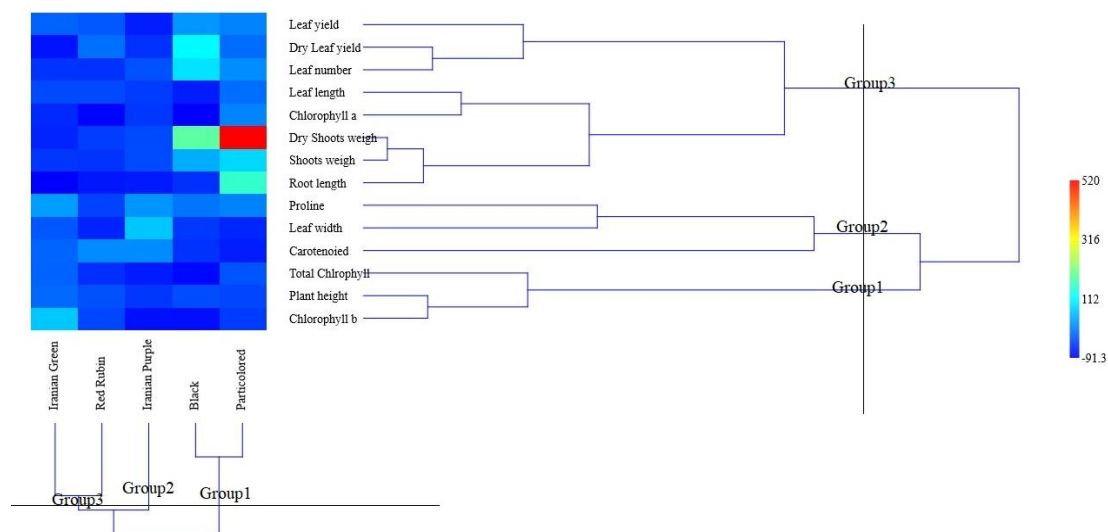
جدول ۳. درصد تغییرات صفات (کل) در حالت تنش نسبت به نرمال و همچنین درصد تغییرات در هر ژنوتیپ ریحان

Table 3. The percentage of changes in basil traits (Total) under drought stress compared to normal as well as the percentage of changes in each genotype

صفات Traits	درصد تغییرات در ژنوتیپ‌ها Change in genotypes (%)					درصد تغییرات کل Total Change (%)
	بنفش ایرانی Iranian Purple	سیاه Black	ابلق Particolored	سبز ایرانی Iranian Green	قرمز آتشین Red Rubin	
ارتفاع بوته Plant height	-46.73	-29.33	-35.39	-7.04	-25.81	-29.32
طول برگ Leaf length	-43.18	-68.55	-3.47	-32.92	-32.77	-37.42
عرض برگ Leaf width	67.44	-46.41	-61.26	-22.34	-62.08	-36.69
تعداد برگ Leaf number	-25.93	90.91	22.22	-50.00	-52.00	-18.18
طول ریشه Root length	-71.09	-53.58	152.97	-90.67	-73.49	-65.04
وزن اندام هوایی Shoots weigh	-31.91	46.69	82.19	-47.96	-50.28	-26.07
وزن خشک اندام هوایی Dry Shoots weigh	-32.73	186.18	519.78	-63.03	-42.04	17.14
عملکرد برگ Leaf yield	-67.91	30.41	13.51	-12.96	-19.66	-32.76
عملکرد برگ خشک Dry Leaf yield	-52.13	109.58	-4.04	-75.72	-1.48	-31.74
کلروفیل a Chlorophyll a	-47.03	-91.26	14.72	-59.09	-87.72	-61.92
کلروفیل b Chlorophyll b	-78.14	-80.26	-43.54	68.74	-35.33	-55.67
کلروفیل کل Total Chlrophyll	-69.53	-85.53	-24.27	-12.88	-53.58	-58.04
کاروتنوئید Carotenoied	19.85	-51.44	-68.68	-11.47	20.30	-36.53
پرولین Proline	27.82	3.21	13.66	35.01	-38.62	1.51

همچنین تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (UPGMA) براساس درصد تغییرات صفات نشان داد که ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند (شکل ۱) 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 ۳ و ژنوتیپ بنفش ایرانی هم در گروه ۲ قرار گرفتند. ژنوتیپ بنفش ایرانی بیشترین کاهش صفات و کمترین افزایش صفات را نسبت به شرایط نرمال داشت و به عنوان ژنوتیپ حساس در نظر گرفته شد. ژنوتیپ‌های گروه سوم (قرمز آتشین و سبز ایرانی) که از نظر کاهش یا افزایش صفات نسبت به شرایط نرمال در حد بینابین بودند به عنوان ژنوتیپ‌های نیمه متحمل در نظر گرفته شدند. همچنین تجزیه خوشه‌ای صفات را در سه گروه قرار داد. صفات

ارتفاع بوته، کلروفیل b و کل در گروه اول، پرولین، عرض برگ و کاروتنوئید در گروه دوم و بقیه صفات در گروه سوم قرار گرفتند (شکل ۱).

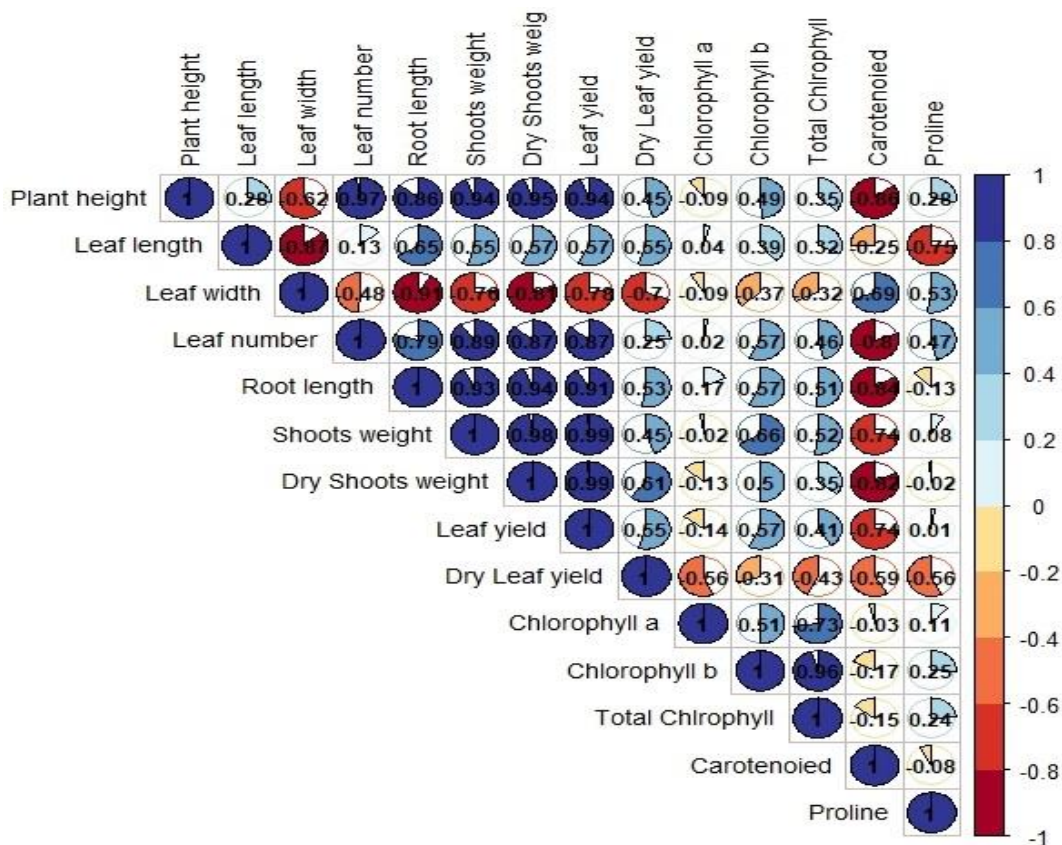


شکل ۱. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای براساس درصد تغییرات صفات در ژنوتیپ‌های ریحان با روش UPGMA

Figure 1. Dendrogram of cluster analysis based on the percentage of trait changes in basil genotypes by UPGMA method

ضریب همبستگی ساده بین صفت مورد بررسی در ژنوتیپ‌های ریحان برای شرایط نرمال و تنش به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. در شرایط نرمال بیشترین همبستگی ساده بین صفات به ترتیب مربوط به صفت عملکرد برگ تر با وزن خشک اندام هوایی (۰/۹۹۲)، تعداد برگ با ارتفاع بوته (۰/۹۷۵) کلروفیل b با کلروفیل کل (۰/۹۵۸) و عرض برگ با طول ریشه (-۰/۹۰۸) به دست آمد. دلیل آن این است که ریشه‌ها از طریق جذب مواد غذایی از خاک، غذا را به سایر بخش‌های گیاه منتقل می‌کنند. عرض برگ نیز برای فتوسنتز و تبادل گازی مهم است. در شرایط نرمال، گیاهان نیازمند تعادل مناسب بین جذب مواد غذایی و عملکرد فتوسنتز هستند. در نتیجه، همبستگی منفی بین عرض برگ و طول ریشه نشان می‌دهد که در صورت افزایش طول ریشه، عرض برگ کاهش می‌یابد و برعکس. کم‌ترین همبستگی هم به ترتیب کلروفیل a با تعداد برگ (۰/۰۲۱)، کلروفیل a با وزن تر اندام هوایی (-۰/۰۲۱) و کلروفیل a با طول برگ (۰/۰۴۱) مشاهده گردید (شکل ۱). همبستگی عملکرد برگ با همه صفات بجز عرض برگ، کلروفیل a و کاروتنوئید مثبت بود. و با همه صفات بجز پرولین و کلروفیل a همبستگی متوسط به بالایی داشت. بنابراین با افزایش این صفات می‌توان در افزایش عملکرد برگ گام موثری در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه برداشت. شکل ۳ همبستگی صفات را در شرایط تنش خشکی نشان داده است. نتایج نشان داد که عملکرد برگ در این شرایط به ترتیب با صفات ارتفاع بوته (۰/۸۹۱)، کلروفیل a (۰/۸۱۹)، کلروفیل کل (۰/۶۹۸) و کاروتنوئید (۰/۶۳۶) بیشترین همبستگی مثبت و معنی‌دار را داشت. همچنین

همبستگی این صفت با صفات وزن خشک اندام هوایی (-۰/۴۹۶)، وزن برگ خشک (-۰/۳۳۳) و تعداد برگ (-۰/۲۷۱) همبستگی منفی و غیرمعنی داری بود. دلیل اینکه همبستگی صفت عملکرد برگ با وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش خشکی منفی است، این است که وقتی گیاهان با تنش خشکی مواجه می‌شوند، آب در ساقه‌ها، شاخه‌ها و همچنین سایر اندام هوایی کاهش می‌یابد. این تنش خشکی می‌تواند تغییراتی در عملکرد وزن اندام هوایی ایجاد کند. همچنین، تنش خشکی می‌تواند باعث کاهش فعالیت فیزیولوژیکی در گیاه شود که می‌تواند به کاهش وزن اندام هوایی منجر شود. بین صفات دیگر هم همبستگی‌های مثبت و یا منفی‌ای مشاهده شد.

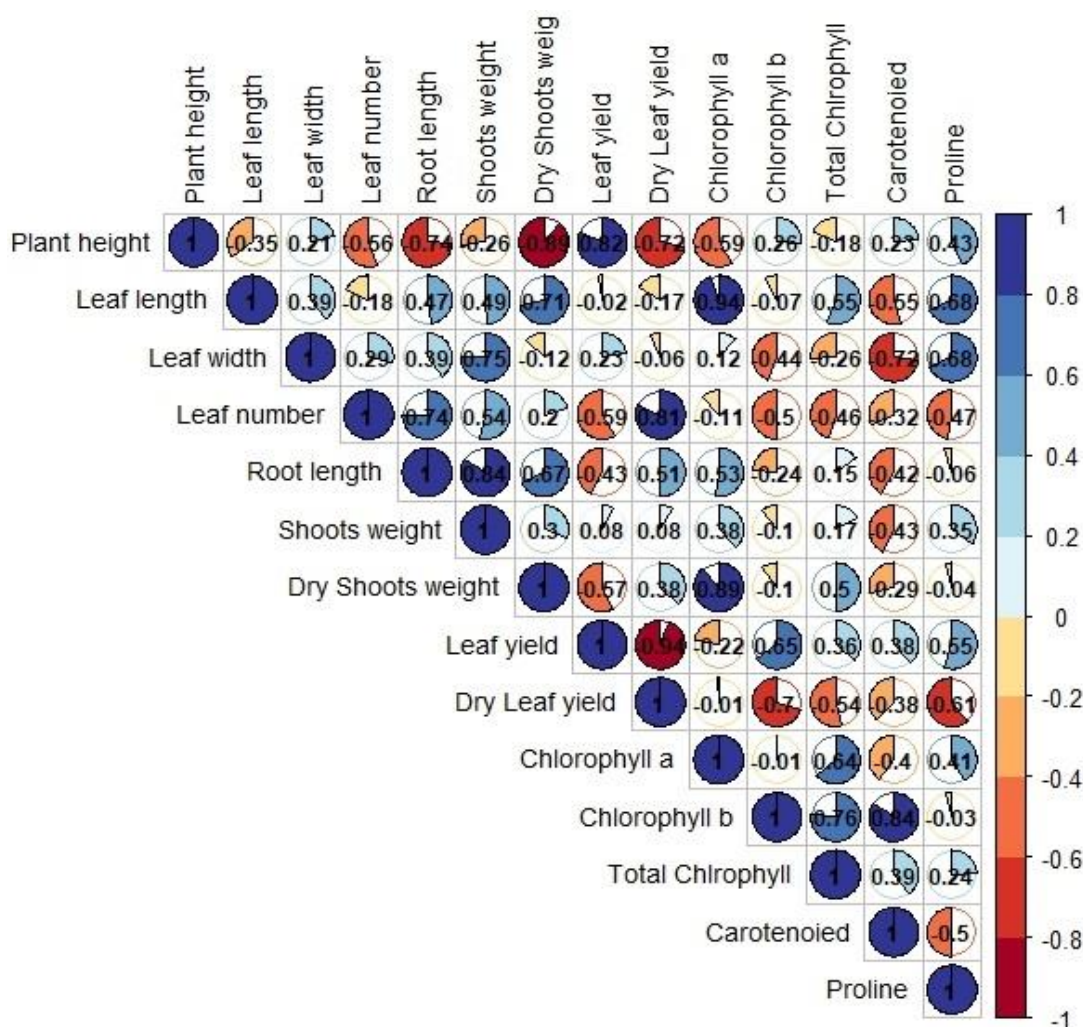


شکل ۲- نمودار همبستگی صفات مورد مطالعه در ریحان در شرایط نرمال

Figure 2. The correlation diagram of studied traits in basil under normal condition

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). آغازگر ScoT1 با ۱۷ باند و به دنبال آن آغازگر ScoT21 بیشترین تعداد باند را نشان دادند (شکل ۴)، 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 آغازگرهای مختلف، با میانگین درصد پلی‌مورفیسم ۹۶/۵۲٪ متغیر بود (جدول ۴). محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از

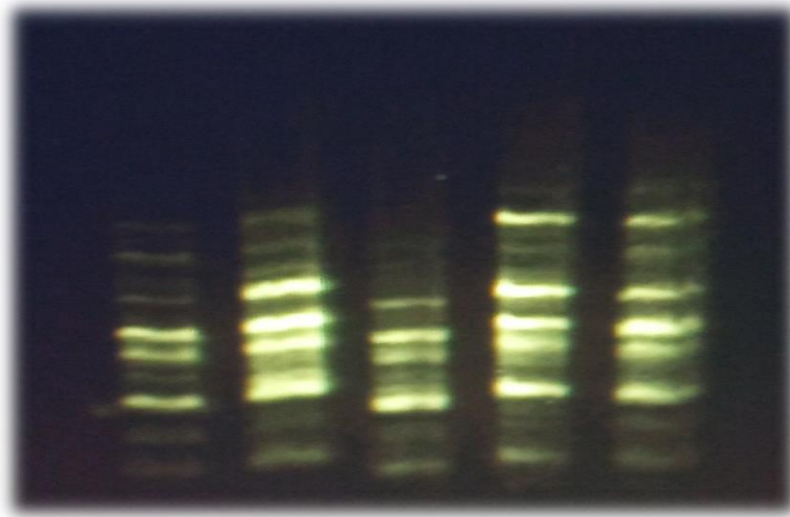
۰/۳۵ تا ۰/۴۰، با میانگین ۰/۳۸ (جدول ۴) متغیر بود. هتروزایگوسیتی مورد انتظار (EH) برای نشانگرهای SCoT از ۰/۳۸ تا ۰/۴۵ با میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۲ بود (جدول ۴). شاخص نشانگر (MI) در بین نشانگرهای SCoT متفاوت بود، آغازگر SCoT11 بالاترین MI (۰/۳۸) و آغازگر SCoT16 کمترین (۰/۲۰) را نشان داد (جدول ۴). میانگین هتروزایگوسیتی (Havp) از ۰/۰۳ تا ۰/۰۷ برای نشانگرهای مورد مطالعه متغیر بود. آغازگرهای SCoT28 و به دنبال آن SCoT10 بالاترین میانگین هتروزایگوسیتی را داشتند که نشان دهنده کارایی بالای آنها در تشخیص پلی مورفسم است (جدول ۴). ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ارقام و جمعیت ها اغلب شامل ارزیابی شاخص تنوع ژنتیکی است. شاخص تنوع ژنی نی در بین آغازگرهای مورد مطالعه با میانگین ۰/۴۲۶ در جمعیت مورد مطالعه قرار داشت (جدول ۴). آغازگرهای SCoT1 و SCoT10 به ترتیب بیشترین تنوع ژنتیکی نی را نشان دادند. میانگین ضریب شانون برای نشانگرهای SCoT برابر با ۰/۶۱۴ بود که نشان دهنده سطح متوسط تنوع در جمعیت های مورد بررسی است.



شکل ۳- نمودار همبستگی صفات مورد مطالعه در ریحان در شرایط تنش متوسط خشکی

Figure 3. The correlation diagram of studied traits in basil under drought condition

مولکولی: آغازگرهای 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 آل‌های موثر بین ۱/۶۵۲ تا ۱/۸۴۳ با میانگین ۱/۷۶۹ در جمعیت مورد مطالعه متغیر بود (جدول ۴).



شکل ۴. چند شکلی نشانگر SCoT برای پنج ژنوتیپ ریحان با استفاده از آغازگر SCoT21

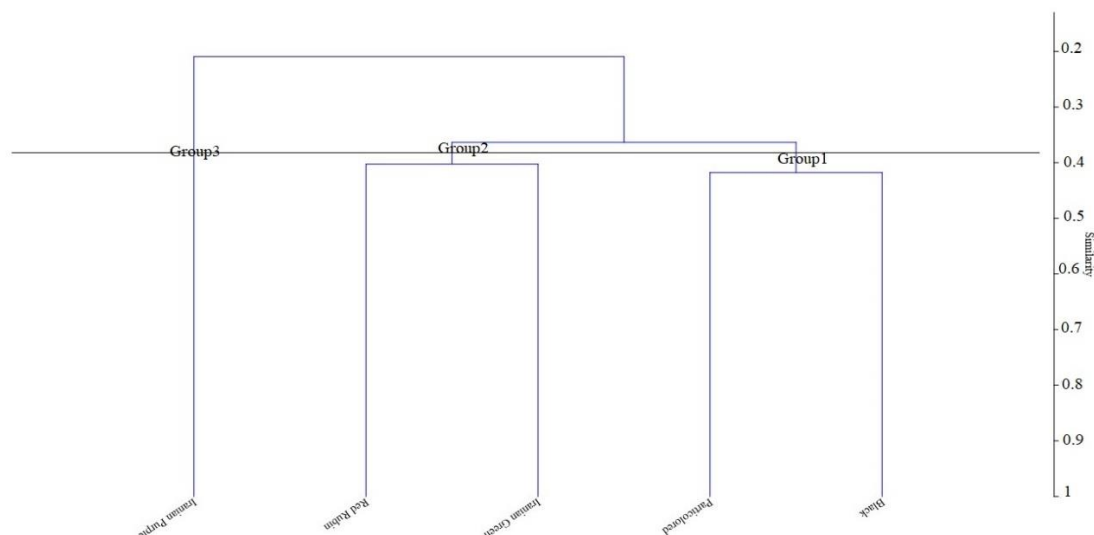
Figure 4. SCoT marker profiles for 25 basil genotypes using SCoT21

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	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphism Information Content	تعداد نوار چند شکلی Polymorphism band	تعداد کل نوار Total band	درصد چندشکلی Polymorphism percentage	نام آغازگرها Primers	
-2.800	0.452	17	17	100	SCoT1	
-1.600	0.448	10	10	100	SCoT10	
-3.500	0.387	12	13	92.31	SCoT11	
-3.000	0.384	15	15	100	SCoT12	
0.100	0.413	12	14	85.71	SCoT16	
-2.000	0.440	16	17	94.12	SCoT21	
-0.700	0.420	8	8	100	SCoT28	
-2.800	0.436	11	11	100	SCoT35	
-2.038	0.423	12.63	13.13	96.52	میانگین	
تنوع ژنی نی Nei diversity	شاخص شانون Shanon index	تعداد آل موثر Effective allele	میانگین هتروزیگوسیتی Mean heterozygosity	نسبت چندگانه موثر Effective Multiplex Ratio	شاخص نشانگری Marker Index	نام آغازگرها Primers
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	میانگین

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 ۵ 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. 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 بالایی آنها است. از سوی دیگر، ژنوتیپ‌های سیاه و بنفش ایرانی (۰/۲۷) کمترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند. تایج 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.



شکل ۵. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های ریحان با روش UPGMA براساس نشانگرهای SCoT

Figure 5. Dendrogram obtained from cluster analysis of basil genotypes with UPGMA method based on SCoT markers

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. 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 مثبت یا منفی‌ای 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 ۷۸٪ تا ۱۰۰٪ برای صفات مورد مطالعه متغیر بود. مثلاً، نشانگر SCoT12-13 با صفت تعداد برگ همبستگی داشت و ۹۴/۵ 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 SCoT21-3 و SCoT12-2 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). در مجموع ۱۲ نشانگر (آلل) با صفات مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی 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 تنش به هشت نشانگر کاهش پیدا کرد که به طور مؤثری تغییرات فنوتیپی این صفات را توضیح دادند. تعداد نشانگرهای شناسایی شده در شرایط تنش خشکی برای صفات عرض برگ، تعداد برگ، وزن اندام هوایی، کلروفیل a، کارتنوئید 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 خشکی 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 (R^2) توجیه شده توسط هر نشانگر برای صفات مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی 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 خشکی داشت (جدول ۵).

بحث

برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بین بعضی از صفات مانند ارتفاع گیاه، تعداد شاخه‌ها و عملکرد برگ، همبستگی مثبتی وجود دارد. به عبارت دیگر، افزایش این صفات باعث افزایش عملکرد می‌شود.

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 خشکی

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

صفت Trait	نشانگر Marker	آر R	مربع آر R ²	خطا E	تغییرات آر R ² change	مقدار F مغییرات مربع آر F of R ² change	ضریب بتا استاندارد Standardized beta coefficients	مقدار t t-value
		Normal conditions			شرایط نرمال			
عرض برگ Leaf width	SCoT21-3	0.885	0.783	0.19	0.783	10.8*	-0.679	11.34**
	SCoT12-5	0.997	0.994	0.04	0.211	166.4**	0.504	8.41*
تعداد برگ Leaf number	SCoT12-13	0.945	0.894	1.02	0.894	25.2*	-0.945	-5.02*
وزن اندام هوایی Shoots weight	SCoT21-3	0.916	0.840	0.01	0.840	15.69*	0.916	3.96*
عملکرد برگ Leaf yield	SCoT21-3	0.912	0.832	0.051	0.832	14.8*	0.734	9.05*
	SCoT12-2	0.994	0.989	0.016	0.157	90.1*	0.435	5.35*
کلروفیل کل Total Chlorophyll	SCoT35-5	0.888	0.788	0.56	0.788	11.18*	-0.888	-3.34*
پروترین Proline	SCoT12-1	0.997	0.993	0.00008	0.993	455.7**	0.997	21.35**
ارتفاع بوته Plant height	SCoT12-2	0.893	0.797	1.27	0.797	11.8*	0.893	3.44*
طول ریشه Root length	SCoT21-3	0.906	0.822	1.37	0.822	13.8*	0.798	18.49**
	SCoT12-12	0.998	0.997	0.24	0.175	284.9**	-0.432	-10.0*
وزن خشک اندام هوایی Dry Shoots weight	SCoT21-3	0.892	0.797	0.009	0.797	11.7*	1.094	113.7**
	SCoT21-1	1	1	0.0003	0.203	6482.6*	0.494	51.4**
عملکرد برگ خشک Dry Leaf yield	SCoT1-2	0.974	0.949	0.002	0.949	55.4**	-0.937	-21.2**
	SCoT35-5	0.998	0.996	0.0006	0.047	263.2**	0.221	5.01*
		Drought conditions			شرایط تنش خشکی			
طول برگ Leaf length	SCoT1-15	0.906	0.821	0.37	0.821	13.7*	-0.545	-4.56*
	SCoT21-2	0.992	0.984	0.13	0.163	62.1*	-0.542	-4.54*
عرض برگ Leaf width	SCoT1-2	0.929	0.863	0.11	0.863	18.9*	-0.929	-4.34*
تعداد برگ Leaf number	SCoT11-5	0.965	0.931	0.58	0.931	40.6**	0.965	6.37**
وزن اندام هوایی Shoots weight	SCoT21-3	0.987	0.974	0.024	0.974	110.7**	0.987	10.5**
عملکرد برگ Leaf yield	SCoT12-2	0.905	0.819	0.012	0.819	13.6*	0.835	12.4**
	SCoT11-5	0.996	0.991	0.003	0.172	111.9**	-0.421	-6.2*
کلروفیل a Chlorophyll a	SCoT21-2	0.930	0.865	0.13	0.865	19.2*	-0.930	-4.38*
کاروتنوئید Carotenoid	SCoT12-1	0.941	0.885	4.61	0.885	22.9*	0.941	4.79*
پروترین Proline	SCoT1-15	0.890	0.792	0.0001	0.792	11.5*	-0.817	-8.38*
	SCoT12-2	0.991	0.982	0.00005	0.190	53.18*	0.441	4.53*
ارتفاع بوته Plant height	SCoT21-1	0.930	0.865	1.002	0.865	19.21*	0.930	4.38*

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

در مقابل، میزان همبستگی بین بعضی دیگر از صفات مثل مقاومت به بیماری‌ها و آفات و عملکرد کلی گیاه، ممکن است منفی یا ضعیف باشد. مطالعات مختلفی نشان داد که عملکرد برگ با صفات همبستگی مثبت و معنی داری داشت و با نتایج این تحقیق در یک راستا بود. همچنین همبستگی صفات دیگر در مطالعاتی مثبت و در مطالعات دیگر منفی بود که برخی از آنها در راستای نتایج این تحقیق و برخی دیگر در تضاد با نتایج این تحقیق بود (Kumar et al. 2012; Moghaddam et al. 2014; Singh et al. 2015; Patel et al. 2018; Yaldiz & Camlica 2021; Jambhale et al. 2023) که این می‌تواند به دلیل تفاوت در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، محیط و شرایط آزمایشی متفاوت باشد. صفات مورفولوژیکی تحت تأثیر محیط رشد شناخته شده‌اند و تغییرات موجود در شرایط محیطی و رشد به تنوع مشاهده شده در این صفات کمک می‌کند. توجه به این نکته مهم است که صفات مورفولوژیکی، چند ژنی بودن، ممکن است به طور دقیق تغییرات ژنتیکی را در سطح ژنومی منعکس نکنند. بنابراین، گروه بندی جمعیت‌ها بر اساس این صفات ممکن است نتایج و تغییرات متفاوتی را در شرایط محیطی مختلف به همراه داشته باشد. این امر بر نیاز به بررسی دقیق هنگام استفاده از صفات مورفولوژیکی به تنهایی برای اهداف گروه‌بندی یا انتخاب تأکید می‌کند. برای به حداکثر رساندن هتروزیس، تلاقی ژنوتیپ‌ها یا ارقامی که دارای تفاوت‌های ژنتیکی قابل توجه هستند مفید است. برای دستیابی به این هدف می‌توان از تکنیک‌های تحلیل چند متغیره مانند تحلیل خوشه‌ای و گروه‌بندی بای‌پلات با تحلیل مؤلفه‌های اصلی استفاده کرد. این تکنیک‌ها امکان گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها را بر اساس ویژگی‌های زراعی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی فراهم می‌آورد، در نتیجه انتخاب والدین متنوع برای برنامه‌های آمیختگی و افزایش تنوع ژنتیکی را تسهیل می‌کند. ویژگی‌های آنها، امکان استفاده از آنها به عنوان والدین در برنامه‌های به‌نژادی برای افزایش تنوع ژنتیکی و بهبود بالقوه صفات مطلوب در فرزندان را فراهم می‌کند. تنوع بالای صفات مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های ریحان را می‌توان به شرایط محیطی و همچنین تغییرات ژنتیکی بین جمعیت‌ها نسبت داد. یافته‌های مشابهی توسط محققانی که روی گیاهان دارویی مختلف مطالعه می‌کنند، گزارش شده‌اند که پتانسیل استفاده از تنوع فنوتیپی در جمعیت‌ها یا ژنوتیپ‌ها را برای دستیابی به جمعیت‌ها یا ژنوتیپ‌های برتر و مدیریت برنامه‌های اصلاحی بر اساس آنها برجسته می‌کنند. این صفات در شناسایی و مشخص کردن تنوع در جمعیت‌ها مؤثر بوده‌اند (Golzar & Nourbakhsh 2019; Arabsalehi et al. 2022; Luo et al. 2022).

همچنین بیشترین و کمترین مقدار عملکرد برگ هم به ترتیب مربوط به ژنوتیپ بنفش ایرانی با میانگین $0/321$ گرم و ژنوتیپ سیاه با میانگین $0/049$ گرم در شرایط بدون تنش بود. این پژوهش نشان داد که تنش رطوبتی و ژنوتیپ‌های مختلف ریحان بر مقادیر کلروفیل a، b و کل تأثیر معنی‌دار دارند (جدول ۳). در شرایط بدون تنش، ژنوتیپ سیاه با مقدار $1/493$ گرم وزن تر/میلی گرم) و در شرایط تنش، ژنوتیپ ابلق با مقدار $0/808$ گرم وزن تر/میلی گرم) بالاترین سطح کلروفیل a را داشتند. برای کلروفیل b در شرایط بدون تنش، ژنوتیپ بنفش ایرانی با مقدار $2/616$ گرم وزن تر/میلی گرم) و در شرایط تنش، ژنوتیپ قرمز آتشین با مقدار $1/257$ گرم وزن تر/میلی گرم) بالاترین مقادیر را نشان دادند. این داده‌ها با نتایج مطالعات دیگر (Afkari 2018; Asghari et al. 2023; Hamidi et al. 2023) که نشان دادند تنش رطوبتی باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل برگ می‌شود، مطابقت

داشت. اما یافته‌های پژوهش کریمی و همکاران (Karimi et al. 2020) نشان داد که کلروفیل a و b با افزایش شدت تنش کم آبی افزایش می‌یابد که با یافته‌های این تحقیق مغایرت داشت که می‌تواند به دلیل ژنوتیپ‌های مورد بررسی و ژنتیک آنها و همچنین شرایط مورد آزمایش باشد اگرچه نتایج آنها حاکی از کاهش فتوسنتز بود.

آغازگر SCoT1 بالاترین مقدار PIC را در این مطالعه نشان داد که نشان دهنده کارایی آن در تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه ریحان است. مطالعات مشابه بر روی گیاهان دیگر مقادیر متوسط PIC بالایی را برای نشانگرهای SCoT نشان داده است، که اثربخشی آنها را در ارزیابی تنوع ژنتیکی برجسته می‌کند (Rahimi et al. 2018; Rahimi et al. 2019). آغازگر SCoT1 نیز بالاترین مقدار هتروزیگوسیتی را نشان داد که نشان دهنده کارایی آن در تشخیص جمعیت‌های مورد مطالعه است. مقادیر بالای تنوع ژنتیکی نشانگر توانایی نشانگر در تمایز ژنوتیپ‌ها از یکدیگر است. هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مکان‌های خاص ممکن است به نفوذ ژن و یا تاریخچه تکاملی ریحان نسبت داده شود. گستره تنوع ژنتیکی تحت تأثیر عواملی مانند نوع نشانگرهای مولکولی، تعداد نشانگرهای استفاده شده و روابط ژنتیکی در ژرمپلاسم ریحان قرار دارد (Rahimi et al. 2018; Rahimi et al. 2019).

هدف اولیه تجزیه و تحلیل خوشه‌ای، ارزیابی میزان ارتباط یا فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها است. این رویکرد محققان را قادر می‌سازد تا با انتخاب استراتژیک جمعیت‌های دور از خوشه‌های مختلف، زمان و تلاش مورد نیاز برای تلاقی تصادفی را کاهش دهند. با انتخاب از جمعیت‌هایی که فاصله ژنتیکی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند، می‌توان شانس دستیابی به هیبریدهای مورد نظر یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسل‌های بعدی مانند F_1 را افزایش داد (Esposito et al. 2013). درک تنوع ژنتیکی یک گونه گیاهی برای برنامه‌ریزی و اجرای استراتژی‌های حفاظتی موثر، صرف نظر از محدوده جغرافیایی آن، ضروری است. در بسیاری از موارد، نتایج به دست آمده از نشانگرهای مولکولی کاملاً با صفات فنوتیپی مطابقت ندارد. این اختلاف را می‌توان به کنترل چند ژنی صفات زراعی و حساسیت آنها به تأثیرات محیطی نسبت داد (Lambert et al. 2006). افزایش تعداد نشانگرها به طور بالقوه می‌تواند جداسازی بهتری را در ژرمپلاسم مورد مطالعه ایجاد کند، که طراحی و استفاده از نشانگرهای اضافی را ضروری می‌کند.

با توجه به اینکه جمعیت‌های درون هر خوشه از مکان‌های جغرافیایی متفاوتی مشتق شده‌اند، این نتیجه ثابت است و تنوع قابل توجهی را در بین جمعیت مورد مطالعه ریحان نشان می‌دهد. توجه به این نکته ضروری است که افزایش تنوع ژرمپلاسم منجر به وجود آلل‌های نادر در جمعیت می‌شود. در حالی که این می‌تواند شناسایی ارتباط‌های بالقوه را افزایش دهد، اما چالش‌هایی مانند افزایش احتمال ارتباط‌های کاذب و کاهش قدرت آماری ارتباط نشانگر-صفت را در پی دارد. برای اطمینان از نتایج قابل اعتماد در مطالعات تجزیه ارتباط، ارزیابی جمعیت‌هایی با تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بالا بسیار مهم است. علیرغم مزایای تجزیه ارتباط، اذعان به این نکته مهم است که وجود ساختار جمعیت به طور بالقوه می‌تواند منجر به ارتباط کاذب بین نشانگرها و صفات شود (Pritchard et al. 2000; Abecasis et al. 2001; Mandel et al. 2013). استفاده از تحلیل رگرسیون برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات می‌تواند به عنوان گام اولیه برای مطالعات آینده با تمرکز بر شناسایی QTL باشد. نشانگرهای شناسایی شده در این

تحقیق، در مقایسه با سایر نشانگرها، ممکن است احتمال بیشتری برای قرار گرفتن در مناطق کدگذاری صفات مورد مطالعه داشته باشند. این به این دلیل است که آنها در مدل رگرسیون قرار گرفتند و ارتباط قوی‌تری با تغییرات مشاهده شده در آن صفات نشان دادند. مشابه سایر محققان در این زمینه، تجزیه و تحلیل رگرسیون برای ایجاد رابطه بین نشانگرها و صفات در گونه های مختلف گیاهی به کار گرفته شده است که در نهایت تلاش‌های اصلاحی گیاه را تسهیل می‌کند (Rahimi et al. 2018; Rahimi et al. 2019). ضرایب β استاندارد شده اطلاعات ارزشمندی را در مورد جهت اثر نشانگر بر روی صفت ارائه می‌دهد. علامت منفی نشان دهنده اثر کاهش‌ی است، در حالی که علامت مثبت نشان دهنده اثر افزایشی است. برنامه‌های اصلاحی می‌توانند از ژنوتیپ‌های فاقد یا دارای آلل‌های خاص شناسایی شده توسط این نشانگرها برای افزایش یا کاهش بیان صفات هدف، همسو با اهداف اصلاح‌کننده استفاده کنند. قابل توجه است که برخی از نشانگرها با صفات متعدد مرتبط بودند که نشان دهنده ارتباط نزدیک بین این صفات یا کنترل بالقوه پلیوتروپیک است. این امر وابستگی متقابل و تنظیم ژنتیکی مشترک در بین این صفات را برجسته می‌کند، همانطور که در مطالعات دیگر محققین مشاهده شده است (Al-Ashkar et al. 2020; Farhangian-Kashani et al. 2021). استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات مورفولوژیکی مهم از طریق انتخاب به کمک نشانگر (MAS)، امکان شناسایی ژن‌های کلیدی و معرفی نشانگرهای کاندید را برای بررسی بیشتر در جمعیت‌ها فراهم می‌کند و در تولید و اصلاح گیاهان کمک می‌کند. در حالی که چالش‌هایی مانند کمبود جمعیت‌های با تنوع بالا برای تجزیه ارتباط و محدودیت‌های زمانی و همبستگی بین صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی وجود دارد، تجزیه و تحلیل رگرسیون به غلبه بر این محدودیت‌ها کمک می‌کند و یک رویکرد امیدوارکننده برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیکی ارائه می‌دهد. شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات، و همچنین ارتباط بین نشانگرهای خاص و صفات متعدد، راه را برای تحقیقات بیشتر در مناطق ژنومی خاص باز می‌کند. اعتبارسنجی این نشانگرهای مرتبط و تبدیل آنها به نشانگرهای SCAR خاص یا توالی‌های DNA خاص برای اصلاح هدف یک راه حل عملی و کاربردی است. این نشانگرها را می‌توان برای صفات مهم شناسایی شده در این مطالعه استفاده کرد (Rahimi et al. 2018; Rahimi et al. 2019). یافته‌ها، همراه با تحقیقات قبلی، نشان می‌دهند که نشانگرهای بسیار مرتبط و قابل اعتماد برای صفات خاص می‌توانند شناسایی و در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرند. با این حال، استفاده از جمعیت‌های بزرگ‌تر و متنوع‌تر و ترکیب تعداد بیشتری از نشانگرها برای تحقیقات جامع‌تر مهم است. این نشانگرهای شناسایی شده باید در جمعیت‌های تفکیک‌شده و جمعیت‌های بزرگ‌تر بررسی شوند تا همبستگی آنها با صفات خاص تأیید شود. در نهایت، این نشانگرها می‌توانند به طور قابل توجهی اثربخشی برنامه‌های اصلاحی را افزایش دهند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه تنوع خوبی بین ژنوتیپ‌های ریحان در دو شرایط مورد بررسی را نشان داد. نتایج نشان داد که صفات دارای تنوع خوبی هستند که نشان دهنده وجود عوامل ژنتیکی متفاوت در ژنوتیپ‌ها و همچنین تاثیر متفاوت اثرات محیطی بر ژنوتیپ‌ها بود. استفاده از نشانگرهای SCoT در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ریحان در شرایط تنش خشکی

می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی آینده مؤثر باشد. انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی یک رویکرد سریع در برنامه‌های اصلاحی ارائه می‌کند، و اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از این نشانگرها نقش مهمی را ایفا می‌کند. بنابراین، علاوه بر در نظر گرفتن صفات فنوتیپی، انتخاب ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های برتر با ارزش اصلاحی بالا با استفاده از نشانگرهای مولکولی قابل انجام است. لازم به ذکر است که گروه‌بندی ژنوتیپ‌های ریحان بر اساس داده‌های مولکولی با گروه‌بندی بر اساس صفات مطابقت کامل داشت. ژنوتیپ‌های ابلق و سیاه با توجه به اینکه برای این صفات در شرایط تنش افزایش نشان دادند یا کمترین کاهش را داشتند به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل در نظر گرفته شدند. با استفاده از تحلیل رگرسیون گام به گام، ۱۵ و ۱۲ جایگاه مرتبط با صفات به ترتیب در هر دو شرایط مورد مطالعه شناسایی شد. نتایج نشان می‌دهد که برخی از نشانگرها با صفات متعدد مرتبط هستند، که بر اهمیت حیاتی آن‌ها در اصلاح گیاه برای بهبود همزمان چند صفت تأکید می‌کند.

سپاسگزاران: از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری

پیشرفته، کرمان، ایران به خاطر حمایت مالی و حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزار می‌شود.

منابع

افکاری احمد (۱۳۹۶) تأثیر تنش خشکی و مقادیر کود نیتروژن بر میزان و عملکرد اسانس و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۳(۶(پیاپی ۸۶)). ۱۰۵۹-۱۰۴۷.

کریمی سمیه، زاهدی بهمن، مومیوند حسن (۱۳۹۹) بررسی تأثیر تنش کم آبی بر رشد میزان اسانس و برخی صفات فیزیولوژیک چهار رقم ریحان (*Ocimum basilicum* L.). پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۷(۲)، ۲۱۳-۲۰۱.

References

- AbdoliNasab M, Rahimi M (2020) Association analysis of traits in watermelon genotypes using molecular markers. Iran J Sci Technol Trans A Sci 44, 361-369.
- Abecasis GR, Cardon LR, Cookson WO et al. (2001) Association analysis in a variance components framework. Genet Epidemiol 21, S341-S346.
- Abuhashem YS, Khalil HB, El-Tahawey MA 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, Article number: 70.
- Afkari A (2018) Effects of drought stress and nitrogen fertilizer rate on some physiological characteristics, essential oil percentage, and yield of basil (*Ocimum basilicum* L.). Iranian J Medicinal Aromat Plants Res 33, 1047-1059 (In Persian).
- Aghaei M, Darvishzadeh R, Hassani A (2012) Molecular characterisation and similarity relationships among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. Rev Cienc Agron 43, 312-320.

- Al-Ashkar I, Alderfasi A, Ben Romdhane W et al. (2020) Morphological and genetic diversity within salt tolerance detection in eighteen wheat genotypes. *Plants* 9, Article 287.
- Arabsalehi F, Rahimmalek M, Sabzalian MR (2022) Morpho-physiological and molecular characterization reveal low genetic variation for conservation of endangered Iranian moshgak (*Ducrosia anethifolia* Boiss). *Biochem Genet* 66, 2587–2610.
- Asghari J, Mahdaviakia H, Rezaei-Chiyaneh E et al. (2023) Selenium nanoparticles improve physiological and phytochemical properties of basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought stress conditions. *Land* 12, Article 164.
- Azizi A, Ardalani H, Honermeier B (2016) Statistical analysis of the associations between phenolic monoterpenes and molecular markers, AFLPs and SAMPLs in the spice plant Oregano. *Herba Pol* 62, 42-56.
- Bates LS, Waldren Ra, Teare I (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207.
- Begna T (2021) Role and economic importance of crop genetic diversity in food security. *Int J Agric Sci Food Technol* 7, 164-169.
- Bhandari H, Bhanu A, Srivastava K et al. (2017) Assessment of genetic diversity in crop plants - an overview. *Adv Plants Agric Res* 7, 279-286.
- Botstein D, White RL, Skolnick M et al. (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 Mol Biol Rep* 27, 86-93.
- De Masi L, Siviero P, Esposito C et al. (2006) Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur Food Res Technol* 223, 273-281.
- Doyle J (1991) DNA protocols for plants. In: *Molecular techniques in taxonomy*. Hewitt GM, Johnston AWB & Young JPW (eds). Springer, Norwich, England. pp. 283-293.
- Esposito MA, Gatti I, Cravero VP et al. (2013) Combining abilities and heterotic groups in '*Pisum sativum*' L. *Aust J Crop Sci* 7, 1634-1641.
- Farhangian-Kashani S, Azadi A, Khaghani S et al. (2021) Association analysis and evaluation of genetic diversity in wheat genotypes using SSR markers. *Biol Futura* 72, 441-452.
- Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B et al. (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol Breed* 13, 93-102.
- Giachino RRA, Sönmez Ç, Tonk FA et al. (2014) RAPD and essential oil characterization of Turkish basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Syst Evol* 300, 1779-1791.
- Golkar P, Nourbakhsh V (2019) Analysis of genetic diversity and population structure in *Nigella sativa* L. using agronomic traits and molecular markers (SRAP and SCoT). *Ind Crops Prod* 130, 170-178.

- Gonda I, Faigenboim A, Adler C et al. (2020) The genome sequence of tetraploid sweet basil, *Ocimum basilicum* L., provides tools for advanced genome editing and molecular breeding. DNA Res 27, dsaa027.
- Hamidi M, Tohidi Moghadam H, Nasri M et al. (2023) How do mycorrhiza and plant growth stimulants improve the qualitative and quantitative yields of basil (*Ocimum basilicum* L.) under different irrigation regimes? Gesunde Pflanzen 75, 165-177.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeont Electr 4, 9pp.
- Henry RJ (2012) Molecular markers in plants. Wiley, USA.
- Jambhale V, Awari V, Aher A et al. (2023) Assessment of genetic variability in *Ocimum spp.* Pharma Innov J 12, 3016-3020.
- Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A et al. (2002) Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. J Agric Food Chem 50, 5878-5883.
- Kafi MA, Mahdavi Damghani M (2003) Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants. Ferdwsi University of Mashhad Press, Iran.
- Karimi S, Zahedi B, Mumivand H (2020) Evaluation of the effect of drought stress on growth, essential oil and some physiological traits of four basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. J Plant Prod Res 27, 201-213 (In Persian).
- Khadka K, Earl HJ, Raizada MN et al. (2020) A physio-morphological trait-based approach for breeding drought tolerant wheat. Front Plant Sci 11, Article 715.
- Khalid KA (2006) Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs [*Ocimum* sp.]. Int Agrophysics 20, 289-296.
- Kordrostami M, Rahimi M (2015) Molecular markers in plants: concepts and applications. Genete 3rd Millenn 13, 4024-4031.
- Kumar RR, Reddy LPA, Patel RP (2012) Genetic association for oil yield and its component traits in different *Ocimum* species. Electron J Plant Breed 3, 794-799.
- Labra M, Miele M, Ledda B et al. (2004) Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Sci 167, 725-731.
- Lambert SM, Borba EL, Machado MC et al. (2006) Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. Ann Bot 97, 389-403.
- Lee S-J, Umamo K, Shibamoto T et al. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem 91, 131-137.

- Lichtenthaler HK (1987) [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Methods in enzymology. Elsevier. pp. 350-382.
- Liu BH (1998) Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Louwaars NP (2018) Plant breeding and diversity: A troubled relationship? Euphytica 214, 1-9.
- Luo C, He X-H, Chen H et al. (2010) Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. Biochem Syst Ecol 38, 1176-1184.
- Luo C, He X-h, Chen H et al. (2011) Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. Biochem Syst Ecol 39, 676-684.
- Luo Z, Chen Z, Liu M et al. (2022) Phenotypic, chemical component and molecular assessment of genetic diversity and population structure of *Morinda officinalis* germplasm. BMC Genom 23, 1-17.
- Mandel JR, Nambeesan S, Bowers JE et al. (2013) Association mapping and the genomic consequences of selection in sunflower. PLoS Genet 9, Article: e1003378, 1003313pages.
- Moghaddam M, Omidbeygi R, Salimi A et al. (2014) An Assessment of genetic diversity among Iranian populations of basil (*Ocimum* spp.) using morphological traits. Iran J Hortic Sci 44, 227-243.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. Am Nat 106, 283-292.
- Pandey Y, Chaturvedi T, Swaroop H et al. (2023) Phytochemical and genetic marker (SCoT and CBDP) based study of genetic diversity and population structure in natural populations of *Cannabis sativa* L.: A high-value sustainable biodiversity of North-Indian Himalaya. Ind Crops Prod 200, Article 116892.
- Patel RP, Singh R, Lal RK et al. (2018) Genetic variability of agronomic traits and chemo diversity in the genus *Ocimum*. Trends Phytochem Res 2, 103-110.
- Pathirana R, Carimi F (2022) Management and utilization of plant genetic resources for a sustainable agriculture. Plants 11, Article 2038.
- Pawlak K, Kołodziejczak M (2020) The role of agriculture in ensuring food security in developing countries: Considerations in the context of the problem of sustainable food production. Sustainability 12, Article 5488.
- 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.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA et al. (2000) Association mapping in structured populations. Am J Hum Genet 67, 170-181.
- Rahimi M (2021) Genetic diversity, population structure and screening of molecular markers associated to agronomic traits in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Iran J Sci Technol Trans A Sci 45, 1549-1560.

- Rahimi M, Kordrostami M, SafaeiChaeikar S (2019) Genetic variation, population structure and the possibility of association mapping of biochemical and agronomic traits using dominant molecular markers in Iranian tea accessions. *Iran J Sci Technol Trans A Sci* 43, 2769-2780.
- Rahimi M, Nazari L, Kordrostami M et al. (2018) SCoT marker diversity among Iranian *Plantago* ecotypes and their possible association with agronomic traits. *Sci Hort* 233, 302-309.
- Rahimi M, Ranjbaran E (2023) Investigating the geographical, phenotypic and genetic diversity of Sickleweed populations by bioclimatic parameters, morphological traits and SCoT molecular markers. *Physiol Mol Biol Plants* 29, 421-433.
- Reynolds M, Chapman S, Crespo-Herrera L et al. (2020) Breeder friendly phenotyping. *Plant Sci* 295, Article 110396.
- Sawant SV, Singh PK, Gupta SK et al. (1999) Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants. *J Genet* 78, 123-131.
- Shannon CE (2001) A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mob Comput Commun Rev* 5, 3-55.
- Sheller M, Tóth EG, Ciocîrlan E et al. (2023) Genetic diversity and population structure of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) in Middle Siberia. *Forests* 14, Article 119.
- Singh Y, Gaurav S, Kumar P et al. (2015) Genetic variability and correlation coefficient in F₂ segregating population of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Med Plants - Int J Phytomed Relat Ind* 7, 196-207.
- Stankovic S, Zdravkovic-Korac S, Vujcic M, Jevremovic, S et al. (2019) Genetic diversity and population structure of basil (*Ocimum basilicum* L.) germplasm from Iran and other countries using ISSR markers. *Ind Crops Prod* 137, 111-119.
- 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.
- Wang Z, Li G, Sun H et al. (2018) Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biol Open* 7, bio035279.
- Wei T, Simko V, Levy M et al. (2017) Package 'corrplot'. *Statistician* 56, e24.
- Yaldiz G, Camlica M (2021) Agro-morphological and phenotypic variability of sweet basil genotypes for breeding purposes. *Crop Sci* 61, 621-642.
- Yeh FC (1999) POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft Window-Bases Freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.