

بررسی تنوع ژنتیکی و بیوشیمیایی شش توده ریحان *Ocimum basilicum* L.

روجا شباهنگ^۱، داوود صمصام پور^{۲*}، حسین زینلی^۳، مرتضی ابراهیمی^۴ و علی فرهادی^۵

۱- دانش آموخته دکترای گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس پست الکترونیک: samsapoor@hormozgan.ac.ir

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان

۴- استادیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان

۵- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۳

چکیده

موفقیت به‌زادگران گیاهی به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان و خویشاوندان وحشی آن‌ها بستگی دارد. آگاهی از فاصله و خویشاوندی ژنتیکی امکان سازماندهی ذخایر ارثی، نمونه‌برداری موثر از ژنوتیپ‌ها و استفاده بهتر از تنوع را فراهم می‌کند. این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی شش توده ریحان (*Ocimum basilicum* L.) و نیز ارزیابی پاسخ بیوشیمیایی آن‌ها به شرایط کم آبیاری و تراکم در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان طی آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. توده‌های ریحان (شامل توده افغانی سبز، قائمیه بنفش، قهجاورستان سبز، اردستان سبز، مبارکه سبز و مهیار بنفش) با دو تراکم ۶/۶ و ۲۰ بوته در متر مربع، به صورت جوی و پشته‌هایی به فواصل ۵۰ cm کشت شدند. بذرها این توده‌ها بر روی پشته‌هایی به فاصله‌ی ۳۰ cm (در تراکم ۶/۶ بوته در متر مربع) و ۱۰ cm (در تراکم ۲۰ بوته در متر مربع) قرار گرفتند. آبیاری به صورت قطره‌ای با استفاده از تشتک تبخیر و در قالب سه تیمار ۸۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی انجام شد، همچنین در این آزمایش ۱۲ جفت آغازگر AFLP جهت بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. براساس نتایج بدست آمده در تمام شرایط آبیاری توده افغان بالاترین درصد اسانس را نشان داد. در بین توده‌های مورد مطالعه بالاترین میزان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب با مقادیر ۰/۶۲، ۰/۴۴ و ۰/۵۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) به توده قهجاورستان و بالاترین مقادیر کلروفیل a و b (۱/۴۹ و ۰/۷۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) به توده مبارکه اختصاص داشت. در رابطه با تنش کم آبی مشخص شد که اعمال تیمارهای ۸۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب منجر به افزایش ۴ و ۱۹ درصدی کاتالاز، ۶ و ۲۲ درصدی پراکسیداز و ۵ و ۲۰ درصدی سوپراکسید دیسموتاز گردید. به‌طور کلی توده افغان بالاترین میزان تحمل به تنش را نشان داد. براساس تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از AFLP هر آغازگر به‌طور میانگین تولید ۱۰/۵۱ باند چندشکل کرد و آغازگر ۱۱ بیشترین تولید باند را در بین آغازگرها به خود اختصاص داد. ارزیابی ماتریس شباهت بیانگر بیشترین تشابه ژنتیکی بین توده‌های مبارکه و اردستان به میزان ۰/۹۹ بود و کمترین تشابه ژنتیکی مربوط به توده‌های اردستان و مهیار بود که به میزان ۰/۷۱ بدست آمد. بطور کلی براساس نتایج بدست آمده، از توده‌هایی با کمترین تشابه ژنتیکی (اردستان و مهیار) می‌توان در برنامه‌های اصلاحی به عنوان والد استفاده کرد که منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی بالاتر می‌شود. همچنین توده افغان می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مقاوم به تنش به عنوان والد مطلوب لحاظ گردد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، تنش، تنوع ژنتیکی و متابولیت ثانویه

مقدمه

ریحان *Ocimum basilicum* L. گیاهی علفی، یکساله و متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. جنس *Ocimum* دارای ۱۶۰ گونه از گیاهان علفی یکساله و چندساله و نیز گیاهان بوته‌ای می‌باشد که بزرگترین جنس در خانواده نعنائیان محسوب می‌شود (Chowdhury et al., 2017). منشأ این گیاه هند، ایران و افغانستان گزارش شده است (Omidbeygi., 2000) که در میان آنها *O. basilicum* گونه اقتصادی بوده و امروزه به طور تجاری در کشورهای مجارستان، ایالت کالیفرنیا، امریکا، هند، اسپانیا، مصر، پاکستان، اندونزی، مراکش و تقریباً در تمام مناطق گرم و معتدل کشت می‌شود (Chaturvedi et al., 2018). ریحان در بیشتر فرماکوپه‌ها به‌عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده است. مواد مؤثره این گیاه اشتهاآور است و برای معالجه نفخ شکم و کمک به هضم غذا استفاده می‌شود، از این گیاه می‌توان برای معالجه برخی ناراحتی‌های قلبی و مداوای بزرگ شدن طحال استفاده کرد (Ghasemi dehkordi., 2014). ریحان همانند سایر گیاهان خانواده نعنائیان حاوی اسانس است، اسانس ریحان خاصیت ضد قارچ و باکتریایی دارد و کنترل‌کننده حشرات است، همچنین در صنایع غذایی، آرایشی بهداشتی و عطرسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Omidbeygi., 2000). این گیاه دارای ترکیبات فنلی پروپانوییدی و ترپنی می‌باشد و رزمارینیک اسید عمده‌ترین ترکیب آن است (Sundararajan et al., 2018). ترکیبات فنلی پروپانوییدی و ترپنی در گروه متابولیت‌های ثانویه گیاهی جای دارند، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها متابولیت‌های اولیه گیاه را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات به‌طور مستقیم در مراحل رشد و نمو گیاه شرکت می‌کنند اما گروه دیگری از ترکیبات آلی که نبودشان سبب اختلال در بقا، باروری و ظاهر گیاه شده هرچند به مرگ سریع گیاه منجر نمی‌شود ولی متابولیت‌های ثانویه گیاه را تشکیل می‌دهند. متابولیت‌های ثانویه در سیستم دفاعی گیاه و

در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده فعالیت دارند، این گروه از مواد، دامنه وسیعی از ترکیبات دارویی، رنگ‌های طبیعی، حشره‌کش‌ها و چاشنی را به خود اختصاص می‌دهند که به طبع آن در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی، نساجی و تغذیه کاربردهای بسیار دارند (Hussein & El-Anssary, 2019; Pang et al., 2021).

تنوع مورفوفیزیولوژیک و درنهایت عملکرد گیاه ناشی از تنوع ژنتیکی و تنوع شرایط محیطی کشت و برهم‌کنش آنهاست (Swarup et al., 2021). موفقیت به‌نژادگران گیاهی به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان و خویشاوندان وحشی آنها بستگی دارد و اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه اصلاحی امکان سازمان‌دهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع را فراهم می‌کند (Adam & Hamza, 2020). در ارزیابی داده‌های فتوتیپی ریحان مشخص شد که صفت میزان روغن و ارتفاع بوته بیشترین و تعداد شاخه کمترین توارث‌پذیری را به خود اختصاص داد، از این رو پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های مورفولوژیک ریحان صفت‌های میزان تولید روغن و نیز ارتفاع بوته مورد توجه قرار گیرند (Singh et al., 2018). همچنین بررسی تنوع ۹ توده ریحان با نشانگر RAPD و تلفیق آن با داده‌های مورفولوژیک و شیمیایی نشان داد که تلفیق نشانگرهای مولکولی، شیمیایی همراه با اطلاعات مورفولوژی روشی مناسب برای شناسایی تنوع ژنتیکی این گونه محسوب می‌گردد (Chowdhury et al., 2017). با توجه به اهمیت گیاه دارویی ریحان *Ocimum basilicum* L. و اینکه ایران یکی از مراکز تنوع آن می‌باشد، انجام برنامه‌های اصلاحی برای تولید ااریته‌هایی با میزان فنول، آنتی‌اکسیدان و اسانس بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. بررسی تنوع توده‌های جنس ریحان بومی ایران نشان داد که ریحان‌های ایران از نظر صفات بررسی‌شده از تنوع بالایی برخوردارند (Moghaddam et al., 2011). واریته‌های تجاری فعلی ریحان تنوع بسیار زیادی را از

2017). در تراکم کاشت مناسب بهره‌مندی گیاه از عوامل محیطی افزایش یافته و حداکثر آسیمیلایون و عملکرد حاصل خواهد شد (Fang et al., 2018). با توجه به اهمیت این گیاه دارویی، انجام برنامه‌های اصلاحی برای تولید واریته‌هایی با میزان اسانس بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. از این رو، شناسایی توده‌های بالقوه می‌تواند نقش دارویی این گیاه را افزایش دهد. هدف از این تحقیق نیز بررسی تنوع مولکولی و ژنتیکی شش توده ریحان و نیز ارزیابی پاسخ بیوشیمیایی آنها به شرایط کم آبیاری و تراکم و همچنین کمک به انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های اصلاحی است.

مواد و روش‌ها

اجرای آزمایش: این پژوهش در سال ۹۹-۱۳۹۸ در گلخانه با دمای روزانه 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دمای شبانه 18 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و شدت نور ۱۴ تا ۱۵ هزار لوکس در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان- ایستگاه تحقیقاتی دستگرد (۳۲ درجه و ۶۱ دقیقه شمالی و ۵۱ درجه و ۶۱ دقیقه شرقی) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل تنش آبی، توده و تراکم کاشت بود. توده‌های مختلف ریحان بومی ایران (شش توده که در دست کشاورزان استان کشت می‌شوند شامل توده افغانی سبز، قائمیه بنفش، قهجاورستان سبز، اردستان سبز، مبارکه سبز و مهیار بنفش) در گلخانه به صورت جوی و پشته به فواصل ۵۰ cm کشت شدند، به گونه‌ای که بذرها بر روی پشته‌ها به فاصله ۳۰ cm (در تراکم ۶/۶ بوته در مترمربع) و ۱۰ cm (در تراکم ۲۰ بوته در مترمربع) قرار گرفتند (خصوصیات خاک و آب مورد استفاده برای آبیاری در جدول ۱ ذکر شده است). آبیاری به صورت قطره‌ای کاملاً کنترل شده با استفاده از تشتک تبخیر و در قالب سه تیمار ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی انجام شد. ۱۰۰٪ آبیاری، ۶۰٪ براساس ظرفیت زراعی تعیین گردید و در ۸۰٪ آبیاری، ۲۰٪

لحاظ شکل برگ، رنگ گل‌ها، ارتفاع و ساختار گیاه و اجزای مواد مؤثره نشان می‌دهند (Chowdhury et al., 2017). برای نمونه، میزان اسانس ریحان با توجه به شرایط اقلیمی و محل رویش متفاوت است و بین ۰/۴ تا ۱/۵ درصد می‌باشد (Amaral-baroli et al., 2016). اسانس ریحان شامل دو گروه ترین‌ها (لیمون، کامفور، لینالول، ژرانیول و ...) و فینیل پروپانویدها (اوزنول، چاویکول، متیل چاویکول، سینامات و ...) است که ترکیبات فینیل پروپانویدها آن نماینده صفات دارویی این گیاه می‌باشد (Abdollahi Mandoulakani et al., 2017). فینیل پروپانویدها ترکیباتی فنولی بوده که دارای حلقه فینیلی و زنجیره سه کربنی هستند، این گروه از مواد که از مسیر فینیل پروپانویدی سنتز می‌شوند عامل طعم، بو و مزه در اسانس هستند و نقش مهمی در سازگاری گیاهان و افزایش رقابت آنها در منابع محدود مانند نور و آب با سایر گونه‌های گیاهی دارند (Sundararajan et al., 2018). بسیاری از آنها در دفاع علیه گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا نقش داشته و یا در حفاظت مکانیکی، جذب عوامل گرده‌افشان و پراکنده کردن میوه یا در کاهش رشد گیاهان رقیب دخالت دارند، این ترکیبات در شرایط تنش در ناحیه تنش تولید می‌شوند و گیاه را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی حفظ می‌کنند (Onofrei et al., 2018). روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد، براساس تحقیقات به عمل آمده انواع تنش‌ها نیز بر میزان اسانس و ترکیبات اسانس گیاه دارویی ریحان تأثیر مثبت دارد (Ghasemi et al., 2017). تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی تحت کنترل ژنتیکی است ولی عوامل محیطی به ویژه شرایط تنش‌زا، نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به عهده دارند. کم آبیاری به عنوان یک راهبرد سودمند اقتصادی در وضعیت محدودیت آبیاری و با هدف حداکثر استفاده از واحد حجم آب مصرفی مطرح است (Rowland et al., 2018). از دیگر عوامل زراعی مؤثر بر کمیت و کیفیت عملکرد گیاهان می‌توان به تراکم بوته در واحد سطح اشاره کرد (Soleymani,

وسط گلخانه انجام گردید. کلیه مواد غذایی مورد نیاز بر اساس آزمون تجزیه خاک، از طریق آبیاری قطره‌ای تأمین شد.

کمتر از شرایط ظرفیت زراعی و در ۶۰٪ آبیاری ۴۰٪ کمتر از ظرفیت زراعی آبیاری انجام شد. یادآوری می‌شود آبیاری بر اساس اندازه‌گیری میزان تبخیر روزانه از تشت تبخیر واقع در

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلخانه و خصوصیات شیمیایی آب مورد استفاده در ایستگاه تحقیقاتی دستگرد (اصفهان)

Table 1: Soil physical and chemical properties in greenhouse and the water analysis reports in In Dastgerd Research station (Isfahan)

خصوصیات خاک	Soil properties	Amounts	خصوصیات شیمیایی آب	Water Report	Amounts
هدایت الکتریکی	EC×103	1.21 DS/m	هدایت الکتریکی	EC	0.46 DS/m
اسیدیته کل اشباع	PH of Paste	7.7	اسیدیته	PH	7.4
ازت کل	Total N	0.17%	بی‌کربنات	HCO ₃ ⁻	1.4 Meq/l
کربن آلی	Organic Carbon	1.67%	کلراید	Cl ⁻	1.2 Meq/l
مواد خنثی شونده	T.N.V	39.5%	سولفات	SO ₄ ²⁻	1.6 Meq/l
فسفر قابل جذب	P (ava.)	26.3 Mg/kg	مجموع آنیون‌ها	S.Anions	4.2 Meq/l
پتاسیم قابل جذب	K (ava.)	300 Mg/kg	کلسیم	Ca	3.4 Meq/l
مس	Cu (ava.)	0.58 Mg/kg	سدیم	Na	0.7 Meq/l
روی	Zn (ava.)	6.2 Mg/kg	مجموع کاتیون‌ها	S.Cations	4.1 Meq/l
منگنز	Mn (ava.)	7.42 Mg/kg	کل املاح محلول	TDS	240 mg/l
آهن	Fe (ava.)	0.88 Mg/kg	سختی کل	hardness	175 mg/l
شن	Sand	56%			
سیلت	Silt	31%			
رس	Clay	13%			
بافت خاک	Texture	Sandy loam			

کردن برگ‌ها استخراج اسانس از ۲۰۰ گرم نمونه گیاهی انجام گردید، این مرحله در دستگاه تقطیر انجام و پس از ۲ ساعت لایه اسانسی تشکیل شده از روی آب جدا شد (Sefidkon *et al.*, 2007).

بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگر AFLP: استخراج و خالص‌سازی DNA از برگ به روش CTAB انجام شد. تعیین کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز انجام شد و با دستگاه نانودراپ کمیت و کیفیت DNA بر اساس جذب نوری اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی گردید.

صفات بیوشیمیایی: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش Aebi (۱۹۷۴)، اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (گایاگول پراکسیداز) (POD) با استفاده از ترکیب فنلی گایاگول و از روش Kochba و همکاران (۱۹۷۷)، اندازه‌گیری آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) و اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a و کلروفیل b از روش Arnon (۱۹۶۷) استفاده شد. برای استخراج اسانس، برگ گیاه در هوای آزاد و به دور از تابش مستقیم خورشید در سایه خشک شد. پس از آسیاب

مقدماتی، تکثیر انتخابی با استفاده از نشانگرهایی با سه باز انتخابی، الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید، رنگ آمیزی و ظهور ژل و در پایان کار امتیازدهی باندها بود.

در ادامه تکنیک AFLP بر اساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با اعمال تغییرات جزئی انجام شد، مراحل این تکنیک به ترتیب شامل برش DNA ژنومی (هضم مضاعف) با دو آنزیم برشی، اتصال آداپتورها به قطعات حاصل از هضم، تکثیر

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر انتخابی در روش AFLP

Table 2: Sequence of primers used in selective amplification in AFLP method

ردیف	نام آغازگر Primer names	ترکیب آغازگر Primer sequences
1	EAC/MCAA	E: 5'-ACC TGC GTA CCA ATT CAC-3' M: 5'-CTG GAG TCC TGA GTA ACA A-3'
2	EAC/MCAT	E: 5'-ACC TGC GTA CCA ATT CAC-3' M: 5'-CTC GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
3	EAC/MCTG	E: 5'-ACC TGC GTA CCA ATT CAC-3' M: 5'-CTA GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
4	ECC/MCTA	E: 5'-ACC TGC GTA CCA ATT CCC-3' M: 5' -CTT GAG TCC TGA GTA ACT A-3'
5	ECC/MCAT	E: 5' -CGC TGC GTA CCA ATT CCC-3' M: 5' -CTG GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
6	ECC/MCTG	E: 5' -CGC TGC GTA CCA ATT CCC-3' M: 5' -CTC GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
7	ECG/MCTC	E: 5' -CGC TGC GTA CCA ATT CCG-3' M: 5' -CTA GAG TCC TGA GTA ACT C-3'
8	EAGG/MCAT	E: 5' -CGC TGC GTACCA ATT CAG G-3' M: 5' -CTT GAG TCC TGA GTA ACT A-3'
9	ECG/MCAT	E: 5' -ATC TGC GTA CCA ATT CCG-3' M: 5' -CTG GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
10	EACG/MCTC	E: 5' -ATC TGC GTA CCA ATT CACG-3' M: 5' -CTC GAG TCC TGA GTA ACT C-3'
11	EACG/MCAT	E: 5' -ATC TGC GTA CCA ATT CACG-3' M: 5' -CTA GAG TCC TGAGTA ACT A-3'
12	EAGG/MCAT	E: 5' -ATC TGC GTA CCA ATT CAGG-3' M: 5' -CTT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'

E = نشانگر EcoR I و M = نشانگر Mse I

E=EcoR I marker and M=Mse I marker

درصد اسانس پایدار در شرایط تنش آبی معرفی می‌شود، البته این توده با افزایش سطح تنش از میزان اسانس بالاتری برخوردار بود (جدول ۳).

صفات بیوشیمیایی: براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در بین توده‌های مورد مطالعه بالاترین میزان کاتالاز (۰/۶۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر)، پراکسیداز (۰/۴۴ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) و سوپراکسید دیسموتاز (۰/۵۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) به توده قهجاورستان و بالاترین مقادیر کلروفیل a (۱/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل b (۰/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به توده مبارکه اختصاص داشت. در رابطه با تنش کم آبی مشخص شد که اعمال تیمارهای ۸۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب منجر به افزایش ۴ و ۱۹ درصدی کاتالاز، ۶ و ۲۲ درصدی پروکسیداز و ۵ و ۲۰ درصدی سوپراکسید دیسموتاز گردید اما میزان کلروفیل a با اعمال سطوح ۸۰ و ۶۰ به ترتیب ۴ و ۱۰ درصد کاهش یافت و این کاهش برای کلروفیل b به میزان ۱۰ و ۳۹ درصد بود (جدول ۴). براساس گروه‌بندی توده ریحان صفات بیوشیمیایی دو توده اردستان و مبارکه بیشترین شباهت را با یکدیگر در مقایسه با سایر توده‌ها داشتند (شکل ۱)، همچنین این دو توده کمترین شباهت را به ترتیب با توده‌های قهجاورستان و قائمیه نشان دادند.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: برای انجام تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SAS ver. 9.1 و مقایسات میانگین از آزمون LSD استفاده گردید و گروه‌بندی توده‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب عدم تشابه جاکارد و الگوریتم ward با استفاده از نرم‌افزار (Dissimilarity Analysis (Representation for windows) DARwin انجام شد.

نتایج

محتوای اسانس: بر اساس تجزیه واریانس انجام شده مشخص گردید که تأثیر تمام فاکتورهای آزمایشی مورد مطالعه و اثرهای متقابل آنها در سطح ۱ درصد بر این صفت معنی‌دار بودند و بر اساس مقایسات میانگین مشخص شد که بالاترین میانگین اسانس از تراکم $10 \times 50 \text{ cm}^2$ به میزان ۲/۵۶ درصد وزنی بدست آمد و در بین توده‌های مورد مطالعه بالاترین میزان اسانس به توده افغان به میزان ۲/۵۱ درصد و کمترین میزان به توده مهیار (۱/۲۴ درصد) اختصاص داشت. اعمال تیمارهای آبیاری ۶۰ و ۸۰ درصد ظرفیت زراعی منجر به افزایش اسانس به ترتیب به میزان ۸۶ و ۲۵ درصد نسبت به تیمار شاهد شد. در رابطه با اثرهای متقابل تیمارهای آزمایشی نیز مشخص شد که در تمام شرایط آبیاری توده افغان بالاترین درصد اسانس را داشته است، بنابراین این توده به‌عنوان توده با حداکثر

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی در توده‌های گیاه دارویی ریحان در شرایط تنش آبی و تراکم کاشت

Table 3: Comparison of mean biochemical traits in basil genotypes under water stress and planting density

تنش آبی Drought	توده Landrace	تراکم density cm ²	کاتالاز	پروکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	درصد اسانس	کلروفیل a	کلروفیل b
			CAT	POD	SOD	Essential oil (%)	Chl. a	Chl. b
			μmol.m ⁻¹ /FW			mg/g FW		
60% FC	افغان	50×30	0.57 efg	0.41 b-f	0.49 b-g	2.12 d	1.35 d-j	0.695 e-k
	Afghan	50×10	0.43 j-n	0.31 d-i	0.37 d-i	3.38 a	1.11 k	0.283 qrs
	قائمیه	50×30	0.42 j-n	0.30 d-i	0.36 d-i	1.34 p	1.32 e-k	0.335 n-s
	Ghaemieh	50×10	0.75 bc	0.54 ab	0.65 ab	2.22 j	1.15 jk	0.148 s
	قهجاورستان	50×30	0.61 de	0.44 bcd	0.53 bcd	2.61 h	1.43 a-g	0.620 g-m
	Ghahjavarestan	50×10	0.61 de	0.44 bcd	0.52 b-e	2.21 j	1.37 c-j	0.450 k-r
	اردستان	50×30	0.46 h-m	0.33 d-i	0.40 c-i	1.82 l	1.41 b-h	0.806 d-g
	Ardestan	50×10	0.48 g-l	0.34 c-i	0.41 c-i	3.56 e	1.20 h-k	0.228 rs
	مبارکه	50×30	0.51 f-j	0.36 c-h	0.44 c-h	1.63 mn	1.37 c-j	0.784 d-h
	Mobarakeh	50×10	0.46 h-m	0.49 d-i	0.39 c-i	3.21 f	1.37 c-j	0.385 m-s
	مهیار	50×30	0.68 cd	0.49 abc	0.58 abc	1.22 q	1.47 a-g	0.419 l-r
	Mahyar	50×10	0.61 de	0.43 bcd	0.52 b-e	1.66 m	1.50 a-g	0.240 rs
80% FC	افغان	50×30	0.38 mno	0.27 e-i	0.33 e-i	1.87 l	1.30 g-k	0.906 cde
	Afghan	50×10	0.38 mno	0.27 e-i	0.32 f-i	2.73 c	1.17 ijk	0.423 l-r
	قائمیه	50×30	0.59 def	0.42 b-e	0.50 b-f	1.82 l	1.54 a-f	0.660 f-l
	Ghaemieh	50×10	0.36 nop	0.26 f-i	0.31 f-i	0.90 rst	1.36 d-j	0.307 p-s
	قهجاورستان	50×30	0.85 a	0.61 a	0.73 a	0.76 u	1.54 a-e	1.363 a
	Ghahjavarestan	50×10	0.40 lmn	0.28 d-i	0.34 d-i	3.10 f	1.39 c-i	0.456 k-r
	اردستان	50×30	0.54 e-h	0.39 b-g	0.46 b-g	0.86 stu	1.49 a-g	0.884 c-f
	Ardestan	50×10	0.53 e-i	0.38 c-g	0.46 b-g	0.76 g	1.32 e-k	0.490 j-q
	مبارکه	50×30	0.35 nop	0.25 ghi	0.30 ghi	1.52 no	1.58 abc	0.954 bcd
	Mobarakeh	50×10	0.44 i-n	0.32 d-i	0.38 d-i	2.46 i	1.46 a-g	0.595 g-m
	مهیار	50×30	0.53 e-i	0.38 c-g	0.45 c-h	0.04 y	1.55 a-d	0.668 e-k
	Mahyar	50×10	0.38 mno	0.27 e-i	0.33 e-i	0.98 r	1.41 a-h	0.273 qrs
100% FC	افغان	50×30	0.35 nop	0.25 ghi	0.30 ghi	2.09 k	1.44 a-g	1.055 bc
	Afghan	50×10	0.27 p	0.20 i	0.23 i	2.90 b	1.47 a-g	0.744 d-i
	قائمیه	50×30	0.42 j-n	0.30 d-i	0.36 d-i	0.22 x	1.50 a-g	0.564 g-n
	Ghaemieh	50×10	0.30 op	0.21 hi	0.26 hi	0.96 rs	1.42 a-g	0.315 o-s
	قهجاورستان	50×30	0.41 k-n	0.30 d-i	0.35 d-i	1.22 q	1.47 a-g	0.797 d-h
	Ghahjavarestan	50×10	0.84 ab	0.60 a	0.72 a	0.82 tu	1.49 a-g	0.723 d-j

تنش آبی Drought	توده Landrace	تراکم density cm ²	کاتالاز CAT	پروکسیداز POD	سوپراکسید دیسموتاز SOD	درصد اسانس Essential oil (%)	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b
			μmol.m ⁻¹ /FW				mg/g FW	
	اردستان	50×30	0.49 g-l	0.35 c-i	0.42 c-i	0.18 x	1.61 ab	1.359 a
	Ardestan	50×10	0.37 mno	0.27 e-i	0.32 f-i	1.46 o	1.32 f-k	0.552 h-o
	مبارکه	50×30	0.49 g-l	0.35 c-i	0.42 c-i	0.80 tu	1.64 a	1.176 ab
	Mobarakeh	50×10	0.56 efg	0.40 b-g	0.48 b-g	1.99 k	1.50 a-g	0.647 f-l
	مهییار	50×30	0.51 f-j	0.36 c-h	0.44 c-h	0.46 w	1.53 a-f	0.538 i-p
	Mahyar	50×10	0.50 f-k	0.36 c-h	0.43 c-h	0.61 v	1.45 a-g	0.401 m-r

میانگین‌های هر ستون با حروف مشابه براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means of columns followed by similar letters have no significant differences at 5% probability by LSD test

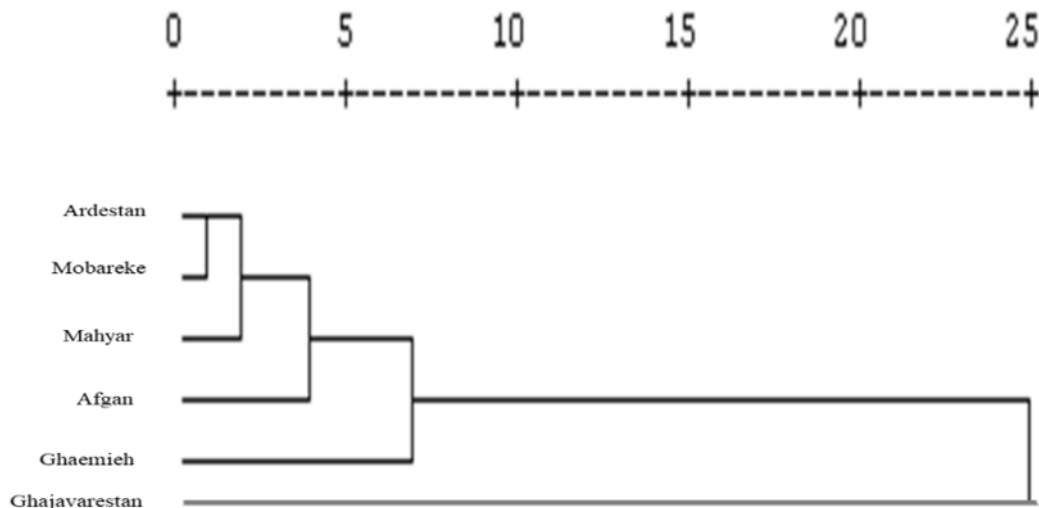
جدول ۴- مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی و درصد وزنی اسانس در سطوح مختلف تنش آبی، تراکم بوته و اثر متقابل تنش در تراکم بر اساس میانگین کل توده‌های ریحان

Table 4: Comparison of mean of essential oil and biochemical traits of basil between water stress and density levels and their interaction averaged over genotypes

تنش آبی Drought stress	تراکم Density (cm ²)	کاتالاز CAT μmol.m ⁻¹ /FW	پروکسیداز POD μmol.m ⁻¹ /FW	سوپراکسید دیسموتاز SOD μmol.m ⁻¹ /FW	کلروفیل a Chl. a mg/g FW	کلروفیل b Chl. b mg/g FW	درصد اسانس essential oil (%)
60% FC	50×10	0.54 a	0.41 a	0.46 a	1.33 b	0.45 b	2.29 a
80% FC	50×10	0.44 b	0.31 b	0.38 b	1.45 a	0.63 a	1.51 ab
100% FC	50×10	0.43 b	0.31 b	0.37 b	1.49 a	0.71 a	1.07 b
	50×30	0.45 a	0.34 a	0.39 a	1.36 b	0.43 b	1.94 a
	50×30	0.48 a	0.35 a	0.42 a	1.49 a	0.77 a	1.30 b
60% FC	50×10	0.53 a	0.43 a	0.46 a	1.27 c	0.29 c	2.64 a
	50×30	0.54 a	0.39 ab	0.47 a	1.39 b	0.61 ab	1.94 ab
80% FC	50×10	0.42 a	0.30 b	0.36 a	1.37 bc	0.42 bc	1.87 ab
	50×30	0.47 a	0.33 ab	0.40 a	1.53 a	0.85 a	1.15 b
100% FC	50×10	0.42 a	0.30 b	0.36 a	1.44 ab	0.56 b	1.31 ab
	50×30	0.45 a	0.32 ab	0.38 a	1.53 a	0.86 a	0.83 b

میانگین‌های هر ستون با حروف مشابه براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means of columns followed by similar letters have no significant differences at 5% probability by LSD test.



شکل ۱- گروه‌بندی توده ریحان براساس صفات بیوشیمیایی

Fig 1. Basil grouping based on biochemical traits

مقدار شاخص نی را کسب کردند. ضریب شاخص شانون بیانگر میزان چند شکلی در بین توده‌ها است، در این تحقیق میانگین شاخص شانون ۰/۳۵۹ بود که نشان‌دهنده تنوع متوسط در توده‌های تحت بررسی است. همچنین با بررسی شاخص شانون آغازگر ۱۱ کمترین مقدار شانون (۰/۲۴۳) و آغازگر ۴ با کسب میانگین ۰/۴۱۰ بیشترین مقدار این شاخص را داشتند که نشان می‌دهد برای بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی آغازگر ۴ گزینه‌ای مناسب است و می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند. آگاهی بخشی نشانگرهای AFLP با میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار سنجیده می‌شود. آغازگر ۱۰ و ۷ بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار را با میانگین ۰/۰۸۵ نشان دادند که می‌توانند در مطالعات تنوع ژنتیکی مؤثر واقع شده و از این آغازگرها برای آنالیز تنوع در ژرم‌پلاسم استفاده کرد. در بین آغازگرها، آغازگر ۱۱ کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار را با میانگین ۰/۰۳۱ نشان داد. با بررسی شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی جمعیت کل به ترتیب آغازگرهای ۷ و ۴ بیشترین مقدار را با میانگین ۰/۱۰۳

تنوع ژنتیکی: در این آزمایش از ۱۲ جفت آغازگر AFLP استفاده شد که همه آنها بر روی DNA تکثیر داشتند، میانگین شاخص‌های آغازگرها و نیز ماتریس شباهت ژنتیکی در جدول‌های ۵ و ۶ ارائه شده است. هر آغازگر به‌طور میانگین تولید ۱۰/۵۱ باند چند شکل کرد. آغازگر ۱۱ بیشترین تولید باند را در بین آغازگرها به خود اختصاص داد و آغازگر ۳ کمترین باند را تولید کرد که نشان می‌دهد آغازگر ۱۱ مکان‌های ژنی بیشتری را نسبت به سایر آغازگرها شناسایی کرده است. همچنین با بررسی شاخص تعداد آلل غالب، آغازگر ۱۱ بیشترین تولید آلل غالب را به‌دست آورد و آغازگر ۳ کمترین تولید آلل غالب را داشته است. دامنه کوچک تغییر آلل‌های مؤثر نشان‌دهنده توزیع نسبتاً برابر آلل‌ها در بین جمعیت‌ها است و این جمعیت‌ها تقریباً در سطح یکنواختی از توزیع آللی قرار دارند. بیشترین تولید آلل مؤثر مربوط به آغازگر ۱ و کمترین آلل مؤثر مربوط به آغازگر ۱۱ بود. یکی از مهمترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی است، آغازگر ۴ با میانگین ۰/۲۷۷ بیشترین مقدار شاخص نی و آغازگر ۱۱ با میانگین ۰/۱۴۸ کمترین

باشند مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی کاملاً متفاوت باشند این مقدار برابر یک می‌شود. آغازگر ۱۱ بیشترین شاخص تثبیت F_{st} را با میانگین ۰/۵۸۷ به دست آورد و آغازگر ۱۰ با ۰/۴۹۰ کمترین مقدار این شاخص را به خود اختصاص داد. مقدار به دست آمده برای شاخص F_{st} در این مطالعه نشان داد که توده‌های مورد مطالعه نسبت به هم دارای تمایز هستند و در بین آنها تلاقی تصادفی و مهاجرت انجام نمی‌شود. این جمعیت‌ها دارای تکامل مستقل هستند و از نظر ساختاری (فراوانی آللی) شباهت چندانی باهم ندارند. میزان شباهت یا تفاوت در بین جمعیت‌ها بر اساس ماتریس تعیین شد. در ارزیابی ماتریس شباهت، بیشترین تشابه ژنتیکی بین جفت توده‌های مبارکه و اردستان مشاهده شده است که به میزان ۰/۹۹ است. کمترین تشابه ژنتیکی مربوط به جفت توده های اردستان و مهیار است که برابر با ۰/۷۱ است (جدول ۶). میزان تشابه یا عدم تشابه ژنتیکی بیانگر قابلیت‌های عملکردی مشابه یا متفاوت و همچنین نزدیکی یا دوری روابط خویشاوندی این توده‌هاست.

و ۰/۲۷۷ به دست آوردند و کمترین مقدار از این نظر مربوط به آغازگر ۱۱ با میانگین ۰/۰۳۷ و ۰/۱۴۷ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب برابر ۰/۰۶۷ و ۰/۰۸۲ به دست آمد. تفاوت بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، اشاره بر فقدان تعادل هاردی-واینبرگ است. سطح هتروزیگوسیتی ژنتیکی (وجود آلل‌های مختلف در یک مکان ژنی) در یک توده از جمله فاکتورهای مهم در برنامه‌های اصلاحی است و بر میزان تنوع ژنتیکی، قابلیت تلاقی و فرایند گزینش موثر می‌باشد. روش‌های زیادی برای محاسبه تفاوت‌های ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها وجود دارد که یکی از آنها محاسبه شاخص F است. شاخص تثبیت F_{is} همبستگی زن‌های افراد درون جمعیت‌ها را نشان می‌دهد و در تمامی آغازگرها منفی می‌باشد و نشان‌دهنده کمبود هموزیگوت‌ها در جمعیت‌هاست. شاخص تثبیت F_{st} همبستگی بین زن‌های افراد مختلف در یک جمعیت یا به عبارت دیگر ساختار و دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در جمعیت‌ها نشان می‌دهد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملاً مشابه

جدول ۵- میانگین شاخص‌های نشانگری آغازگرهای AFLP

Table 5- Means of AFLP primer's markers

آغازگر	تعداد	تعداد	تعداد	شاخص	شاخص	هتروزیگوسیتی	هتروزیگوسیتی	هتروزیگوسیتی	ضریب	جریان	شاخص	شاخص
Primer	آلل غالب Dominant allele	آلل مغلوب Recessive allele	آلل مؤثر Effective allele	نی Nei Index	شانون Shannon Index	مورد انتظار Expected heterozygosity	مشاهده شده Observed heterozygosity	جمعیت کل Total heterozygosity	تمایز ژنی Gene Differential	ژنی Gene Flow	تثبیت Fis Index	تثبیت Fst Index
1	0.442	0.301	0.486	0.270	0.396	0.077	0.092	0.269	0.513	0.179	-0.158	0.442
2	0.354	0.390	0.420	0.248	0.372	0.062	0.075	0.248	0.556	0.132	-0.159	0.558
3	0.351	0.325	0.376	0.217	0.326	0.061	0.074	0.217	0.511	0.180	-0.158	0.535
4	0.326	0.417	0.480	0.277	0.410	0.064	0.077	0.277	0.570	0.115	-0.158	0.572
5	0.406	0.346	0.410	0.236	0.347	0.062	0.077	0.236	0.538	0.153	-0.163	0.545
6	0.392	0.352	0.454	0.265	0.396	0.080	0.097	0.265	0.517	0.173	-0.159	0.518
7	0.383	0.361	0.428	0.254	0.379	0.085	0.103	0.254	0.491	0.199	-0.161	0.494
8	0.422	0.322	0.393	0.227	0.341	0.069	0.084	0.226	0.499	0.196	-0.156	0.516
9	0.361	0.383	0.405	0.239	0.356	0.065	0.079	0.238	0.528	0.161	-0.154	0.539
10	0.387	0.357	0.423	0.247	0.371	0.085	0.103	0.248	0.476	0.240	-0.158	0.490
11	0.541	0.202	0.228	0.148	0.243	0.031	0.037	0.147	0.532	0.162	-0.158	0.587
12	0.483	0.261	0.468	0.258	0.373	0.066	0.080	0.258	0.540	0.150	-0.160	0.552
Mean	0.410	0.335	0.414	0.240	0.359	0.067	0.082	0.240	0.523	0.170	-0.158	0.537

جدول ۶- ماتریس شباهت ژنتیکی بر اساس ضریب تشابه نی

Table 6: Genetic similarity matrix based on Nei similarity coefficient

ژنوتیپ genotypes	افغان	قائمیه	قهباورستان	اردستان	مبارکه	مهیار
Afghan افغان	1					
Ghaemieh قائمیه	0.77	1				
Ghahjavarestan قهباورستان	0.98	0.77	1			
Ardestan اردستان	0.82	0.72	0.98	1		
Mobarakeh مبارکه	0.70	0.71	0.81	0.99	1	
Mahyar مهیار	0.71	0.90	0.72	0.71	0.72	1

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج مربوط به صفات بیوشیمیایی مشخص شد که اعمال تیمارهای ۸۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی منجر به افزایش کاتالاز، پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گردید اما میزان کلروفیل a با اعمال سطوح ۸۰ و ۶۰ کاهش یافت. در همین راستا Rahimi و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش کردند که تحت شرایط تنش، فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم مقاوم به خشکی نسبت به ارقام حساس افزایش بیشتری نشان داد و ارقام متحمل و حساس به تنش خشکی پاسخ‌های فیزیولوژیک متفاوتی داشتند. همچنین Shariat و همکاران (۲۰۱۷) و Salehi و همکاران (۲۰۲۰) نیز به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه به ترتیب مرزه و بابونه در شرایط تنش خشکی اشاره کردند. نتایج Bahral-Ulumi و همکاران (۲۰۱۹) گویای آن است که در تنش خشکی ملایم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و پیامد آن، کاهش آسیب گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است که خود باعث نقش حفاظتی بسیار مؤثری در مراحل فتوسنتزی گیاه می‌گردد.

بر اساس نتایج گروه‌بندی (مبتنی بر صفات بیوشیمیایی) توده‌های ریحان مورد مطالعه، مشخص شد که دو توده اردستان و مبارکه دارای ۹۸ درصد تشابه هستند و توده مهیار نیز دارای ۹۶ درصد تشابه با این دو توده است و توده

بر اساس بررسی محتوای اسانس مشخص شد که در تمام شرایط آبیاری توده افغان بالاترین درصد اسانس را نشان داد، بنابراین این توده به‌عنوان توده با حداکثر درصد اسانس پایدار در شرایط تنش آبی شناسایی می‌شود. بر اساس تحقیقات به‌عمل‌آمده انواع تنش‌ها بر میزان اسانس و ترکیبات اسانس گیاه دارویی ریحان تأثیر مثبت دارد (Ghasemi et al., 2017). گزارش شده که تنش آبی باعث افزایش اسانس و کیفیت مواد معطر در گیاه ریحان شد و همچنین میزان صفات مورفولوژیک را در این گیاه کاهش داد (Rowland et al., 2018). همچنین سایر محققان نیز نتایج مشابهی با این تحقیق مبنی بر تغییرات درصد و اجزای اسانس در پاسخ به تیمارهای تنش رطوبتی در گیاه ریحان گزارش کردند (Zare et al., 2021). بر اساس مطالعه گیل و راندهاوا مشخص شده است که بیشترین میزان اسانس در تراکم گیاهی ۳۰×۳۰ مترمربع به دست می‌آید (Gill & Randhawa, 2000). آراباسی و بای‌رام نیز در پژوهش بر روی ریحان گزارش کرده‌اند که بیشترین میزان اسانس (۰/۸۲۶ درصد بر اساس وزن خشک گیاه) و عملکرد اسانس (۵/۱۶۴ کیلوگرم در هکتار) در شرایط کاشت ۲۰×۲۰ سانتی‌متر مربع به دست آمد (Arabaci & Bayram, 2004).

آغازگرها به خود اختصاص داد و مکان‌های ژنی بیشتری را نسبت به سایر آغازگرها شناسایی کرده است. بر اساس نتایج ماتریس شباهت انجام شده، بیشترین تشابه ژنتیکی بین جفت توده‌های مبارکه و اردستان مشاهده شد که به میزان ۰/۹۹ بود، به‌طورکلی براساس نتایج بدست آمده، استفاده از توده‌های با کمترین تشابه ژنتیکی (اردستان و مهیار) می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی به عنوان والد و تولید نتاج با تنوع ژنتیکی بالاتر استفاده گردد، همچنین توده افغان می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مقاوم به تنش به عنوان والد لحاظ شود.

منابع مورد استفاده

- Abdollahi Mandoulakani, B. A., Eyvazpour, E., and Ghadimzadeh, M., 2017. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry* 139, 1-7.
- Adam, Y. and Hamza, N. B., 2020. Identification of genetic diversity among basil (*ocimum* sp.) accessions collected from africa, europe, asia, and usa. *Biological and Natural Resources Engineering Journal*, 3: 46-54.
- Aebi, H., 1974. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Academic press, 673-684.
- Amaral-Baroli, A., Lago, G., deAlmeida, J. H., Almeida, V. C., TulliusScotti, M., Leone, M. F., Soares, G. G., Cavalari, M. and Sartorelli, A. P., 2016. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (*in vitro*), acclimated (*ex vitro*) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 86: 180-185.
- Arabaci, O., Bayram, E., 2004. The effect of nitrogen fertilization and different plant densities on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil). *Journal of Agronomy*, 3(4): 255-262.
- Arnon, A. N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23:112-121.
- Bahral-Ulumi, S., Raeini Sarjaz, M. and Pirdashti, H., 2019. The effect of drought stress on the activity of enzymatic antioxidants, malondialdehyde, soluble protein and total nitrogen of soybean leaf (*Glycine max* L.). *Environmental stresses in agricultural*

قهجاورستان کمترین شباهت را از لحاظ صفات بیوشیمیایی با سایر توده‌های مورد مطالعه دارد.

در ارزیابی نتایج AFLP ماتریس شباهت بیشترین تشابه ژنتیکی را میان جفت توده‌های مبارکه و اردستان به میزان ۰/۹۹ نشان داد و کمترین تشابه ژنتیکی در جفت توده‌های اردستان و مهیار به میزان ۰/۷۱ بدست آمد. بر اساس نتایج Vafaee و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد که روش AFLP نه تنها توانایی تفکیک و شناسایی گونه‌ها را دارد، بلکه اجازه تفکیک واریته‌های و اکوتیپ‌های مختلف را نیز به خوبی فراهم می‌سازد. نتایج Kaslakheh و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان داد نشانگر AFLP کارایی زیادی در جداسازی توده‌های گونه‌های جنس *Rubus* دارد، بر اساس مقدار شاخص Fst در این مطالعه مشخص گردید که توده‌های مورد مطالعه نسبت به هم دارای تمایز هستند و در بین آنها تلاقی تصادفی و مهاجرت انجام نمی‌شود، این جمعیت‌ها دارای تکامل مستقل هستند و از نظر ساختاری (فراوانی آلی) شباهت چندانی باهم ندارند.

بر اساس نتایج این مطالعه، مشخص شد که بین توده‌های مورد بررسی ریحان تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد که این تنوع ژنتیکی در مواجهه با شرایط محیطی مورد مطالعه اعم از تنش خشکی و تراکم کاشت پاسخ‌های متفاوتی نشان داد. براساس نتایج توده افغان بالاترین درصد اسانس (۲/۵۱ درصد) را نشان داد، همچنین بالاترین میزان کاتالاز، پروکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به توده قهجاورستان و بالاترین مقادیر کلروفیل a و b به توده مبارکه اختصاص داشت. در رابطه با تنش کم آبی مشخص شد که اعمال تیمارهای ۸۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب منجر به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردید اما میزان کلروفیل کاهش یافت. در بخش مربوط به ارزیابی نشانگر، مشخص شد که همه ۱۲ جفت آغازگر AFLP مورد استفاده بر روی DNA تکثیر داشتند. هر آغازگر به‌طور میانگین تولید ۱۰/۵۱ باند چند شکل کرد. آغازگر ۱۱ بیشترین تولید باند را در بین

- Moghaddam, M., Omidbiagi, R. and Naghavi, M. R., 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian accessions of *Ocimum spp.* using AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4-6): 619-626.
- Onofrei, V., Benchennouf, A., Jancheva, M., Loupassaki, S., Ouaret, W., Burducea, M., Lobiuc, A., Teliban, G.-C., and Robu, T., 2018. Ecological foliar fertilization effects on essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivated in a field system. *Scientia Horticulturae*, 239: 104-113.
- Omidbaigi, R., 2000. Production and processing of medicinal plants. Fekr-e-ruz Publication, Tehran, pp. 283.
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., and Cheng, Y., 2021. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. *Frontiers in Plant Science*, 12: 300.
- Rahimi, Z., Panahi, F. and Semarde, A., 2019. Investigation of the effects of drought stress levels on the activity of antioxidant enzymes and some physiological traits in susceptible and drought tolerant wheat cultivars. *Plant production and genetics*, 2: 69-86. (In Persian).
- Rowland, L., Smith, K. and Taylor, G., 2018. The potential to improve culinary herb crop quality with deficit irrigation. *Scientia Horticulturae*, 242: 44-50.
- Salehi Shanjani, P., Rasoulzadeh, L., Fallah Hoseini, L., Ramezani Yeganeh, M., Amirkhani, M., Pahlavani, M., Seyedian, S., and Javadi, H., 2020. 'Morpho-physiological responses of four chamomile species to rainfed conditions and drought stress under greenhouse conditions', *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 28(1): 51-66. (In Persian).
- Sefidkon, F., Akbari, Z., Assareh, M., Bakhshi Khaniki, G., 2007. Comparison of quantity and quality of aromatic compounds from *Rosa damascena* Mill. by different extraction methods. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 22: 351-365.
- Singh, S., Lal, R., Maurya, R., and Chanotiya, C., 2018. Genetic diversity and chemotype selection in genus *Ocimum*. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 9: 19-25.
- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M., and Hadian, J., 2017. 'Variations of physiological indices and metabolite profiling in *Satureja khuzistanica* in response to drought stress', *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic sciences*, 12 (1): 17-28
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), pp.276-287.
- Chaturvedi, T., Kumar, A., Kumar, A., Verma, R.S., Padalia, R.C., Sundaresan, V., Chauhan, A., Saikia, D., Singh, V.R., and Venkatesha, K., 2018. Chemical composition, genetic diversity, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of camphor-basil (*Ocimum kilimandscharicum* Guerke). *Industrial Crops and Products*, 118: 246-258.
- Chowdhury, T., Mandal, A., ChandraRoy, S. and Sarker, D. D., 2017. Diversity of the genus *Ocimum* (Lamiaceae) through morpho-molecular (RAPD) and chemical (GC-MS) analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1): 275-286.
- Fang, X., Nie, Y., Li, J., Wang, C., Huang, K., Zhang, Y. and Yi, Z., 2018. Effects of nitrogen fertilizer and planting density on the leaf photosynthetic characteristics, agronomic traits and grain yield in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). *Field Crops Research*, 219: 160-168.
- Ghasemi, A., Malekpoor, F., Salimi, A. and Golparvar, A., 2017. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *Scientia Horticulturae*, 217: 114-122.
- Ghasemi dehkordi, N. 2014. Indicative medicinal plants in medicine and industry. Chahar Bagh Publication, Isfahan, pp. 394.
- Gill, B., and Randhawa, G., 2000. Effect of different row and plant spacing on yield and quality of French Basil oil. *Journal of Research Punjab Agricultural University*, 36: 1991-1993.
- Hussein, R.A., El-Anssary, A.A. 2019. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1-13.
- Kaslakheh, R., Jorjani, A. and Habibim, A., 2019, Investigation of genetic diversity of raspberry species (*Rubus spp.*) In Golestan province using AFLP marker. *Taxonomy and biosystematics*, 11(38): 91-110
- Kochba, J., Lavee, S. and Spiegel-Roy, P., 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant and Cell Physiology*, 18(2), 463-467.

- Investigation of genetic diversity of Iranian garlic masses (*Allium sativum* L.) using morphological traits and AFLP molecular markers. Horticultural Sciences of Iran, 40 (1): 12-16. (In Persian).
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research, 23(21): 4407-4414.
 - Zare, M., Ganjeali, A. and Lahouti, M., 2021. Rosmarinic and caffeic acids contents in Basil (*Ocimum basilicum* L.) are altered by different levels of phosphorus and mycorrhiza inoculation under drought stress. Acta Physiologiae Plantarum, 43(2): 1-10.
 - Research, 25(2): 232-246. (In Persian).
 - Soleymani, A. 2017. Light response of sunflower and canola as affected by plant density, plant genotype and N fertilization. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 173: 580-588.
 - Sundararajan, B., Moola, A.K., Vivek, K., and Kumari, B.R., 2018. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). Microbial pathogenesis, 125: 475-485.
 - Swarup, S., Cargill, E. J., Crosby, K., Flagel, L., Kniskern, J. and Glenn, K. C., 2021. Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops. Crop Science, 61(2): 839-852.
 - Vafae, Y., Dashti, F., and Ershadi, A., 2008.

Evaluation of genetic and biochemical variation in six basil (*Ocimum basilicum* L.) populations

R. Shabahang¹, D. Samsampoor^{2*}, H. Zeinali³, M. Ebrahimi⁴, A. Farhadi⁵

- 1- Ph.D. Graduated, Dept. Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Hormozgan University, Bandar Abbas I.R. Iran
2*- Corresponding author, Assoc. Prof. Dept. Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran. I.R. Iran, E-mail: samsampoor@hormozgan.ac.ir
3- Assoc. Prof. Agricultural Research and Education Center and Natural Resources of Isfahan Province Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, I.R. Iran
4- Assist. Prof. Agricultural Biotechnology Research Institute of Isfahan Province Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, I.R. Iran
5- Assist. Prof. Agricultural Research and Training Center and Natural Resources of Isfahan Province Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, I.R. Iran

Received: 19.02.2022

Accepted: 23.06.2022

Abstract

The success of plant breeders depends on the genetic diversity amount in plants and their wild relatives. Awareness of genetic distance and similarity makes it possible to organize hereditary reserves, effective sampling of genotypes, and better use of diversity. This research was carried out to study the genetic diversity of six basil populations (*Ocimum basilicum* L.) and to evaluate their biochemical response to low irrigation and two densities in the greenhouse of the Agricultural and Natural Resources Research Center, Isfahan, Iran using a factorial experiment based on completely randomized design with three replications. Basil populations as Afghan (green), Ghaemieh (violet), Qahjavaristan (green), Ardestan (green), Mobarakeh (green), and Mahyar (violet) were sown in two densities of 6.6 and 20 plants/m² in row distance at 50 cm with plant distance of 30 cm (equal to 6.6 plants/m²) and 10 cm (equal to 20 plants/m²). Drip irrigation was performed using evaporation pan in the form of three treatments of 60, 80 and 100% of field capacity (FC). In addition, 12 pairs of AFLP primers were used to study genetic diversity. According to the results obtained in all the irrigation conditions, the Afghan population showed the highest percentage of essential oil. Among the populations, the highest amounts of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase were belonged to the Qahjavaristan with the values of 0.62, 0.44 and 0.53 $\mu\text{mol.m}^{-1}/\text{FW}$, respectively. The highest amounts of chlorophyll a and b (1.49 and 0.76 mg/g FW) were belonged to the Mobarakeh. Regarding dehydration stress, it was found that the application of 80 and 60%FC led to an increase of 4% and 19% of catalase, 6% and 22% of peroxidase and 5% and 20% of superoxide dismutase, respectively. In general, the Afghan population showed the highest stress-tolerance level. Based on the analysis of AFLP results, each primer produced an average of 10.51 polymorphism bands, and primer 11 had the highest band production among the primers. Based on the genetic similarity matrix, the highest genetic similarity between Mobarakeh and Ardestan populations was at the rate of 0.99. The lowest genetic similarity (0.71) was related to Ardestan and Mahyar populations. Totally, populations with the least genetic similarity (Ardestan and Mahyar) could be used as parents in breeding programs, which leads to progeny with higher genetic diversity. The Afghan population can also be considered as parent in stress-resistant breeding programs.

Keywords: Essential oil, stress, genetic diversity, second metabolite.