

Genetic diversity analysis of *Grammosciadium platycarpum* populations using ISSR markers

Fatemeh Dehghan Rafi¹, Ghasem Eghlima^{*2}, Mohammad Hossein Mirjalili³, Ali Sonboli⁴

1- M.Sc. student, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

3- Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

4- Professor, Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: gh_eghlma@sbu.ac.ir

(Received: 19 November 2025

Revised: 27 December 2025

Accepted: 5 January 2025)

Extended Abstract

- 1. Introduction:** The genus *Grammosciadium* of the Apiaceae family has nine species, of which three species, *G. pterocarpum*, *G. platycarpum*, and *G. scarbridu*, grow in Iran which grow in most temperate or cold temperate regions and in mountain pastures. *G. platycarpum* is a perennial plant with a height of 40 to 100 cm, which is known as mountain parsley or mountain dill and is distributed in Iran, Turkey, Iraq, and Armenia. It is used as an infusion to reduce fat and blood sugar, and as Vegetables are, consumed raw and cooked in some regions of Iran. It has a pleasant taste and smell and is used as a vegetable and food additive in different regions in spring. Since wild and medicinal plants usually have weak and uneven germination, the use of methods to improve germination can have a positive effect on improving the production of these plants. Due to the high percentage of linalool in its essential oil, *G. platycarpum* is considered a valuable and promising source for the extraction and commercial purification of this compound, the demand for which is increasing across various industries. At present, industrial requirements for this plant are largely met through harvesting from natural habitats, an unsustainable practice that poses the risk of population decline and even local extinction. Consequently, the collection, identification, and characterization of native genotypes represent essential steps toward the conservation and genetic improvement of this species. In plant breeding, precise knowledge of genetic diversity provides the foundation for selecting desirable parents, while population-level studies facilitate the effective utilization of unique populations in breeding programs and support the long-term preservation of genetic resources. Therefore, assessing genetic diversity is critical for developing informed conservation and breeding strategies. In this study, the genetic diversity of several populations of this species was evaluated using ISSR markers.
- 2. Materials and Methods:** In the initial phase of the study, potential habitats of *G. platycarpum* were identified using available flora references and through field surveys in surrounding regions. Fourteen populations of *G. platycarpum* (three individuals per population) were sampled. For each individual, a leaf sample was collected using a sterile blade, wrapped in aluminum foil, and immediately placed in liquid nitrogen. The samples were then transferred to a -80 °C freezer for storage before DNA extraction. DNA was extracted from all samples, and its quantity and quality were assessed using both a spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. Seven primers were selected for DNA amplification. The polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a final reaction volume of 15 µL using a thermocycler. For separation of PCR products, a 1.5% agarose gel was employed. After electrophoresis, gels were photographed for band detection. The banding patterns were scored in a binary matrix, with polymorphic bands recorded as "1" (presence) and "0" (absence). To calculate the similarity matrix, the SimQual procedure was applied. Similarity coefficients were generated using three methods: Simple Matching, Dice, and Jaccard. For clustering, the SAHN procedure with the UPGMA algorithm was employed using NTSYS software (version 2.02). The cophenetic correlation coefficient was used to evaluate the efficiency of the clustering algorithm and to determine the most appropriate similarity coefficient for analysis.
- 3. Results and Discussion:** A considerable level of genetic diversity was observed among the individuals based on ISSR markers. In total, 34 bands were generated, of which 31 were polymorphic. The average percentage of polymorphism among the studied populations was calculated as 91.53%. The highest polymorphism percentages were obtained from primers IS4, IS13, IS15, and IS23. The mean PIC and MI

values for the evaluated primers were 0.33 and 1.33, respectively. Shannon's information index (I) ranged from 0.090 to 0.333 across populations, while Nei's genetic diversity index (h) varied between 0.058 and 0.228. Overall, the OSH (Oshnavich) population exhibited the lowest genetic diversity, whereas the MAH (Mahabad) population showed the highest diversity. The mean number of observed alleles and effective alleles per locus were calculated as 1.228 and 0.821, respectively. Cluster analysis using the UPGMA method and Jaccard similarity coefficient grouped the individuals from different populations into three major clusters.

4. **Conclusion:** The results of this study demonstrated that the high level of polymorphism observed indicates the effective performance of ISSR markers in assessing the genetic diversity of *G. platycarpum* populations. Therefore, these markers can serve as valuable tools for evaluating genetic variation and supporting plant breeding programs. One of the primary goals of plant breeders is the preservation of genetic resources, as higher genetic diversity enhances resistance to pests and diseases and ultimately contributes to species survival. Given that the investigation of genetic relationships is essential for plant breeding as well as for the conservation of genetic resources, the findings of this study revealed considerable genetic diversity among the examined populations, suggesting that appropriate measures can be implemented for conservation and breeding efforts in this species. Since breeding programs require substantial genetic variation among populations, the diversity identified in the studied populations can significantly support and advance future breeding initiatives.

Keywords: Breeding; Genetic diversity; Populations; *G. platycarpum*; ISSR.

Citation: Dehghan Rafi, F., Eghlima, G., Mirjalili, M. H., & Sonboli, A. (2026). Genetic diversity analysis of *Grammosciadium platycarpum* populations using ISSR markers. *Journal of Vegetables Sciences*, 19(1), 227-240. doi:10.22034/iuvs.2025.2078370.1430

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).



بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شوید کوهی (*Grammosciadium platycarpum*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

فاطمه دهقان رفیع^۱، قاسم اقلیما^{۲*}، محمد حسین میرجلیلی^۳، علی سنبللی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

۲- استادیار گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

۳- استاد گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

۴- استاد گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: gh_eghlima@sbu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

چکیده

شوید کوهی (*Grammosciadium platycarpum*) از خانواده چتریان، گیاهی غنی از اسانس است، که علاوه بر استفاده در طب سنتی جهت کاهش چربی و قند خون در بعضی از مناطق ایران به عنوان سبزی معطر مصرف غذایی دارد. در این بررسی برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۴ جمعیت (از هر جمعیت ۳ فرد) شوید کوهی (*Grammosciadium platycarpum*) از نشانگر مولکولی ISSR استفاده شد. تعداد هفت آغازگر برای تکثیر قطعات DNA ژنومی جمعیت‌های شوید کوهی استفاده شد. تنوع ژنتیکی مطلوبی براساس نشانگر ISSR در بین افراد مشاهده شد. در کل ۳۴ باند تشکیل شد و ۳۱ باند دارای چندشکلی بودند. میانگین درصد چند شکلی برای آغازگرهای مطالعه شده برابر ۹۱/۵۳ محاسبه شد. بیشترین درصد چند شکلی به IS4، IS13، IS15 و IS23 آغازگرهای اختصاص داشت. میانگین PIC و میانگین MI در آغازگرهای بررسی شده به ۰/۳۳ و ۱/۳۳ ترتیب بود. شاخص اطلاعاتی شانون (I) در سطح جمعیت‌ها بین ۰/۰۹۰ تا ۰/۳۳۳ و شاخص تنوع ژنی نی (h) بین ۰/۵۸ تا ۰/۲۲۸ متغیر بود، که در کل جمعیت OSH (اشنویه) کمترین تنوع ژنتیکی و MAH (مهاباد) بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده و موثر در هر مکان ژنی به ترتیب ۱/۲۸۸ و ۰/۸۲۱ محاسبه گردید. افراد جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGAM و ضریب تشابه جاکارد در سه گروه اصلی گروه‌بندی شدند. نتایج حاصل نشان داد که نشانگر ISSR سیستم نشانگری قابل اطمینان برای آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و می‌توان از آن در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در شوید کوهی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اصلاح، تنوع ژنتیکی، جمعیت، شوید کوهی، ISSR

استناد: دهقان رفیع، ف.، اقلیما، ق.، میرجلیلی، م.ح. و سنبللی، ع. (۱۴۰۵). بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شوید کوهی (*Grammosciadium platycarpum*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، علوم سبزی‌ها، ۱۹(۱)، ۲۴۰-۲۲۷.

حق چاپ:



حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل دسترس است.

مقدمه

برای قرن‌ها، انسان‌ها برای تأمین نیازهای اساسی خود از جمله تغذیه، درمان و حفظ سلامت، به گیاهان متکی بوده‌اند (Karunamoorthi et al., 2013). در میان آن‌ها، گیاهان دارویی و خوراکی به دلیل دارا بودن مجموعه‌ای متنوع از ترکیبات فعال زیستی (فیتوشیمیایی‌ها)، به عنوان منابع مهم ترکیبات درمانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Frumuzachi et al., 2025). با این حال، میزان ترکیبات فیتوشیمیایی در گیاهان می‌تواند تحت تأثیر عوامل گوناگونی از جمله ویژگی‌های ژنتیکی، شرایط محیطی، موقعیت جغرافیایی، خصوصیات خاک، اقلیم، ارتفاع از سطح دریا و حتی مرحله رشد گیاه دچار تغییر شود (Ogwu et al., 2025). چنین تغییرپذیری‌هایی می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر پروفایل شیمیایی و ویژگی‌های عملکردی عصاره‌های گیاهی بر جای گذارد. اسانس‌ها، ترکیبات فرار اصلی موجود در گیاهان معطر و دارویی هستند که در بافت‌ها و لندام‌های مختلف گیاه تجمع می‌یابند (Nazari et al., 2024). این مخلوط‌های پیچیده عمدتاً از هیدروکربن‌ها تشکیل شده‌اند که بر اساس ویژگی‌های ساختاری خود به ترپن‌ها، الکل‌ها، استرها، آلدئیدها، کتون‌ها و مشتقات فنولی تقسیم‌بندی می‌شوند (Bilia et al., 2014). در میان این ترکیبات، ترپن‌ها بزرگ‌ترین گروه از ترکیبات طبیعی را تشکیل داده و نقش کلیدی در ایجاد عطرهای متمایز گل‌ها و میوه‌ها ایفا می‌کنند (Ilc et al., 2016). یکی از زیرگروه‌های مهم این خانواده، مونوترپن‌ها هستند که به دلیل فعالیت‌های زیستی متنوع خود، از جمله خواص ضدالتهابی، ضددرد و ترمیم زخم، کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی، آرایشی و دارویی دارند (Li et al., 2024). یکی از برجسته‌ترین ترکیبات این گروه، لینالول است که یک الکل مونوترپن خطی بوده و به‌طور فراوان در روغن‌های اسانسی گیاهان یافت می‌شود (Raguso, 2016). لینالول دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی و زیستی از جمله اثرات ضد میکروبی، ضدالتهابی،

ضددرد، ضدسرطانی، ضدافسردگی، ضداضطراب و محافظت عصبی است (Pereira et al., 2018). به دلیل این چندکارکردی بودن، این ترکیب توجه زیادی را برای کاربرد در محصولات درمانی، آرایشی و بهداشتی، ادکلن‌سازی به خود جلب کرده است (Amiri et al., 2016). در محصولات تجاری، لینالول رایحه‌ای خوشایند و خوشبو ایجاد می‌کند و از این رو به‌طور گسترده در عطرها، شامپوها، مواد شوینده و به عنوان افزودنی‌های طعم‌دهنده در مواد غذایی و محصولات آرایشی-بهداشتی به کار می‌رود (Aprotosoiaie et al., 2014).

گیاه *Grammosciadium platycarpum* که در ایران با نام شوید کوهی یا جعفری کوهی شناخته می‌شود، گیاهی است چندساله با ارتفاع ۴۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر از خانواده چتریان (*Apiaceae*) که در کشورهای ایران، ترکیه، عراق و ارمنستان پراکنش دارد، به عنوان دمنوش برای کاهش چربی و قند خون استفاده می‌شود و به عنوان سبزی به صورت خام و پخته شده در بعضی از مناطق ایران مصرف خوراکی دارد (Lotfi et al., 2024). میوه‌های این گونه حاوی ۰/۸۱ تا ۱/۶۳ درصد اسانس هستند که در آن لینالول (۶۵/۹۰-۸۱/۶۲ درصد) و لیمونن (۹/۷۳-۱۵/۳۴) به عنوان ترکیبات غالب شناسایی شده‌اند (Eghlima et al., 2025a). به دلیل درصد بسیار بالای لینالول در روغن اسانسی آن، شوید کوهی به عنوان منبعی بالقوه و ارزشمند برای استخراج و خالص‌سازی تجاری این ترکیب مطرح است که در صنایع مختلف تقاضای فزاینده‌ای دارد. در حال حاضر، نیازهای صنعتی مربوط به این گیاه عمدتاً از طریق برداشت از رویشگاه‌های طبیعی تأمین می‌شود، که روشی ناپایدار بوده و خطر کاهش جمعیت و حتی انقراض موضعی را در پی دارد (Eghlima et al., 2025b). از این‌رو، جمع‌آوری، شناسایی و توصیف ژنوتیپ‌های بومی، گامی حیاتی در جهت حفاظت و بهبود ژنتیکی این گونه به شمار می‌رود. در اصلاح نباتات، آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی، مبنایی برای انتخاب والدین مطلوب فراهم می‌آورد و

جمعیت‌های این گونه با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه اولیه با استفاده از اطلاعات موجود در فلور و نیز با مراجعه به مناطق مختلف پیرامون، ریشگاه‌های مختلف شوید کوهی در سال ۱۴۰۳ شناسایی گردید. چهارده جمعیت شوید کوهی (از هر جمعیت ۳ گیاه به فاصله ۱۰۰ متر (Bakhtiar *et al.*, 2024) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱ و جدول ۱). از هر گیاه نمونه برگی با استفاده از تیغ استریل تهیه شد و درون فویل آلومینیومی و سپس در ازلت مایع قرار گرفت. پس از آن نمونه‌ها به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند و استخراج دی‌ان‌ای انجام گرفت (Doyle & Doyle, 1987) و از دو روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد. هفت آغازگر برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات و توالی این آغازگرها در جدول ۲ ارائه شده است. واکنش زنجیره پلی‌مرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام پذیرفت. چرخه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۸ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بین ۵۲-۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. به منظور تفکیک محصول پی‌سی آر، از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از تهیه عکس از ژل که برای آشکارسازی محصول پی‌سی‌آر انجام شد.

تحلیل آماری

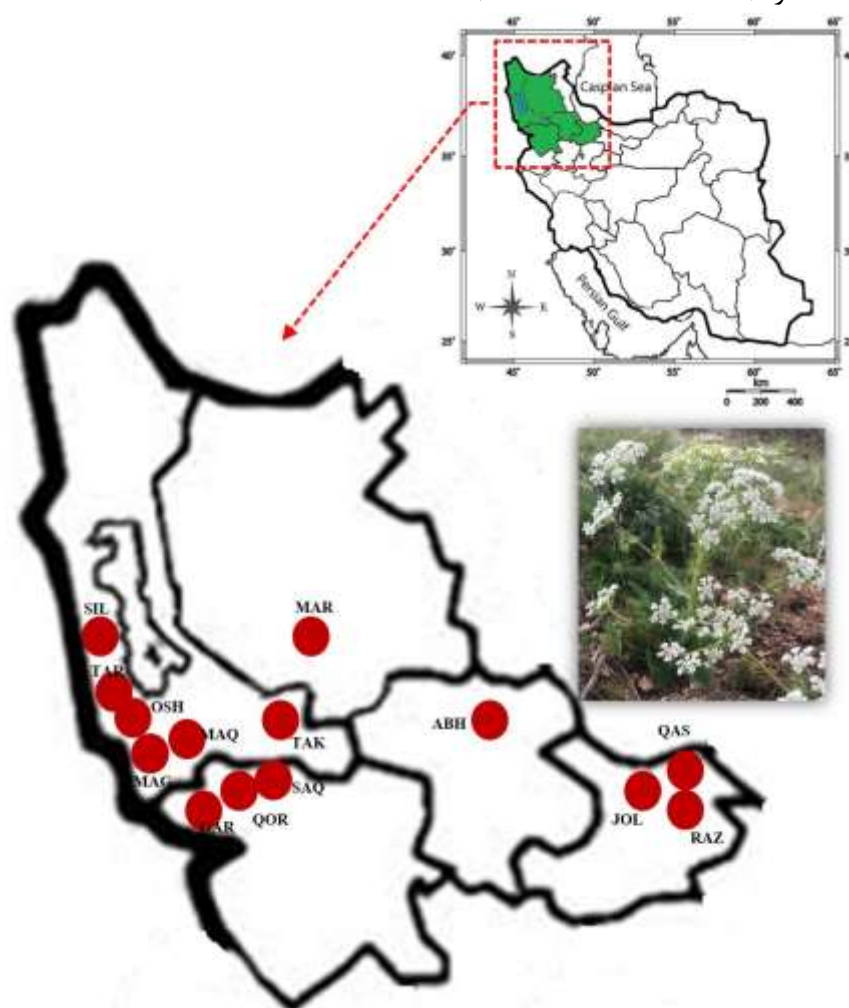
اطلاعات به دست آمده از ژل‌ها در الکتروفورز در قالب ماتریسی از صفر و یک تنظیم شدند. باندهایی که چندشکلی نشان دادند به صورت یک و صفر (برای

مطالعات در سطح جمعیت امکان بهره‌گیری مؤثر از جمعیت‌های منحصربه‌فرد را در برنامه‌های به‌نژادی فراهم کرده و به حفظ بلندمدت ذخایر ژنتیکی کمک می‌کند. بنابراین، ارزیابی تنوع ژنتیکی برای تدوین راهبردهای حفاظتی و اصلاحی ضروری است (Kumar *et al.*, 2025). یکی از نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در مطالعات تنوع ژنتیکی، ISSR (Inter simple Sequence Repeat) است که بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) عمل می‌کند. نشانگر ISSR یکی از تکنیک‌های نشانگر مولکولی پرکاربرد در ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی است و در آن از توالی‌های ریزماهوره‌ها به عنوان آغازگر برای تولید نشانگرهای چند شکل استفاده می‌شود. این نشانگر به عنوان ابزاری قدرتمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان تاکسون‌های نزدیک به هم و شناسایی شباهت‌های ژنوتیپی بین ژنوتیپ‌ها، جمعیت‌ها، واریته‌ها، ارقام و گونه‌ها شناخته می‌شود (Shakoor *et al.*, 2022; Alzahrani *et al.*, 2023; Jamshidnia *et al.*, 2023). ISSR‌ها مزایای متعددی از جمله تکرارپذیری بالا، توانایی تشخیص طیف وسیعی از چندشکلی‌ها در سراسر ژنوم و مقرون به صرفه بودن آن‌ها، به ویژه در گونه‌هایی با منابع ژنومی محدود، ارائه می‌دهند و نیازی به توالی‌یابی ژنومی قبلی ندارند (Gebremichael *et al.*, 2025). نشانگرهای ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف از جمله شیرین بیان (Eghlima *et al.*, 2021)، خارمریم (Jamshidnia *et al.*, 2023)، شاه توت (Alan *et al.*, 2025) مورد استفاده قرار گرفته اند. شوید کوهی پراکنش وسیعی در ایران داشته که نشان از سازگاری بالای آن با اغلب شرایط آب‌وهوایی ایران می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد که شناخت پتانسیل‌های دارویی این گیاه و نیز بررسی تنوع ژنتیکی آن، زمینه فرآیند اهلی‌سازی و کشت و کار را فراهم می‌سازد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی برخی از

برای همه آغازگرها از رابطه $MI = PIC \times N \times \beta$ محاسبه شد، که PIC ، محتوای اطلاعات چندشکلی؛ N ، تعداد کل نوارها و β ، درصد چندشکلی برای هر آغازگر است. مقدار RP (Resolving Power) نیز برای هر آغازگر از رابطه $RP = \sum I_b$ که میزان I_b از رابطه $I_b = 1 - (2|0.5 - P_i|)$ محاسبه شد که در این رابطه، P_i درصد فراوانی یک آلل از هر نوار است (Pawell *et al.*, 1996). همچنین ماتریس فاصله براساس تحلیل نی انجام شد (Nei, 1973). در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل‌های موثر (N_e)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I : Shanon's Information Index) برای هر یک از جمعیت‌ها با نرم‌افزار GenAlex نسخه ۶.۳ محاسبه شد.

حضور و عدم حضور) امتیازبندی شدند. برای محاسبه و تشکیل ماتریس تشابه از رویه SimQual و ایجاد این ماتریس به روش جاکارد و برای گروه‌بندی از رویه SAHN به روش UPGMA نرم‌افزار ان‌تی‌سیس سری ۲/۰۲ استفاده شد. با استفاده از ضریب کوفنتیک، ضریب تشابه مناسب انتخاب گردید. جهت تعیین کارایی الگوریتم مورد استفاده و میزان برازش خوشه‌بندی از ضریب کوفنتیک که با نرم‌افزار ان‌تی‌سیس محاسبه گردید، استفاده شد.

محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها ($PIC =$ Polymorphism Information Content) با فرمول $PIC = 1 - \sum p_i^2$ محاسبه شد. در این رابطه، P_i برابر با آلل نام هر جایگاه ژنی برای همه ژنوتیپ‌ها است. همچنین شاخص نشانگر ($MI =$ Marker Index)



شکل ۱- نقشه توزیع چهارده جمعیت شوید کوهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران.

Figure 1. Distribution map of the fourteen populations of *Grammosciadium platycarpum* collected across Iran.

جدول ۱ - اطلاعات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های شوید کوهی

Table 1. Geographical information for the collection regions of *Grammosciadium platycarpum* populations.

محل Location	کد Code	کد هرباریومی Voucher number	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع (متر) Altitude (m)	میانگین دمای سالانه (°C) Mean annual temperature (°C)	میانگین بارش سالیانه (میلی‌متر) Mean annual precipitation (mm)
Kurdistan, Saqqez, Tamgoogheh	SAQ	MPH-3245	46°08'	36°13'	1845	11.5	487
Kurdistan, Baneh, Qureh Darreh	QOR	MPH-3246	46°02'	37°07'	1641	14.2	565
Kurdistan, Baneh, Gardaneh Khan	GAR	MPH-3247	45°59'	36°05'	1832	14.0	684
West Azerbaijan, Mahabad, Qarah Bolagh	MAQ	MPH-3248	45°59'	36°37'	1894	12.0	387
West Azerbaijan, Mahabad, Gavmishan	MAG	MPH-3249	45°50'	36°23'	1840	12.5	392
West Azerbaijan, Urmia, Tergever	TAR	MPH-3250	45°03'	37°10'	2103	13.1	343
West Azerbaijan, Urmia, Silvaneh	SIL	MPH-3251	44°49'	37°25'	2059	13.5	300
West Azerbaijan, Oshnavieh, Ganj Abad	OSH	MPH-3252	45°09'	37°07'	1829	13.3	387
West Azerbaijan, Tekab, Pichaqchi	TAK	MPH-3253	46°47'	36°37'	1982	10.2	348
East Azerbaijan, Maragheh, Yayshahr	MAR	MPH-3254	46°20'	37°34'	2009	13.5	335
Zanjan, Abhar, Kalleh Khaneh	ABH	MPH-3255	49°20'	36°18'	1858	10.5	535
Qazvin, Razjerd	RAZ	MPH-3256	50°11'	36°22'	2199	13	323
Qazvin, Gostin Lar	QAS	MPH-3257	50°14'	36°24'	2234	13.5	340
Qazvin, Jolfadeh	JOL	MPH-3258	50°08'	36°28'	2026	13.2	362

جدول ۲- لیست آغازگرهای ISSR مورد استفاده به همراه توالی و دمای اتصال ($R = A/T$, $Y = G/C$).

Table 2. List of ISSR primers used with sequence and connection temperature

ISSR Primers	Sequence توالی	Annealing temperature (°C) دمای اتصال (°C)
IS4	CACACACACACACACAG	52
IS5	ACACACACACACACACG	52
IS13	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	49
IS15	ACACACACACACACACYG	49
IS20	HYHTCCTCCTCCTCCTCCTCC	52
IS23	CTCCTCCTCCTCRC	49
UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYA	52

H و Y نشان دهنده نوکلئوتیدهای غیر اختصاصی هستند که در برخی آغازگرها استفاده می شوند.

Y and H represent degenerate bases used in some of the primers.

نتایج و بحث

محاسبه شاخص‌های مولکولی

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شوید کوهی با استفاده از ۷ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۷ آغازگر ISSR تعداد ۳۴ باند حاصل گردید که ۳۱ باند (۹۱/۵۳ درصد) چند شکل بودند. دامنه باندهای چند شکل بین ۳ (UBC849) تا ۶ (IS5) با میانگین ۴/۴۲ باند چندشکل متغیر بود. درصد باندهای چندشکل نیز بین ۷۵ (UBC849) تا ۱۰۰ درصد (IS4، IS13، IS15 و IS23) به دست آمد (جدول ۳). چندشکلی نقش محوری در ارزیابی تنوع ژنتیکی ایفا می‌کند. این یافته‌ها با مطالعات قبلی که اثربخشی نشانگرهای ISSR را در تشخیص تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی نشان داده‌اند، همسو است (Khazaie et al., 2024; Gebremichael et al., 2025). سطوح بالای چندشکلی مشاهده‌شده، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجه در نمونه‌های مورد تجزیه و تحلیل است، عاملی که به طور گسترده در مطالعات مربوط به انگشت‌نگاری ژنتیکی و ژنتیک جمعیت گزارش شده است (Kumar et al., 2020). چنین تنوع ژنتیکی به ویژه برای کاربردهایی مانند برنامه‌های اصلاح نژاد، ژنتیک حفاظت و تحقیقات تکاملی مفید است.

میزان EMR برابر با ۴/۰۸ و میانگین هتروزوگوسیتی برای بلندهای پلی مورف (Hav-p) ۰/۳۳ به دست آمد. EMR های بالاتر، اثر بخشی

سیستم نشانگر را برای مطالعات متمرکز بر تنوع نشان می دهد (Akhtar et al., 2021). شاخص نشانگری (MI) یک معیار برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چند شکلی می باشد. شاخص نشانگر (MI) برآوردی مناسب از کارایی آغازگرها است که به تعداد نوارهای چندشکلی به دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می شود (Akhtar et al., 2021). زیاد بودن شاخص نشانگر، بیان کننده فراهم کردن اطلاعات بیشتر، از ژنوم باتوجه به تولید تعداد بیشتر نوار چندشکلی است. شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک (Rp) محاسبه شد تا توانایی نشانگرهای ISSR را در تمایز جمعیت های شوید کوهی نشان دهد. میانگین شاخص نشانگر در جمعیت های مورد مطالعه ۱/۳۳ به دست آمد که بیشترین آن (۱/۹۳) در آغازگر IS13 و کمترین آن (۰/۸۲) در آغازگر IS20 مشاهده شد. قدرت تفکیک بین ۱/۵۷ برای IS23 تا ۳/۱۹ برای IS5 و میانگین قدرت تفکیک تمام نشانگرها ۲/۲۸ به دست آمد. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (Rp) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای نوار و هم از تعداد آلل تأثیر می پذیرد. قدرت تفکیک، شاخصی است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می دهد (Kayis et al., 2010). توانایی یک آغازگر در تمایز بین ژنوتیپ های بالاتر را می توان با قدرت تفکیک نشان داد. قدرت تفکیک ابزاری برای اندازه گیری ظرفیت آغازگر در تمایز بین نمونه های

گردید که این نسبت از دامنه ۰/۳۷۷ تا ۰/۹۸۰ و با میانگین ۰/۶۸۵ متغیر بود (جدول ۴). هرچه این نسبت به یک نزدیکتر باشد نشان‌دهنده یکنواختی گونه مورد نظر است (Akhtar *et al.*, 2021).

شاخص اطلاعاتی شانون (I) در سطح جمعیت‌ها بین ۰/۰۹۰ تا ۰/۳۳۳ و میانگین ۰/۱۹۸ و شاخص تنوع ژنی نی (He) بین ۰/۰۵۸ تا ۰/۲۲۸ و با میانگین ۰/۱۳۳ بود، که در کل جمعیت OSH کمترین تنوع ژنتیکی و جمعیت MAH بیشترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند (جدول ۴). بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت‌ها پیچیدگی‌هایی دارد. این پژوهش‌ها به تعداد افراد بررسی شده در هر جمعیت، تعداد مکان‌های آللی در هر جمعیت، موقعیت آللی و ژنوتیپی جمعیت، نوع تلاقی و اندازه جمعیت بستگی دارد (Latifi *et al.*, 2018). ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های وحشی، اطلاعاتی در مورد توانایی افراد در مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی ارائه می‌دهد (Pourkhaloe *et al.*, 2018). همچنین، مطالعات تنوع در یک برنامه اصلاح نژاد می‌تواند امکان توسعه گونه‌های بسیار پربازده و مقاوم در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی را فراهم کند (Wang *et al.*, 2015). مشابه نتایج این پژوهش، تنوع درون جمعیتی بالایی با استفاده از آغازگرهای ISSR در مطالعات *Rheum tanguticum* (Hu *et al.*, 2010)، *Satureja khuzistanica* (Hadian *et al.*, 2017)، *S. rechingeri* (Hadian *et al.*, 2014) و *Thymus daenensis* (Heydari *et al.*, 2019) مشاهده شده است. یکی از عوامل اصلی در تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی، سیستم گرده افشانی است. تنوع ژنتیکی به گیاه اجازه می‌دهد تا با شرایط محیطی سازگار شود و طیف وسیع‌تری از انتخاب را در اختیار اصلاح‌گر قرار می‌دهد (Heydari *et al.*, 2019).

مختلف است. آغازگرهایی با مقادیر قدرت تفکیک بالاتر معمولاً عملکرد بهتری در تمایز بین ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهند (Pe'rezdel *et al.*, 2012).

برای هر آغازگر میانگین نسبت جمعیت‌های دارای بلند آگاهی بخش (mp) و میانگین بلند آگاهی دهنده (mlb) نیز در جدول ۳ آورده شده است. شاخص محتوای چندشکلی (PIC)، یکی از شاخص‌های مهم مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها است. مقادیر زیاد این شاخص، دلیل بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد (Thimmappaiah *et al.*, 2009). مقادیر اطلاعات چندشکلی از صفر تا یک متغیر هستند و میزان بیشتر این شاخص نشان‌دهنده قابلیت بالای آغازگر مورد استفاده در غربالگری ژنوتیپ‌ها می‌باشد (Serrote *et al.*, 2020). محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) در نشانگرهای ISSR بین ۰/۲۵ (IS20) تا ۰/۳۹ (IS23 و UBC849) و با میانگین ۰/۳۳ متغیر بود. محتوای اطلاعات چند شکل تأیید می‌کند که جایگاه‌های ISSR به کار رفته برای شناسایی تغییرات ژنوتیپی بسیار آموزنده هستند (Maclean, 2013). این نتیجه با یافته‌های گزارش‌شده در مطالعات قبلی مطابقت داشت (Khaled *et al.*, 2015; Khazaie *et al.*, 2024).

محاسبه شاخص‌های ژنتیک جمعیت

در بین جمعیت‌های وحشی شوید کوهی، درصد مکان‌های ژنی پلی مورف بین ۱۷/۶۵ تا ۶۱/۷۶ و با میانگین ۳۵/۲۹ درصد مشاهده شد. میزان تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) در هر مکان ژنی بین ۱/۰۹۱ تا ۱/۴۰۹ و با میانگین ۱/۲۲۸ بود. تعداد آلل‌های موثر (Ne) در هر مکان ژنی بین ۰/۴۱۸ تا ۱/۳۸۲ و میانگین ۰/۸۲۹ محاسبه گردید (جدول ۴). با توجه به این موضوع میزان یکنواختی هر یک از جمعیت‌ها از طریق محاسبه نسبت تعداد آلل‌های مؤثر به تعداد آلل‌های مشاهده شده (Ne/Na) تعیین

جدول ۳- نتایج آغازگرها و جزئیات مربوط به الگوهای باندهای به دست آمده از آنالیز ISSR در جمعیت‌های شوید کوهی.

Table 3. Primer results and details of banding patterns obtained from ISSR analysis in *Grammosciadium platycarpum* populations.

ISSR Primer نشانگر ISSR	Sequence (5'→3') توالی (5'→3')	Total number of bands تعداد کل باندها	Number of polymorphic bands تعداد باندهای چند شکل	Polymorphism (%) درصد چند شکلی	mI میانگین باند آگاهی دهنده	mPIC محتوای اطلاعات چندشکلی	Rp قدرت تفکیک	EMR	MI
IS4	GTCTCTCTCTCTCTCTG	5	5	100.00	0.46	0.31	2.33	5.00	1.59
IS5	CACACACACACACACAG	7	6	85.71	0.45	0.28	3.19	5.14	1.47
IS13	AGAGAGAGAGAGAGYT	5	5	100.00	0.57	0.38	1.85	5.00	1.93
IS15	ACACACACACACACYG	5	5	100.00	0.44	0.30	2.23	5.00	1.52
IS20	HVHTCCTCCTCCTCCTCC	5	4	80.00	0.39	0.25	1.95	3.20	0.82
IS23	CTCCTCCTCCTCRC	3	3	100.00	0.64	0.39	1.57	3.00	1.07
UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGYA	4	3	75.00	0.64	0.39	2.57	2.25	0.89
Total		34	31						
Average		4.85 ^{MR}	4.42 ^{EMR}	91.53	0.51	0.33 ^a	2.28	4.08	1.33

mI, main values of band informativeness; mPIC, main values of polymorphic information content; Rp, resolving power; polymorphic information content (PIC); MI, marker index; MR, multiplex ratio; EMR, effective multiplex ratio; a, Hav-p average heterozygosity for polymorphic bands.

جدول ۴- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های شوید کوهی توسط نشانگرهای مولکولی ISSR

Table 4. Genetic diversity parameters in *Grammosciadium platycarpum* populations using ISSR molecular markers

Population	Polymorphic bands (%)	Na	Ne	Ne/Na	I	He
جمعیت	مکان‌های ژنی چندشکل	تعداد آلل‌های مشاهده شده	تعداد آلل‌های موثر		شاخص شانون	شاخص تنوع ژنی نی
SIL	23.53	1.132	0.529	0.467	0.124	0.082
ABH	29.41	1.188	0.753	0.633	0.164	0.110
MAH	55.88	1.409	1.382	0.980	0.333	0.228
TAK	26.47	1.191	0.618	0.518	0.156	0.107
GAR	38.24	1.225	0.853	0.696	0.206	0.137
MAR	29.41	1.219	0.735	0.602	0.176	0.121
MAQ	23.53	1.132	0.588	0.519	0.124	0.082
TAR	41.18	1.253	0.912	0.727	0.226	0.151
RAZ	32.35	1.231	0.794	0.645	0.190	0.130
JOL	61.76	1.342	1.294	0.960	0.324	0.213
QOR	29.41	1.117	0.706	0.632	0.130	0.082
QAS	50.00	1.338	1.029	0.769	0.286	0.194
SAQ	35.29	1.306	0.912	0.698	0.228	0.161
OSH	17.65	1.091	0.412	0.377	0.090	0.058
Mean	35.29	1.228	0.821	0.658	0.198	0.133

Na, the number of observed alleles; Ne, the effective number of alleles; I, the Shannon's information index; He, Nei's genetic diversity index. For a detailed description of the population code, cf. Table 1.

تجزیه کلاستر

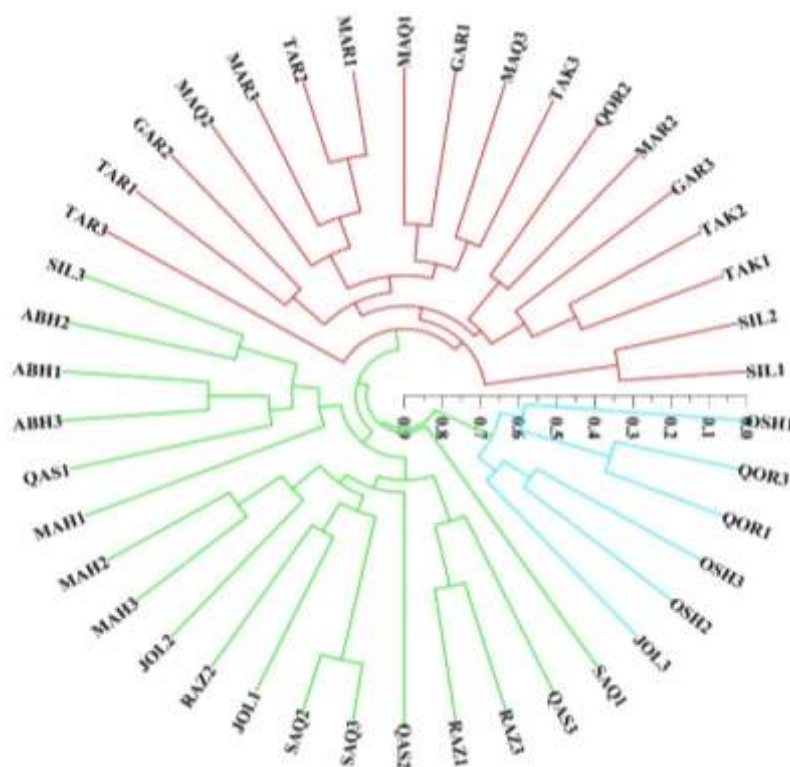
تجزیه خوشه‌ای یکی از متداول‌ترین روش‌های آماری چند متغیره در بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد و جمعیت‌ها می‌باشد. الگوریتم‌های مختلفی برای تجزیه خوشه‌ای وجود دارد. از بین این الگوریتم‌ها، UPGMA و روش Ward متداول‌ترین روش‌های تجزیه خوشه‌ای مورد استفاده در مطالعات ژنتیکی به خصوص بررسی تنوع می‌باشد. در تحقیق حاضر تجزیه خوشه‌ای ۱۴ جمعیت وحشی که شامل ۴۲ فرد می‌باشد، بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت (شکل ۲). در این کلاستر، ۴۲ ژنوتیپ شوید کوهی به سه گروه تقسیم شدند. اغلب جمعیت‌های مختلف شوید کوهی به صورت پراکنده کنار هم در یک گروه قرار گرفتند که این امر نشان دهنده عدم مطابقت فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف شوید کوهی با منشأ جغرافیایی بود. نتایج مشابه مبنی بر عدم تطبیق منشأ جغرافیایی با تنوع ژنتیکی پیش از این نیز در پژوهش Suresh و همکاران (۲۰۱۲) در ارزیابی تنوع توده‌های شوید با استفاده از نشانگر RAPD، مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های ریحان (Aghaei *et al.*, 2012) و کدوی کاغذی (Amiri *et al.*, 2017) با استفاده از نشانگر ISSR به دست آمده است. در گیاهان دگرگشن، جریان ژنی گسترده بین زیرجمعیت‌ها موجب کاهش تمایز ژنتیکی میان جمعیت‌ها شده و هم‌زمان سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی را در داخل هر جمعیت حفظ می‌کند. تفاوت مشاهده شده ممکن است در اثر انتخاب، سازگاری، مهاجرت، رانش ژنتیکی و روش‌های گرده‌افشانی باشد (Bahari *et al.*, 2015). همچنین ارتباط بین نشانگرهای ISSR و نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده ژنوم در این امر بی‌تاثیر نیست، از آنجایی که نشانگرهای ISSR جز نشانگرهای نیمه تصادفی بوده و بر نواحی غیر رمزکننده متکی هستند، این عدم مطابقت الگوی گروه‌بندی با منشأ جغرافیایی، شاید به دلیل تکثیر مناطق غیر رمزکننده توسط آغازگرهای ISSR باشد (Nadi *et al.*, 2024).

نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که بالا بودن میزان چندشکلی به دست آمده نشان‌دهنده کارایی مناسب نشانگر ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شوید کوهی می‌باشد و می‌توان از آن به عنوان ابزار مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در گیاهان استفاده نمود. یکی از اهداف به‌نژادگران گیاهی، حفاظت از ذخایر ژنتیکی می‌باشد که تنوع ژنتیکی باعث افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها و در نتیجه بقای گونه می‌شود. از آنجا که مطالعه بر روی روابط ژنتیکی برای اصلاح گیاهان و همچنین حفاظت از منابع ژنتیکی ضروری می‌باشد (Aghaei *et al.*, 2012)، این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌ها وجود دارد و می‌توان تدابیری برای حفاظت و برنامه‌های اصلاحی بر روی این گونه انجام داد. از آنجایی که برنامه‌های اصلاحی به تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌ها نیاز دارند، تنوع موجود در جمعیت‌های مورد بررسی می‌تواند کمک شایانی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی بکند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) (شماره طرح: ۴۰۲۳۸۱۸) و معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.



شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ژنوتیپ‌های شوید کوهی با استفاده از داده‌های ISSR

Figure 2. UPGMA cluster analysis of different populations of *Grammosciadium platycarpum* based on the ISSR data matrix.

References

- Aghaei, M., Darvishzadeh, R. & Hassani, A. (2012). Molecular characterization and similarity relationships among Iranian basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions using inter simple sequence repeat markers. *Revista Ciência Agronômica*, 43(2), 312–320. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200014>
- Akhtar, N., Hafiz, I. A., Hayat, M. Q., Potter, D., Abbasi, N. A., Habib, U., Hussain, A., Hafeez, H., Bashir, M. A. & Malik, S. I. (2021). ISSR-based genetic diversity assessment of genus *Jasminum* L. (Oleaceae) from Pakistan. *Plants*, 10(7), 1270. <https://doi.org/10.3390/plants10071270>
- Alan, F., Uzun, A. & Pinar, H. (2025). Genetic diversity and population structure of some blackberry genotypes collected from different parts of Türkiye using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 72, 9001–9019. <https://doi.org/10.1007/s10722-025-02498-6>
- Alzahrani, O. R., Alshehri, M. A., Alasmari, A., Ibrahim, S. D., Oyouni, A. A. & Siddiqui, Z. H. (2023). Evaluation of genetic diversity among Saudi Arabian and Egyptian cultivars of alfalfa (*Medicago sativa* L.) using ISSR and SCoT markers. *Journal of Taibah University for Science*, 17, 2194187. <https://doi.org/10.1080/16583655.2023.2194187>
- Amiri, P., Ismaili, A. & Hadian, J. (2017). Evaluation of genetic diversity of Styrian pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Research*, 4(2), 17–28. <https://doi.org/10.29252/pgr.4.2.17>

- Amiri, P., Shahpiri, A., Asadollahi, M., Momenbeik, F. & Partow, S. (2016). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for linalool production. *Biotechnology Letters*, 38, 503–508. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2000-4>
- Aprotosoiaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., & Miron, A. (2014). Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 29, 193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>
- Bahari, Z., Shojaeiyan, A., Rashidi Monfared, S., Mirshekari, A., Nasiri, K. H. & Amirian, M. (2015). Investigation of genetic diversity among some Iranian dill (*Anethum graveolens* L.) landraces using ISSR markers. *Plant Genetic Research*, 2, 11–22. <https://doi.org/10.29252/pgr.2.1.11>
- Bakhtiar, Z., Hassandokht, M., Naghavi, M.R. & Mirjalili, M.H. (2024). Phenotypic, genetic structure, and essential oil characteristics of twenty *Ocimum basilicum* L. agro-ecotypic populations from Iran. *Scientia Horticulturae*, 326, 12748. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112748>
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F. & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 651593. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Eghlima, G., Kheiry, A., Sanikhani, M., Hadian, J., & Aelaei, M. (2021). Study of genetic diversity of *Glycyrrhiza glabra* L. populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Research*, 8(1), 81–94. <https://doi.org/10.52547/pgr.8.1.6>
- Eghlima, G., Saeed-Abadi, B., Sonboli, A., Rezadoost, H. & Mirjalili, M.H. (2025a). Phenotypic yield-attributed traits, essential oil content and composition of Iranian *Grammosciadium platycarpum* (Apiaceae) populations: a rich source of (S)-(+)-linalool. *BMC Plant Biology*, 25, 208. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06231-4>
- Eghlima, G., Sonboli, A. & Mirjalili, M.H. (2025b). Chemometrics-based analysis of the essential oil composition, phenolic compounds, and antibacterial potency of aerial parts of *Grammosciadium platycarpum* populations. *Scientific Reports*, 15, 5083. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89786-4>
- Frumuzachi, O., Flanagan, A., Rohn, S., & Mocan, A. (2025). The dichotomy between functional and functionalized foods: A critical characterization of concepts. *Food Research International*, 208, 116173. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116173>
- Gebreemichael, G. E., Bayratsion, Y. T., Abera, F. A., Egziabher, Y. G., Sbhatu, D. B., Tesfaye, K., Mekonnen, T. & Atsbeha, G. (2025). Genetic diversity and population structure analysis of *Pisum sativum* var. abyssinicum genotypes from Northern Ethiopia using ISSR markers. *Agrosystems, Geosciences & Environment*, 8, e70151. <https://doi.org/10.1002/agg2.70151>
- Hadian, J., Karami, A., Azizi, A. & Khadivi-Khub, A. (2014). Ubiquitous genetic diversity among and within wild populations of *Satureja rechingeri* assessed with ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 923–930. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1126-5>
- Hadian, J., Raeisi, S., Azizi, A., Pezhmanmehr, M. & Sarkhosh, A. (2017). Genetic diversity of natural populations of medicinally valuable plant *Satureja khuzistanica* Jamzad based on ISSR markers. *Brazilian Journal of Botany*, 40, 771–781. <https://doi.org/10.1007/s40415-017-0374-3>
- Heydari, A., Hadian, J., Esmaeili, H., Kanani, M.R., Mirjalili, M.H. & Sarkhosh, A. (2019). Introduction of *Thymus daenensis* into cultivation: analysis of agro-morphological, phytochemical and genetic diversity of cultivated clones. *Industrial Crops and Products*, 131, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.033>
- Hu, Y., Wang, L., Xie, X., Yang, J., Li, Y. & Zhang, H. (2010). Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.01.006>

- Ilc, T., Parage, C., Boachon, B., Navrot, N. & Werck-Reichhart, D. (2016). Monoterpenol oxidative metabolism: Role in plant adaptation and potential applications. *Frontiers in Plant Science*, 7, 509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00509>
- Jamshidnia, M., Asgary, S. & Rafieian-Kopaei, M. (2023). Evaluation of accession structure and genetic diversity in Iranian milk thistle (*Silybum marianum* L.) by ISSR markers. *Genetika*, 55, 473–490. <https://doi.org/10.2298/GENSR2302473J>
- Karunamoorthi, K., Jegajeevanram, K., Vijayalakshmi, J. & Mengistie, E. (2013). Traditional medicinal plants: A source of phytotherapeutic modality in resource-constrained health care settings. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 18(1), 67–74. <https://doi.org/10.1177/2156587212460241>
- Kayis, S.A., Hakki, E. E. & Pinarkara, E. (2010). Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 5(21), 2925–2933. <https://doi.org/10.5897/AJAR.9000122>
- Khaled, A. G. A., Motawea, M. H. & Said, A. A. (2015). Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.05.001>
- Khazaie, L., Shirzadian-Khorramabad, R., Ebadi, A. A. & Moumeni, A. (2024). Genetic Diversity and Population Structure in Hashemi Rice (*Oryza sativa* L.) Mutants Revealed by Morphological and Molecular Markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 26(3), 607–622. <https://doi.org/10.22034/JAST.26.3.607>
- Kumar, A., D'Souza, S. S., Uenishi, G., Park, M. A., Lee, J. H. & Slukvin, I. I. (2020). Generation of T cells from human and nonhuman primate pluripotent stem cells. *Bio-Protocol*, 10(13), e3675. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3675>
- Kumar, S. S., Prasad, S., Wani, O. A., et al. (2025). Genetic diversity and agromorphological characterization of cassava varieties provides insight for breeding and crop improvement. *Scientific Reports*, 15, 17498. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-02527-5>
- Latifi, E., Yousefi, M. & Haerinasab, M. (2018). Study of genetic diversity in some populations of *Cordia myxa* L. in Iran by using CDDP molecular marker. *Journal of Plant Biological Sciences*, 9(4), 39–54. <https://doi.org/10.22108/IJPB.2018.105760.1046>
- Lotfi, M., Eghlima, G., Mirjalili, M.H. & Sonboli, A. (2024). Evaluation of seed germination indices of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. under the influence of stratification and gibberellic acid treatments. *Journal of Vegetables Sciences*, 15(1), 39–50. <https://doi.org/10.22034/IUVS.2024.202375.6.135>
- Nadi, S., Saba, J., Jaffaraghaei, M. & Andalibi, B. (2024). Study of genetic diversity among coriander (*Coriandrum sativum* L.) populations using ISSR markers. *MGJ*, 18(4), 5.
- Nazari, D., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Taj-abadi, F. & Soltanipour, M. (2024). Expression of the changes in essential oil components of Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss.) as affected by various drying methods. *Industrial Crops and Products*, 220, 119222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119222>
- Ogwu, M.C., Izah, S.C., Joshua, M.T. (2025). Ecological and environmental determinants of phytochemical variability in forest trees. *Phytochemistry Reviews*, 1–29. <https://doi.org/10.1007/s11101-025-10066-0>
- Pereira, I., Severino, P., Santos, A. C., Silva, A. M. & Souto, E. (2018). Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171(1), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001>
- Pérez de la Torre, M., García, M., Heinz, R. & Escandón, A. (2012). Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(5), 1–12. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-8>
- Pourkhaloee, A., Khosh-Khui, M., Arens, P., Salehi, H., Razi, H., Niazi, A., Afsharifar, A. & van Tuyl, J. (2018). Molecular analysis of genetic diversity, population structure, and

- phylogeny of wild and cultivated tulips (*Tulipa* L.) by genic microsatellites. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 59, 875–888. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0055-6>
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (Microsatellite) Markers for Germplasm Analysis. *Molecular Breeding*, 3, 225–238. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00564200>
- Raguso, R. A. (2016). More lessons from linalool: Insights gained from a ubiquitous floral volatile. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.05.007>
- Serrote, C., Reiniger, L., Silva, K. B., Rabaiolli, S. & Stefanel, C. M. (2020). Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*, 726, 144175. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>
- Shakoor, A., Zaib, G., Zhao, F., Li, W., Lan, X. & Esfandani-Bozchaloyi, S. (2022). ISSR markers and morphometry determine genetic diversity and population structure in *Hedera helix* L. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 58, 73–82. <https://doi.org/10.17221/93/2021-CJGPB>
- Suresh, S., Chung, J. W., Sung, J. S., Cho, G. T., Park, J. H., Yoon, M. S., Kim, C. K. & Baek, H. J. (2012). Analysis of genetic diversity and population structure of 135 dill (*Anethum graveolens* L.) accessions using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 893–903. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9886-7>
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. & Melwyn, G. S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.11.022>
- Wang, F., Yang, T., Burlyaeva, M., Li, L., Jiang, J., Fang, L., Redden, R. & Zong, X. (2015). Genetic diversity of grasspea and its relative species revealed by SSR markers. *PLoS One* 10, e0118542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118542>