



شناسایی نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR مرتبط با صفات زراعی در بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

صنم صفائی چائی کار^۱، مهدی رحیمی^۲ و شهاب خاقانی^۳

۱- باشگاه پژوهش‌گران جوان و نخبگان، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران، (نویسنده مسوول: safaei.sanam@gmail.com)

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، باشگاه پژوهش‌گران جوان و نخبگان، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱

چکیده

پیدا کردن ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی یک ابزار عالی برای انتخاب غیرمستقیم صفت مورد نظر در جمعیت گیاهی است. در این مطالعه، از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام‌به‌گام برای تخمین ارتباط بین آغازگرهای ISSR و RAPD با برخی از صفات زراعی در ۱۲ توده بادرنجبویه استفاده شد. نشانگرها یا باندها به‌عنوان متغیر مستقل و صفات به‌عنوان متغیر تابع در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل نتایج رگرسیونی، ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از جایگاه‌های مورد مطالعه نشان داد. برای بعضی صفات بیش از یک نشانگر آگاهی بخش تشخیص داده شد. در مجموع ۹۰ نشانگر آگاهی بخش از جمله ۴۸ جایگاه ISSR و ۴۲ جایگاه RAPD مشخص شدند. چهار نشانگر RAPD (نشانگرهای SA-R-10، OPA-01-15، OPC-04-7 و CS-56-8 به ترتیب با درصد توجیه ۵۴، ۰/۷، ۰/۴ و ۰/۲) و چهار نشانگر ISSR (نشانگرهای UBC826-1، UBC812-9، UBC813-10 و UBC825-4 به ترتیب با درصد توجیه ۲۹، ۷/۵، ۵ و ۳) با درصد اسانس همبستگی معنی‌داری نشان دادند و ۹۹/۸ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. در میان آغازگرهای RAPD، توجه ویژه‌ای باید به آغازگر SA-R شود چرا که بیشترین ارتباط بین قطعات این آغازگر با صفات تعداد روز تا ۵۰ گلدهی، تعداد شاخه در بوته، وزن تر و وزن خشک اندام رویشی بود. برخی از این آغازگرها (SA-R و UBC813) با بیش از یک صفت ارتباط داشتند که نشان‌دهنده پیوستگی نزدیک این صفات با کنترل این صفات توسط اثرات پلیوتروپی می‌باشد. این آغازگرها برای بهبود و اصلاح بادرنجبویه مفید هستند.

واژه‌های کلیدی: ارتباط رگرسیونی، نشانگر آگاهی بخش، درصد اسانس

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) گیاهی است پایا و پرشاخه و پرپشت به ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر و بسته به شرایط اقلیمی بیشتر و یا کمتر هم می‌شود. منشا آن شرق مدیترانه و جنوب اروپا گزارش شده است و در اسپانیا تا قفقاز و در آسیای صغیر و ایران رویش دارد (۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که بادرنجبویه با ۸۸/۵۷ درصد خود کرده‌افشان بوده و نتایج مطالعات سیتوژنتیکی نیز نشان داده که توده‌های بادرنجبویه در ایران دیپلوئید و دارای ۳۲ کروموزوم می‌باشند (۳۳). برگ ملیس دارای یک ماده تلخ، تانن، کامفر، قندهای مختلف، مواد رزینی، مواد پکتیکی و ۰/۱ تا ۰/۲۵ (گاهی ۰/۷۵) درصد اسانس است که ماده موثره آن به حساب می‌آید (۲۸). قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین کار با آغازگرهای مولکولی در ارزیابی روابط بین ژنوتیپ‌ها در یک گونه خاص غالباً صفات ریخت‌شناسی نقش عمده را ایفا می‌نمودند. اخیراً علم زیست فناوری کمک شایانی در تشخیص روابط ژنتیکی و فیلوژنی در اصلاح گیاهان نموده است. آغازگرهای مولکولی و صفات ریخت‌شناسی هر دو می‌توانند تکمیل‌کننده یکدیگر باشند و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی محسوب شوند (۳۱). گزارشات مختلف مبنی بر ارتباط توأم صفات ریخت‌شناسی و مولکولی با استفاده از روش‌های آماری بیان شده است (۲۵، ۲۷). از آنجایی که هدف اساسی ژنتیک، مرتبط ساختن ژنوتیپ به فنوتیپ است، در ۲۰ سال گذشته تلاش اصلی در اصلاح گیاهان تغییر از روش سنتی انتخاب شجره‌ای بر اساس فنوتیپ به انتخاب بر اساس آغازگرهای ژنتیکی با تاکید بر

شناسایی صفات کمی و انتخاب بر اساس نشانگر (MAS) است. مطالعات موفقیت‌آمیز زیادی بر روی گیاهان زراعی و در جمعیت‌های مختلف (F1, F2, BIL, RIL, NIL) در این زمینه گزارش شده است (۱۴،۵). در دسترس بودن تعداد بسیار زیادی از آغازگرها و صفات ریخت‌شناسی می‌تواند به مطالعه تجزیه رگرسیونی بین این نشانگرها و صفات مورفولوژیکی کمک نماید. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، شناسایی نشانگرهای وابسته به صفت از طریق رگرسیون مناسب به‌نظر می‌رسد. تجزیه رگرسیونی چندمتغیره^۱ بر پایه رابطه بین آغازگرهای مولکولی (به‌عنوان متغیر مستقل) و صفات ریخت‌شناسی (به‌عنوان متغیر وابسته) روش مناسبی برای شناسایی آغازگرهای وابسته به صفت می‌باشد. این تجزیه ضریب تبیین (R^2) را تعیین می‌کند که این ضریب میزان رابطه صفت ریخت‌شناسی را با آغازگر مولکولی نشان می‌دهد (۲۶،۱۰). استفاده از نشانگرهای مولکولی در تعیین آغازگرهای وابسته به صفت در برخی از گیاهان استفاده شده است و نتایج خوبی نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال رابطه بین داده‌های حاصل از تکنیک‌های مولکولی مختلف با صفات بیوشیمیایی در گونه‌های جنس *Morus* (۱۶)، مارتیغال (۳۰) و گونه *Valeriana jatamansi* (۱۵) بررسی شده است. همچنین رابطه این نشانگرها با صفات ریخت‌شناسی در گونه‌هایی مانند فندق (۲۰)، خرما (۱۹)، انگور (۶)، انار (۲) و گیلاس (۸) بررسی شده است. با توجه به این که تا کنون گزارشی در مورد ارتباط صفات با نشانگرها در این گاه وجود ندارد و همچنین مکان‌یابی هم در این گیاه انجام نشده است، در این مطالعه ارتباط نشانگرهای RAPD و ISSR با صفات

دستگاه Photo-Print (Vilber Lourmat IP-008-SD) منتقل شد. پس از مشاهده نوارها در زیر نور UV از ژل عکس برداری شد. الگوهای نواریندی حاصل به صورت صفر و یک (عدم وجود و وجود نوار) امتیازدهی شدند. همچنین برای هر الل نشانگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت ۱، ۲، ۳ و ... نام‌گذاری و برای برآورد فراوانی آلی و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه استفاده شدند. درصد چندشکلی براساس رابطه ۱، محتوای اطلاعات چندشکل یک نشانگر^۱ بر اساس رابطه ۲، نسبت چندگانه موثر^۲ براساس رابطه ۳، شاخص نشانگری^۳ براساس رابطه ۴، تعداد آل‌های موثر^۴ براساس رابطه ۵، شاخص شانون براساس رابطه ۶ و شاخص تنوع نی براساس رابطه ۷ محاسبه گردیدند (۲۹، ۲۴، ۲۲، ۱۸، ۱۳).

$$\left(\frac{np}{n}\right) * 100 \quad (1)$$

$$1 - \sum_{i=1}^n p_i \quad (2)$$

$$EMR = n_p \times \beta \quad (3)$$

$$PIC \times EMR \quad (4)$$

$$\frac{1}{\sum p_i^2} \quad (5)$$

$$- \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i \quad (6)$$

$$- \ln \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}} \quad (7)$$

در این روابط، P_i (i از یک تا n)، فراوانی آل نام و n تعداد آل، n_p ، تعداد کل نوارهای چندشکل و β نسبت تعداد نوار چند شکل به تعداد کل نوار، J_x ، J_y و J_{xy} به ترتیب میانگین حسابی همه آل‌ها برای فرد x و y می‌باشد. تجزیه و تحلیل ارتباط بین داده‌های مولکولی (تمام نوارهای چند شکل دو نشانگر RAPD و ISSR به‌عنوان متغیرهای مستقل) و داده‌های کمی (به‌عنوان متغیر وابسته) با استفاده از رگرسیون چندگانه به روش گام‌به‌گام انجام شد (۲۶، ۱۷) تا نشانگرهای موثر مرتبط با صفات عملکرد و اجزای عملکرد شناسایی شوند. رگرسیون چندگانه با روش گام‌به‌گام با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد (۳۲). تجزیه بر پایه مدل چندگانه، که تغییرات در متغیر وابسته به یک تابع خطی از مجموعه‌ای از متغیرهای مستقل (۳۵) به صورت رابطه زیر نشان داده شد.

$$Y = a + b_1 m_1 + \dots + b_j m_j + \dots + b_n m_n + d + e$$

که در آن Y میانگین ژنوتیپ برای یک صفت کمی، m_j نشان‌دهنده نشانگرهای RAPD، b_j نشان‌دهنده ضرایب جزئی رگرسیون است که روابط آزمایشی مشخص بین Y و m_j را نشان می‌دهد. همچنین d نشان‌دهنده خطای بین ژنوتیپ‌ها بعد از رگرسیون و e خطای تصادفی Y است که شامل تنوع محیطی نیز می‌شود (۳۵). برای انتخاب متغیرهای مستقل برای تابع رگرسیون، از F با احتمال ۰/۰۴۵ و ۰/۰۹۹

مرتبط با عملکرد در توده‌های مختلف بادرنجبویه بررسی شده تا در نهایت با انتخاب آغازگرهای مناسب در جهت اصلاح بادرنجبویه گامی موثر برداشت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، تعداد ۱۲ ژنوتیپ بادرنجبویه که از بخش ذخایر توارث گیاهی ملی ایران تهیه شده بود (جدول ۲) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته-کرمان در سال ۱۳۹۴ کشت گردیدند. بذور ۱۲ جمعیت بادرنجبویه به طور مستقیم و با توزیع تصادفی کشت شدند. هر واحد آزمایش متشکل از ۳ خط ۲ متری با فاصله خطوط ۵۰ سانتی‌متر و فاصله بین بوته‌های ۲۵ سانتی‌متر بود. پس از کاشت بادرنجبویه تا زمان سبز شدن بذور، هر سه روز یک‌بار و پس از این مرحله هر هفت روز یک‌بار آبیاری به روش غرقابی انجام گرفت. تمامی صفات مورد ارزیابی در ۵ بوته از هر واحد آزمایشی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند و عبارتند از: تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی، ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد شاخه در بوته، طول میان‌گره، تعداد گره، وزن تر و خشک اندام رویشی برداشت شده در مرحله اواخر گلدهی، طول و عرض برگ و درصد اسانس. استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان اکوتیپ‌های مختلف بادرنجبویه با استفاده از روش CTAB مورای و تامپسون (۲۱) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA به ترتیب از دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۶٪ استفاده شد. از ۲۰ آغازگر ISSR از دانشگاه بریتیش کلمبیا-UBC (کانادا)، استفاده شد و تنها ۱۲ عدد از آن‌ها (جدول ۲) تکثیر و چند شکلی نشان دادند. این آغازگرها عمومی بوده و در گیاهان دیگر باندهای بیشتری داده بودند و براین اساس انتخاب شدند. همچنین، ۱۵ آغازگر RAPD استفاده شد و تعداد ۱۰ آغازگر از آن‌ها (جدول ۲) تکثیر و چند شکلی نشان دادند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای ISSR و RAPD در حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزای دو میکرولیتر DNA الگو ۵۰ نانوگرم، ۱/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (۵ μM)، ۰/۶ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۴۸ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۱۴ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5 U/μl) و ۴/۵۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده انجام شد. چرخه حرارتی شامل ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹۴°C، سپس ۳۵ سیکل انجام شد که هر سیکل به این صورت بود که واسرشته‌سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد سپس مرحله اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به آغازگر متفاوت بود) به مدت ۳۰ ثانیه بود و در نهایت مرحله بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه انجام شد و در نهایت بعد از ۳۵ سیکل ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲°C انجام شد و سپس در دمای ۴°C نگهداری گردید. محصولات PCR هر آغازگر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با توان ۷۵W برای مدت ۶۵ دقیقه توسط الکتروفورز بارگذاری شدند و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل مذبور دو یا سه مرتبه با آب معمولی شستشو داده شد. سپس ژل به

به ترتیب برای وارد کردن و خارج کردن متغیرها استفاده گردید.

نتایج و بحث

نشانگرهای ISSR در مجموع ۱۵۱ باند ایجاد کردند که از بین آنها ۱۰۶ باند چندشکل بودند و میانگین مکان‌های چندشکل به ازای هر آغازگر معادل ۸/۸۳ بدست آمده است و همچنین نشانگرهای RAPD در مجموع ۱۷۵ باند تولید نمودند که از بین آنها ۱۲۷ باند چندشکل بوده و میانگین مکان‌های چندشکل به ازای هر آغازگر معادل ۱۲/۷ بود

(جدول ۲ و شکل ۱). از بین آغازگرهای مورد استفاده ISSR، آغازگر UBC813 با تعداد ۱۶ باند و بعد از آن، آغازگرهای UBC811، UBC815 و UBC817 با تعداد ۱۵ باند بیشترین تعداد باند و آغازگر UBC825 با تعداد ۸ باند کمترین تعداد را داشتند (جدول ۲). همچنین تعداد ۱۴ باند چندشکلی برای آغازگر UBC813 و ۱۲ باند چندشکل برای آغازگر UBC811 بود، کمترین تعداد باند برای آغازگر UBC825 با ۵ باند مشاهده شد. درصد چندشکلی به‌دست آمده در توده‌ها از ۶۰ درصد برای UBC824 تا ۸۷/۵ درصد برای UBC813 متغیر بود.

جدول ۱- محل جمع‌آوری و کدهای توده‌های بادرنجبویه

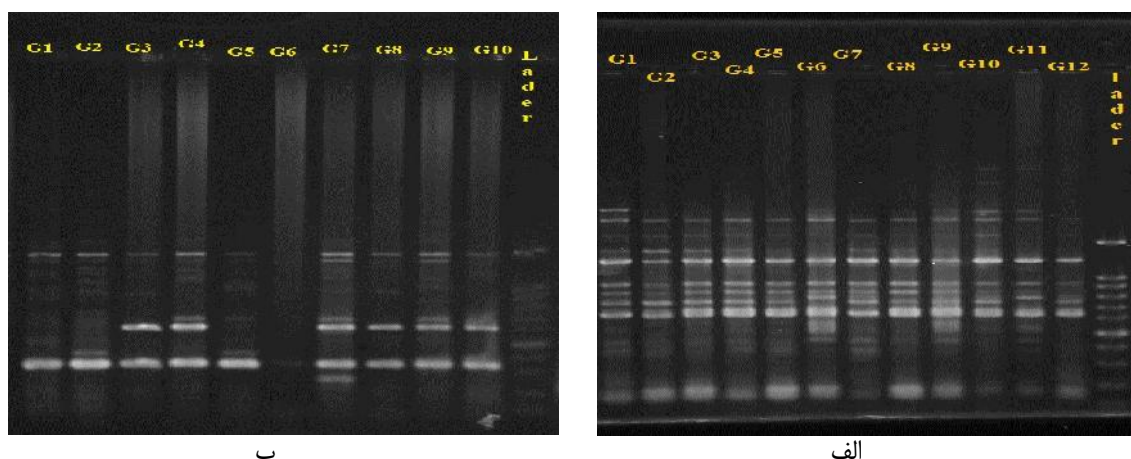
Table 1. Collecting place and code number of lemon balm ecotypes

Code	Collection region	Code	Collection region
G1	تهران- دماوند Tehran-Damavand	G7	کرمان Kerman
G2	اردبیل Ardabil	G8	اصفهان- یزدآباد Isfahan -YazdAbad
G3	اصفهان- نجفآباد Isfahan -NajafAbad	G9	خراسان جنوبی- سریشه South Khorasan-Sarbisheh
G4	قزوین- یک Qazvin-1	G10	آذربایجان شرقی East Azerbaijan
G5	فارس Fars	G11	قزوین- دو Qazvin-2
G6	همدان- همدان Hamedan-Hamedan	G12	گیلان- لاهیجان Guilan-Lahijan

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ISSR و RAPD و شاخص‌های نشانگری در توده‌های بادرنجبویه

Table 2. ISSR and RAPD primers characteristics and marker indices in lemon balm ecotypes

تعداد آلل موثر	شاخص نی	شاخص شانون	شاخص نشانگری	نسبت چندگانه موثر	محتوای اطلاعات چندشکل	درصد چندشکلی (%)	کل باند	باند چندشکل	توالی آغازگر	آغازگر
۱/۷۶	۰/۴۳	۰/۶۲	۳/۲	۹/۶	۰/۳۳	۸۰	۱۵	۱۲	(GA)8C	UBC811
۱/۸۹	۰/۴۷	۰/۶۶	۲/۰۸	۵/۷۹	۰/۳۶	۶۴/۲۹	۱۴	۹	(GA)8A	UBC812
۱/۸۸	۰/۴۷	۰/۶۶	۴/۳۸	۱۲/۲۵	۰/۳۶	۸۷/۵۰	۱۶	۱۴	(CT)8T	UBC813
۱/۶۴	۰/۲۸	۰/۵۶	۱/۶۱	۵/۳۳	۰/۲۰	۶۶/۶۷	۱۲	۸	(CT)8A	UBC814
۱/۷۱	۰/۴۱	۰/۶۰	۲/۱۵	۶/۶۷	۰/۳۲	۶۶/۶۷	۱۵	۱۰	(CT)8G	UBC815
۱/۹	۰/۴۷	۰/۶۶	۱/۷۷	۴/۹	۰/۳۶	۷۰	۱۰	۷	(CA)8T	UBC816
۱/۸۷	۰/۴۶	۰/۶۵	۲/۲۷	۶/۶۷	۰/۲۵	۶۶/۶۷	۱۵	۱۰	(CA)8A	UBC817
۱/۹۸	۰/۵۰	۰/۶۹	۱/۶۶	۴/۴۵	۰/۳۷	۶۲/۶۴	۱۱	۷	(TC)8C	UBC823
۱/۹۵	۰/۴۹	۰/۶۸	۱/۳۳	۳/۶	۰/۳۷	۶۰	۱۰	۶	(TC)8G	UBC824
۱/۸۶	۰/۴۶	۰/۶۵	۱/۱۱	۳/۱۳	۰/۲۵	۶۲/۵۰	۸	۵	(AC)8T	UBC825
۱/۷۹	۰/۴۴	۰/۶۳	۱/۹۸	۵/۸۲	۰/۳۴	۷۲/۷۳	۱۱	۸	(AC)8C	UBC826
۱/۶۶	۰/۳۹	۰/۵۷	۲/۲۱	۷/۱۴	۰/۲۱	۷۱/۴۳	۱۴	۱۰	(AC)8A	UBC876
۱/۸۲	۰/۴۵	۰/۶۴	۲/۱۵	۶/۲۸	۰/۳۴	۶۹/۳۴	۱۲/۵۸	۸/۸۳	(Average)	میانگین
۱/۸	۰/۴۴	۰/۶۳	۱/۸۵	۵/۴	۰/۳۴	۶۰	۱۵	۹	5' GGACCCCTTAC 3'	OB20
۱/۹	۰/۴۷	۰/۶۶	۲/۵۶	۷/۱۲	۰/۳۶	۶۴/۷۱	۱۷	۱۱	5' GGAAGTCGCC 3'	OH-04
۱/۸۷	۰/۴۶	۰/۶۶	۳/۸۷	۱۰/۸۹	۰/۳۶	۷۷/۷۸	۱۸	۱۴	5' TCGGCGATAG 3'	OA12
۱/۹۳	۰/۴۸	۰/۶۷	۵/۲۸	۱۴/۴۵	۰/۳۷	۸۵	۲۰	۱۷	5' TTCCCCGCT 3'	BB13
۱/۷۷	۰/۴۳	۰/۶۲	۲/۱۰	۶/۲۵	۰/۳۴	۶۲/۵۵	۱۶	۱۰	5' AGGTCACTGA 3'	SA-R
۱/۷۲	۰/۴۰	۰/۵۸	۲/۸۲	۹	۰/۳۱	۷۵	۱۶	۱۲	5' TGGTGGGTCC 3'	CS-56
۱/۹۴	۰/۴۸	۰/۶۸	۴/۳۴	۱۱/۸۴	۰/۳۷	۷۸/۹۵	۱۹	۱۵	5' CCGCATCTAC 3'	OC4
۱/۹	۰/۴۷	۰/۶۶	۲/۰۸	۵/۷۹	۰/۳۶	۶۴/۲۹	۱۴	۹	5' CAGAGGTCCC 3'	OS-03
۱/۸۸	۰/۴۷	۰/۶۶	۴/۷	۱۳/۱۴	۰/۳۶	۷۷/۲۷	۲۲	۱۷	5' CAGGCCCTTC 3'	OPA-01
۱/۸۸	۰/۴۶	۰/۶۵	۳/۳۲	۹/۳۹	۰/۳۵	۷۲/۲۲	۱۸	۱۳	5' CCGCATCTAC 3'	OPC-04
۱/۸۶	۰/۴۶	۰/۶۵	۳/۲۹	۹/۳۳	۰/۲۵	۷۱/۷۷	۱۷/۵	۱۲/۷	(Average)	میانگین



شکل ۱- الگوی بانندی نشانگر RAPD برای آغازگر OS-03 (الف) و ISSR برای آغازگر UBC815 (ب) در توده‌های بادرنجبویه
Figure 1. Primer banding pattern of RAPD for OS-03 primer (a) and ISSR for UBC815 primer (b) in lemon balm ecotypes.

آغازگر RAPD در این تحقیق بین ۰/۳۱ تا ۰/۳۷ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۵ بود (جدول ۲). بالاترین میزان PIC برای آغازگر ISSR در آغازگرهای UBC823 و UBC824 به میزان ۰/۳۷ و در آغازگرهای RAPD در آغازگر BB13 و OC4 به میزان ۰/۳۷ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها بوده و از آنجایی که هرچه این آماره بیشتر باشد بهتر می‌تواند تفاوت ژنوتیپ‌ها را نشان دهد بنابراین می‌توان از این آغازگرها در تمایز توده‌های مورد استفاده در این تحقیق استفاده نمود. به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان (EMR) در آغازگرهای ISSR برای آغازگر UBC813 (۳/۱۳) و کمترین میزان برای آغازگر UBC825 (۱۲/۲۵) بود. میزان MI بین ۱/۱۱ تا ۴/۳۸ متغیر بود. در آغازگرهای RAPD بیشترین میزان (EMR) برای آغازگر BB123 (۱۴/۴۵) و کمترین میزان برای آغازگر OB20 (۵/۴۰) بود. میزان MI بین ۱/۸۵ تا ۵/۲۸ متغیر بود (جدول ۲). بنابراین آغازگرهای UBC813، BB123، OPA-01 و UBC876 بیشترین کارایی را در بین نشانگرها داشتند. تعداد آل‌های موثر در بین آغازگرهای مطالعه شده متفاوت بود. میانگین تعداد آل‌های موثر در کل جمعیت ۱/۸۴ بدست آمد و ۱/۶۴ تا ۱/۹۸ متغیر بود (جدول ۲). بیشترین تعداد آل موثر به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC823، UBC824 و UBC824 برای آغازگر ISSR و آغازگرهای OC4 و BB13 برای آغازگر RAPD در بین کل توده‌ها بود (جدول ۲). از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آل‌های موثر است، می‌توان از این آغازگرها برای مطالعات بعدی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بادرنجبویه استفاده کرد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی می‌باشد. برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۳۸ تا ۰/۵۰ برای آغازگرهای ISSR متغیر بود و آغازگرهای UBC824 و UBC823 به‌ترتیب بیشترین تنوع ژنی را نشان

درصد چندشکلی به‌دست آمده نشانگرهای ISSR ۶۹/۳۴ درصد بود (جدول ۲). در بین آغازگرهای RAPD، آغازگر OPA-01 با تعداد ۲۲ باند و بعد از آن، آغازگرهای BB13 و OC4 با تعداد ۱۹ و ۱۸ باند بیشترین تعداد باند و آغازگرهای OS-03 و OB20 با تعداد ۱۴ و ۱۵ باند کمترین تعداد را داشتند (جدول ۲). همچنین بیشترین چندشکلی برای آغازگرهای OPA-01 و BB13 با تعداد ۱۷ باند بود، کمترین تعداد باند برای آغازگرهای OB20 و OS-03 با ۹ باند مشاهده شد. درصد چندشکلی بدست آمده در توده‌ها از ۶۰ درصد برای OB20 تا ۸۵ درصد برای BB13 متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی به‌دست آمده برای نشانگرهای RAPD 77/71 درصد بود (جدول ۲). سلوکی و همکاران (۳۱) تنوع ژنتیکی در بابونه آلمانی را با استفاده از ۲۹ آغازگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند. از ۳۶۹ باند آشکار شده ۳۱۴ باند چندشکل بودند. کمترین و بیشترین تعداد باند در هر آغازگر به ترتیب برابر با ۸ و ۲۲ بدست آمد. پیرخضری و همکاران (۲۳) در ارزیابی ۲۵ جمعیت بابونه آلمانی با استفاده از ۱۸ آغازگرهای RAPD، ۲۲۰ نوار به‌دست آوردند که ۹۳/۱ درصد چند شکل بود. میانگین کل باندها و باندهای چندشکل به ترتیب ۱۲/۲ و ۱۱/۴ درصد بود. حیدری و همکاران (۱۲) با استفاده از چهار ترکیب آغازگر AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی زرشک ۲۲۳ باند بدست آوردند که از این تعداد ۲۰۷ باند چند شکلی نشان دادند. زانگ و همکاران (۳۶) روابط و تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های گیاه دارویی *Glycyrrhiza uralensis* در شمال چین را با استفاده از آغازگر AFLP بررسی کردند. در این پژوهش از ۵۰ فرد در ۵ جمعیت استفاده شد. ۸ ترکیب پرایمری به‌طورکلی ۱۰۲۵ نوار با ۵۷ درصد چندشکلی تولید کردند. محتوای اطلاعات چندشکل، به تفکیک برای هر یک از آغازگرهای مورد مطالعه محاسبه و نتایج مربوطه در جدول ۳ ارائه شد. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۳۳ تا ۰/۳۷ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۴ برای آغازگرهای ISSR متغیر بود همچنین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای

داند. آغازگر UBC814 کمترین میزان تنوع ژنی را نشان داد. میانگین تنوع ژنی در جمعیت مورد مطالعه ۰/۴۵ بود. برای آغازگرهای RAPD برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۴۰ تا ۰/۴۸ متغیر بود و آغازگرهای BB13 و OC4 به ترتیب بیشترین تنوع ژنی را نشان دادند. آغازگر CS-56 کمترین میزان تنوع ژنی را نشان داد. میانگین تنوع ژنی در جمعیت مورد مطالعه ۰/۴۶ بود. ضریب شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپها است. در این تحقیق میانگین ضریب شانون ۰/۶۴ برای آغازگرهای ISSR و ۰/۶۵ برای آغازگرهای RAPD بود که نشان دهنده تنوع متوسط در توده‌های مورد بررسی است. آغازگرهای UBC823 و UBC824 برای آغازگرهای ISSR و آغازگرهای OC4 و BB13 برای آغازگرهای RAPD دارای بیشترین شاخص شانون بودند، این نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد اشاره می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند (جدول ۲). دومیانی و همکاران (۷) شاخص آغازگری را با استفاده از نشانگر AFLP در ۷ گونه دارویی *Avera*, *Arnebia hispidissima*, *Artemisia judaica* L., *Cleome*, *Balanites aegyptiaca javanica*, *Zilla spinosa* و *Zygophllum simplex droserifolia* به ترتیب ۶/۰۷، ۴/۰۲، ۴/۲۷، ۴/۲۹، ۲/۰۶، ۳/۹۶ و ۲/۱۳ گزارش نمودند. تریپاتی و همکاران (۳۴) میزان محتوی چند شکلی (PIC) در ۸ ترکیب پرایمیری AFLP، برای بررسی تنوع نمونه‌های آلوته‌ورا در محدوده ۰/۲۴۶ تا ۰/۴۵۸ (E-AGG+M-TA) تا ۰/۴۵۸ (E-GCA+M-GT) با میانگین ۰/۳۶۴ بدست آوردند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رگرسیون گام‌به‌گام نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از جایگاه مورد مطالعه وجود دارد (جدول ۳). تجزیه و تحلیل نتایج ارتباط معنی‌داری بین صفات و برخی از جایگاه‌های مورد مطالعه نشان داد. برای بعضی صفات بیش از یک نشانگر آگاهی بخش تشخیص داده شد. در مجموع ۹۰ نشانگر آگاهی بخش از جمله ۴۸ جایگاه ISSR و ۴۲ جایگاه RAPD مشخص شد. نشانگرهای SA-R-10، UBC826-1، UBC812-9، UBC813-10، UBC825-4، OPA-01-15، OPC-04-7 و CS-56-8 با درصد اسانس همبستگی معنی داری نشان دادند و ۹۹/۸ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. چهار نشانگر RAPD، نشانگرهای SA-R-10، OPA-01-15، OPC-04-7 و CS-56-8 به ترتیب ۵۴، ۷، ۰/۴ و ۰/۲ درصد از تنوع را توجیه نموده و همچنین چهار نشانگر ISSR، نشانگرهای UBC826-1، UBC812-9،

۱۰-UBC813 و ۴-UBC825 به ترتیب ۲۹، ۷/۵، ۵ و ۳ درصد از تنوع کل از تنوع درصد اسانس را توجیه کردند. آقاعلی و همکاران (۱) نیز در بررسی خود بر روی کرچک با استفاده از صفات مورفولوژیک و آغازگرهای مولکولی ISSR نشان دادند که ۲۷ آغازگر با ۱۷ صفت مورفولوژیک ارتباط داشته و مقدار R^2 در محدوده ۱۲/۴ (UBC857-5) تا ۲۸/۱ درصد (UBC844-2) متغییر بود. در مطالعه‌ی کتان زراعی با آغازگرهای RAPD، آغازگرهای OPD-03 و OPD-05 با هر دو صفت وزن هزار دانه و تعداد ساقه فرعی مرتبط بودند (۹) همچنین در مطالعه دیگری ۲۴ نشانگر مثبت با تجزیه ارتباط برای صفات فنولوژیک مرتبط با فرار از خشکی در لاین‌های جو با استفاده از نشانگرهای ریزوماهواره شناسایی شد (۱۱). بالاترین R^2 در این جدول مربوط به SA-R با PIC=0/37 می‌باشد. و نهایتاً این که تمامی آغازگرهای که در این جدول با صفات ارتباط معنی‌دار نشان دادند از PIC نسبتاً بالایی برخوردار می‌باشند. از مزایای مهم روش تجزیه ارتباطی این است که در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، اگر چه بهتر است از داده‌های فنوتیپی چند ساله استفاده شود. از طرف دیگر کراسینگ‌اورهایی که در حین تهیه جمعیت‌های در حال تفرق صورت می‌گیرد، محدود می‌باشد که این امکان مکان یابی دقیق را فراهم نمی‌سازد (۴). همچنین کارایی این روش برای شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مندلی نیز نشان داده شده است (۴). با توجه به اینکه اکثر مکان‌های مورد مطالعه بر روی صفات مورد مطالعه موثر بودند بنابراین احتمال دارد بتوان از این مکان‌های ریزوماهواره در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تهیه ارقام هیبرید استفاده کرد. قطعات آگاهی‌بخش در صورتی که در مطالعات مختلف پیوستگی آن‌ها ثابت شود، می‌توانند با موفقیت کلون و تعیین توالی شوند و برای انتخاب به کمک آغازگر (MAS) در برنامه‌های به‌نژادی بادرنجبویه مورد استفاده قرار گیرند. در برنامه‌های اصلاحی، تلاقی بین افرادی که فاصله ژنتیکی زیادی دارند شانس به وجود آمدن نتاج خارج از رنج والدینی را افزایش می‌دهند. بنابراین از این نشانگرها می‌توان برای شناسایی این والدین استفاده نمود. قطعه OPC-04-1 برای آغازگر RAPD و قطعه UBC813-5 برای آغازگر ISSR بالاترین ارتباط با صفات را نشان دادند. با توجه به نتایج مشخص شد که هر دو نشانگرها توانسته‌اند

جدول ۳- تجزیه رگرسیون گام به گام برای صفات (متغیر وابسته) و نشانگرهای RAPD و ISSR (متغیر مستقل)
Table 3. Stepwise regression analysis of traits (dependent variable) and RAPD and ISSR markers (independent variables)

صفات	تعداد نشانگر آگاهی بخش	نشانگر آگاهی بخش (باند)	درصد توجیه R ² (%)
تعداد روز تا گلدهی Days to 50% flowering	۷	OPA-01-9, OPA-01-15, OC4-6, OPA-01-1, SA-R-5, SA-R-2, BB13-15	۰/۹۳۰
ارتفاع بوته Plant height	۹	UBC813-5, UBC876-2, BB13-11, UBC813-10, UBC815-8, UBC824-6, OPC-04-13, OC4-6, OPA-01-11	۰/۸۹۸
قطر ساقه Stem diameter	۹	OB20-3, UBC813-13, BB13-14, UBC814-6, UBC812-4, UBC815-5, OS-03-4, OA12-9, UBC826-5	۰/۹۷۴
تعداد شاخه در بوته Number of branches per plant	۹	OPC-04-1, SA-R-2, UBC816-4, UBC823-7, UBC813-10, SA-R-4, OC4-15, UBC815-5, UBC812-3	۰/۹۶۱
تعداد گره Number of nodes	۲	UBC876-10, UBC814-5	۰/۸۴۴
طول میان گره Internode length	۸	OPA-01-9, OPA-01-10, UBC826-2, UBC815-1, OC4-12, OA12-3, OC4-14, UBC823-3	۰/۹۸۱
طول برگ Leaf length	۸	UBC814-1, CS-56-4, UBC823-7, OPC-04-4, OPA-01-4, UBC816-1, UBC813-14, UBC816-4	۰/۹۵۴
عرض برگ Leaf width	۸	OS-03-3, UBC811-6, UBC811-7, OC4-6, OC4-5, UBC826-5, UBC876-8, UBC811-2	۰/۹۸۳
وزن تر اندام رویشی Vegetative fresh weight	۱۱	SA-R-2, UBC824-5, UBC823-1, SA-R-4, OPA-01-1, OH04-9, SA-R-5, UBC876-7, UBC815-2, UBC815-10, UBC817-2	۰/۹۸۵
وزن خشک اندام رویشی Vegetative dry weight	۱۱	SA-R-2, OPA-01-1, UBC824-5, OA12-9, UBC824-2, OPC-04-2, OB20-1, BB13-12, OPA-01-17, OS-03-5, OPA-01-8	۰/۹۹۲
درصد اسانس Essential oil percentage	۸	SA-R-10, UBC826-1, UBC812-9, UBC813-10, UBC825-4, OPA-01-15, OPC-04-7, CS-56-8	۰/۹۹۸

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی باشگاه پژوهش‌گران جوان و نخبگان واحد اراک انجام شده است. نویسندگان مقاله از باشگاه پژوهش‌گران جوان و نخبگان واحد اراک برای حمایت مالی و معنوی و اجرای این پژوهش سپاس‌گزاری می‌نمایند.

در حد هم نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات را نشان دهند و بنابراین این آغازگرها می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط در مطالعات اصلاحی بادرنجوبیه مورد استفاده قرار بگیرند و از آنها در انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

منابع

1. AghAali, Z., R. Darvishzadeh and F. Goodarzi. 2016. Association analysis of morphological traits in castor (*Ricinus communis* L.) by using ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(1): 79-91 (In Persian).
2. Basaki, T., R. Choukan, S. Khayam-Nekouei, M. Mardi, E. Majidi, S. Faraji and M. Zeinolabedini. 2011. Association analysis for morphological traits in pomegranate (*Punica granatum* L.) using microsatellite markers. Mid East J Sci Res, 9(3): 410-417.
3. Blumenthal, M., A. Goldberg and J. Brinckmann. 2000. Herbal Medicine. Expanded Commission E monographs, Integrative Medicine Communications, 519 pp.
4. Breseghello, F. and M.E. Sorrells. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. Crop Science, 46(3): 1323-1330.
5. Collard, B.C. and D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363(1491): 557-572.
6. Dolati Baneh, H., S. Mohammadi, B. Abdollahi Mandoulakani and S. Rahmanpour. 2014. Association analysis for morphological traits in grapevine using SSR and AFLP markers. Journal of Agricultural Biotechnology, 6(3): 45-60 (In Persian).
7. Domyati, F., R.A. Younis, S. Edris, A. Mansour, G. Sabir and A. Bahieldin. 2011. Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. Journal of Medicinal Plants Research, 5(2): 200-210.
8. Ganopoulos, I.V., K. Kazantzis, I. Chatzicharisis, I. Karayiannis and A.S. Tsafaris. 2011. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. Euphytica, 181(2): 237-251.
9. Golshan, M., F. Rahmani and H. Abbasi Holasou. 2017. Identification of RAPD marker associated with morphological traits and population structure assessed in cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.). Journal of Crop Breeding, 9(21): 156-165 (In Persian).
10. Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 1984. Statistical procedures for agricultural research. 2th ed. New York, USA., John Wiley and Sons, New York, 680 p.
11. Gougerdchi, V., S. Dezhsetan, M. Izadi Dogonchi, M.A. Ebrahimi, A. Asghari and B. Sadeghzadeh. 2017. Assessment of genetic diversity and association analysis for phenological traits related to drought escape in barley lines using microsatellite markers. Journal of Crop Breeding, 8(20): 69-60 (In Persian).
12. Haidari, P., A.A. Mehrabi and A.A. Nasrollah Nejad Ghomi. 2014. Genetic diversity of balm (*Melissa officinalis* L.) landraces and genetic relationship within and between them using ITS markers. Journal of Crop Breeding, 6(13): 29-39 (In Persian).
13. Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Fourth ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Publishers, 635 pp.
14. Hormaza, J., K. Plnney and V. Polito. 1998. Genetic diversity of pistachio (*Pistacia vera*, Anacardiaceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Economic botany, 52(1): 78-87.
15. Jugran, A., S. Rawat, P. Dauthal, S. Mondal, I.D. Bhatt and R.S. Rawal. 2013. Association of ISSR markers with some biochemical traits of *Valeriana jatamansi* Jones. Industrial Crops and Products, 44: 671-676.
16. Kar, P.K., P.P. Srivastava, A.K. Awasthi and S.R. Urs. 2008. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus* spp.) genetic resources available in India. Tree genetics & genomes, 4(1): 75-83.
17. Kim, S., K.A. Sohn and E.P. Xing. 2009. A multivariate regression approach to association analysis of a quantitative trait network. Bioinformatics, 25(12): i204-i212.
18. Lynch, M. and B. Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Publishers, 980 pp.
19. Marsafari, M., A.A. Mehrabi and Z. Tahmasebi. 2014. The identification of RAPD and ISSR informative markers with some quality traits of fruit in some of Iranian date palm. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 4(2): 714-722.
20. Mohammadzadeh, M., M.R. Fattahi, Z. Zamani and K.A. Khadivi. 2014. Study of association between molecular markers and fruit characters in hazelnut using multiple regression analysis. Journal of Cell and Tissue, 5(3): 289-299 (In Persian).
21. Murray, M. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8(19): 4321-4326.
22. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 106(949): 283-292.
23. Pirkhezri, M., M. Hassani and J. Hadian. 2010. Genetic Diversity in Different Populations of *Matricaria chamomilla* L. Growing in Southwest of Iran, Based on Morphological. Research Journal of Medicinal Plant, 4(1): 1-13.
24. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2(3): 225-238.
25. Roy, S. and R.E. Bargmann. 1957. Tests of multiple independence and the associated confidence-bounds. North Carolina Institute of Statistics Mimeograph Series, 175 pp.
26. Ruan, C. 2010. Germplasm-regression-combined marker-trait association identification in plants. African Journal of Biotechnology, 9 pp.

27. Shalini, K., S. Manjunatha, P. Lebrun, A. Berger, L. Baudouin, N. Pirany, R. Ranganath and D.T. Prasad. 2007. Identification of molecular markers associated with mite resistance in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome*, 50(1): 35-42.
28. Shan, Y. 2005. Lemon balm (*Melissa officinalis*). *Mental Health Practice*, 9(1): 11-12.
29. Shannon, C.E. 2001. A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 5(1): 3-55.
30. Shokrpour, M., S. Mohammadi, M. Moghadam, S. Ziaei and A. Javanshir. 2008. Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 24(3): 278-292 (In Persian).
31. Solouki, M., H. Mehdikhani, H. Zeinali and A. Emamjomeh. 2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 117(3): 281-287.
32. SPSS-Inc. 2013. IBM SPSS Statistics 22 Core System User's Guide. SPSS Inc., an IBM Company Headquarters: USA.
33. Talle, B. 2008. Assessment of genetic diversity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) accessions. in *Plant Breeding*. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran: Tehran, Iran, 128 pp.
34. Tripathi, N., N. Saini and S. Tiwari. 2011. Assessment of genetic diversity among Aloe vera accessions using amplified fragment length polymorphism. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(2): 115-121.
35. Virk, P.S., B.V. Ford-Lloyd, M.T. Jackson, H.S. Pooni, T.P. Clemeno and H.J. Newbury. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity*, 76(3): 296-304.
36. Zhang, J.T., B. Xu and M. Li. 2010. Genetic diversity of populations of an endangered medicinal plant species (*Glycyrrhiza uralensis*) in different environments of North China. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(9): 830-836.

Identification of ISSR and RAPD Molecular Markers Associated with Agronomic Traits in Lemon Balm (*Melissa Officinalis*)

Sanam Safaei Chaeikar¹, Mahdi Rahimi² and Shahab Khaghani³

1- Young Researchers and Elite Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak
(Corresponding author: safaei.sanam@gmail.com)

2- Assistant Professor of plant breeding, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Young Researchers and Elite Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

Received: April 8, 2017

Accepted: October 23, 2017

Abstract

Finding association between molecular markers and agronomic traits provides an excellent tool for indirect selection of a trait of interest in the population. In this study, stepwise regression analysis was used to estimate associations between ISSR and RAPD markers with some agronomic traits in 12 lemon balm ecotypes. Markers or bands were considered as independent variables and traits were considered as dependent variables. The results analysis revealed significant associations between the traits and some of the studied loci. For all the traits more than one informative marker was detected. Totally 90 informative markers including 48 ISSR loci and 42 RAPD loci were identified. Four RAPD markers (SA-R-10, OPA-01-15, OPC-04-7 and CS-56-8 markers with 54%, 0.7%, 0.4% and 0.2% phenotypic variation, respectively) and four ISSR markers (UBC826-1, UBC812-9, UBC813-10 and UBC825-4 markers with 29%, 7.5%, 5% and 3% phenotypic variation, respectively) showed a significant correlation with Essential oil percentage and controlled 99.8% of the phenotypic variation. These markers are considered to be relatively more reliable. Among the RAPD primers, special attention should be drawn to primer SA-R, which had the highest associated fragments with the traits including days to 50% flowering, number of branches per plant, vegetative fresh weight and dry weight. Some of these markers (SA-R and UBC813 primers) were associated with more than one trait that these traits had very close linkage together or possibly were controlled by pleiotropic effects. These primers have been found useful for improved lemon balm breeding programmers.

Keywords: Agronomic traits, Essential oil content, Informative markers, Regression association