Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 4, Page 718-730 (2024)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.359502.3214

Grouping of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) genotypes native to northwest Iran using SCoT genetic marker by PCOA method and its relationship with the amount of taxol and polyphenols

Mehran Ochi-Ardabili[1], Hasan Nourafcan[2*], Hasanali Naghdi Badi[3], Naser Mohebalipour[4] and Ardeshir Qaderi[5]

1- Departement of Horticulture, Faculty of Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran
2*- Corrspondin author, Department of Horticulture, Medicinal Plants and Organic Products Research Center, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran, E-mail: hassannourafcan@gmail.com
3- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran
4- Deparment of Argonomy and Plant Breeding, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran
5- Medicinal Plant Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

Received: July 2022 Revised: February 2023 Accepted: March 2023

Abstract

Background and Objectives: Taxol is one of the most valuable effective substances found in some plants, which is used in chemotherapy against breast, stomach, ovary, liver, lung, cervix and pancreas cancers. Hazel leaf (*Corylus avellana* L.) is one of the plants in which taxol has been proven. The natural forests of Ardabil, Arsbaran and Miane regions are important areas of hazelnut germplasm. The purpose of this research is to investigate and group the subpopulation samples of hazelnuts in these regions based on the SCoT genetic marker and compare the samples of a cluster using principal component analysis in terms of the amount of taxol present in hazelnut leaves and the phytochemical characteristics of the fruit.

Methodology: Current research was done in 2018-2019. In this research, 78 samples of native trees were selected from the natural forests of Fandalo, Ardabil, Mianeh, and Arsbaran (according to the geographic distance of the samples of each region, the population of that region was considered) and the geographic location of each region was recorded with GPS. Quantitative and qualitative characteristics of hazelnuts were collected based on the size, geographic characteristics and possible diversity among the hazelnut stands in the northwest of the country and based on the description of hazelnuts of the deputy research and identification of plant varieties, Ministry of Agricultural Jihad. In this research, based on phenotypic diversity, subpopulation samples (single tree) were selected, and DNA extraction was done from the leaf part by CTAB method. After measuring the quality of DNA in the absorption spectrum of 260 and 280 nm in the nanodrop, using SCoT specific primers, the PCR reaction was performed. Then, electrophoresis was performed for the presence or absence of markers (zero and one) and the data were evaluated using POP Gene v1.32 software. From each group, depending on the number of samples, at least two samples were selected and the amount of taxol in their leaves was extracted and measured. Selected samples of hazelnut fruits were selected and the amount of antioxidant properties, phenols, fatty acids and the amount of some mineral elements were measured.

Results: Based on the presence and absence of SCoT genetic bands in the genome of selected

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

hazelnut samples from different regions, principal component analysis (PCOA) was performed. Correlation (Mantel's correlation coefficient) between the similarity coefficient based on the grouping of genotypes using the SCoT marker and the similarity coefficients using geographic characteristics data was calculated as 0.54, which was significant (Pvalue<.05). Examination of the amount of genetic information content (PIC) based on the used SCoT primers showed that the amount of PIC was different in the groups separated based on PCoA. between genotypic groups in terms of protein content, fatty acid content, fiber, carbohydrate, total phenol, palmitic acid. There was a significant difference in the probability levels of 0.05 and 0.01, and no significant difference was seen in terms of other traits. The comparison of the averages of hazelnut genotypic groups showed that in terms of protein content, percentage of fatty acids, amount of antioxidant property and palmitic acid, the highest average was related to the genotypes of group 1. The values of the similarity coefficients in the grouping based on the SCOT indicator and the similarity coefficients obtained from the results showed that the correlation between the calculated coefficients is 0.76. Evaluation of gene flow (Nm) and fixation index (Fst) within the populations and genotypes of hazelnut showed the highest amount of gene flow Nm and the lowest amount of Fst in all populations (Fst=0.55 and Nm=0.7) They showed that the same trend was observed in the groups as well, although the amount of Nm coefficient in the genotypes of group 1 was (Nm=81). The amount of inter-population heterozygosity (Dst) was estimated to be 0.15.

Conclusion: Since the study of phytochemical traits always requires time and conducting numerous tests, the existence of reliable and reproducible markers is necessary to find genotypes with high phytochemical and taxol characteristics. The low value of the gene flow parameter (Nm) showed that the studied populations have a high tendency to differentiate. The existence of high genetic diversity within populations makes it possible to implement breeding programs. The high genetic similarity between the populations, the study of the SCoT indicator (the highest 0.97, the lowest 0.81) showed that the populations belong to the same origin and genetic background.

Keywords: Antioxidant compounds, phytochemical properties, germplasm, molecular marker.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های فندق (*Corylus avellana* L.) بومی شمال‌غرب ایران با استفاده از نشانگر ژنتیکی SCoT به روش PCOA و ارتباط آن با میزان تاکسول و پلی فنل‌ها

مهران اوچی ردبیلی[۱]، حسن نورافکن[۲*]، حسنعلی نقدی‌بادی[۳]، ناصر محبعلی‌پور[۴] و اردشیر قادری[۵]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه ازاد اسلامی، میانه، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، گروه باغبانی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و فرآورده‌های ارگانیک، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران، پست الکترونیک: hassannourafcan@gmail.com

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران

۵- استادیار، علوم کشاورزی و گیاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: تاکسول یکی از ارزشمندترین مواد مؤثره موجود در برخی گیاهان است که در شیمی درمانی بر علیه سرطان‌های سینه، معده، تخمدان، کبد، ریه، دهانه رحم و پانکراس استفاده می‌شود. برگ فندق (*Corylus avellana* L.) یکی از گیاهانی است که وجود تاکسول در آن اثبات شده است. جنگل‌های طبیعی مناطق اردبیل، ارسباران و میانه از مناطق مهم ژرم پلاسم‌های فندق می‌باشند. هدف از این پژوهش بررسی و گروه‌بندی نمونه‌های زیر جمعیتی فندق این مناطق براساس نشانگر ژنتیکی SCoT و مقایسه نمونه‌های یک کلاستر با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نظر میزان تاکسول موجود در برگ فندق و خصوصیات فیتوشیمیایی میوه آنها بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش طی سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ انجام شد. در این پژوهش تعداد ۷۸ نمونه تک درخت بومی از جنگل‌های طبیعی فندقلو اردبیل، میانه و ارسباران انتخاب شده (بر حسب فاصله جغرافیایی نمونه‌های هر منطقه جمیعت ان منطقه در نظر گرفته شد) و موقعیت جغرافیایی هر منطقه با GPS ثبت شد. صفات کمّی و کیفی فندق براساس وسعت، خصوصیات جغرافیایی و تنوع احتمالی موجود بین توده‌های فندق شمال‌غرب کشور و براساس توصیف‌گر فندق معاونت تحقیقات و شناسایی ارقام گیاهی، وزارت جهاد کشاورزی جمع‌آوری شد. براساس تنوع فنوتیپی، نمونه‌های زیر جمعیتی (تک درخت) انتخاب شده، از قسمت برگ استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. پس از کیفیت سنجی DNA در طیف جذبی ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در نانودراپ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی SCoT، واکنش PCR انجام شد. سپس الکتروفورز نسبت به حضور یا عدم حضور نشانگر (صفر و یک) انجام و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار POP Gene v1.32 مورد ارزیابی قرار گرفتند. از هر گروه بسته به تعداد نمونه‌ها، حداقل دو نمونه انتخاب و میزان تاکسول در برگ آنها استخراج و اندازه‌گیری شد. از میوه‌های فندق نمونه‌های انتخابی گزینش و میزان خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، فنل‌ها، اسیدهای چرب و میزان برخی عناصر معدنی اندازه‌گیری شد.

نتایج: براساس وجود و عدم وجود باندهای ژنتیکی SCoT در ژنوم نمونه‌های انتخابی فندق از مناطق مختلف آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCOA) انجام شد. هبستگی (ضریب همبستگی مانتل) بین ضریب تشابه براساس گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر SCoT و ضرایب تشابه با استفاده از داده‌های مشخصات جغرافیایی برابر با ۰/۵۴ محاسبه شد که معنی‌دار بود (Pvalue<.05). بررسی میزان محتوی اطلاعات ژنتیکی (PIC) براساس پرایمرهای SCoT مورد استفاده نشان داد که در گروه‌های جدا شده براساس PCoA میزان PIC متفاوت بود. بین گروه‌های ژنوتیپی از نظر صفات محتویات پروتئینی، محتویات اسیدهای چرب، فیبر، کربوهیدرات، فنل تام، پالمیتیک‌اسید. تفاوت معنی‌دار در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ وجود داشت و از نظر بقیه صفات تفاوت

معنی‌دار دیده نشد.
مقایسه میانگین گروه‌های ژنوتیپی فندق نشان داد که از نظر محتوی پروتئینی، درصد اسیدهای چرب، میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پالمیتیک اسید، بیشترین میانگین مربوط به ژنوتیپ‌های گروه ۱ بوده است. مقادیر ضرایب تشابه در گروه‌بندی براساس نشانگر SCOT و ضرایب تشابه حاصل نتایج نشان داد، میزان همبستگی بین ضرایب محاسبه شده ۰/۷۶ است. ارزیابی جریان ژنی (N_m) وشاخص تثبیت (F_{st}) در درون جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های فندق بیشترین میزان جریان ژنی N_m و کمترین میزان F_{st} را در کل جمعیت‌ها (F_{st}=۰/۵۵ و N_m=۰/۷) را نشان دادند که همین روند در گروه‌ها نیز رعایت شده بود هر چند که میزان ضریب N_m در ژنوتیپ‌های گروه ۱ بود (۸۱/= N_m). میزان هتروزیگوسیتی بین جمعیتی (D_{st}) ۰/۱۵ برآورد شد.
نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که همواره در مطالعه صفات فیتوشیمیایی مستلزم زمان و انجام آزمایشات متعدد است، وجود نشانگرهای نشانگر قابل اعتماد تکرارپذیر برای یافتن ژنوتیپ‌های با شاخصه‌های فیتوشیمیایی و تاکسول بالا ضرورت پیدا می‌کند. مقدار پایین پارامتر جریان ژنی (Nm) نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه میل به افتراق بالایی دارند. وجود تنوع ژنتیکی بالا درون جمعیت‌ها امکان اجرای برنامه‌های اصلاحی را توجیه‌پذیر می‌سازد. بالا بودن تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌ها مطالعه نشانگر SCoT (بیشترین۰/۹۷ کمترین ۰/۸۱) نشان داد جمعیت‌ها به یک منشاء و زمینه ژنتیکی تعلق دارند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، خصوصیات فیتوشیمیایی، ژرم‌پلاسم، نشانگر مولکولی.

مقدمه

فندق با نام علمی *Corylus avellana* L. زیر خانواده Corolidae و جنس *Corylus*، از رده Mgnolopsidae می‌باشد. فندق با عدد کروموزومی (2n=2x=22) گیاهی تک پایه، خزان پذیر، ناهم‌رس و خودناسازگار از نوع اسپروفیتیک می‌باشد. جنس *Corylus* شامل ۲۵ گونه است که تنها ۹ گونه آن از نظر اقتصادی و به‌نژادی اهمیت دارد (Rodriguez *et al.*, 1989). این گیاه بومی اروپا، آسیای صغیر و قفقاز است. اکثر گونه‌های فندق درختچه بوده و بندرت به صورت درختی دیده می‌شوند. پراکنش جغرافیایی و رویشگاه‌های اصلی فندق در نیمکره شمالی و در کرانه دریاها و اقیانوس‌ها متمرکز بوده که دارای زمستان ملایم و تابستان‌های خنک می‌باشند (Hamid, 2015). رویشگاه‌های طبیعی فندق در ایران اغلب در کمربند فندق‌خیز واقع در مناطق اشکورات، ناوان، دینوچال، گلی داغ، الموت، طارم و جنگل فندقلوی اردبیل قرار دارند (Alasalvar *et al.*, 2003a). مغز فندق به دلیل داشتن حدود ۶۰٪ روغن، ۱۷/۵٪ کربوهیدرات، ۱۳ تا ۱۷ درصد پروتئین و مقادیر زیادی اسیدهای چرب ضروری، مواد معدنی و ویتامین‌ها، می‌تواند نقش مهمی در تغذیه و سلامتی انسان داشته باشد (Alasalvar *et al.*, 2003a). فندق تنها میوه‌ای است که همه ۲۰ اسید آمینه ضروری بدن را دارا می‌باشد و علاوه بر آن، به علت داشتن فسفر زیاد می‌تواند باعث تقویت و بهبود عملکرد مغز شود (Alasalvar *et al.*, 2003b). فندق از نظر ترکیبات فیتوشیمیایی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. ترکیبات متابولیتی ثانویه مانند فیتواسترول‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، فنل و ماده دی ترپنوئیدی ضد سرطان به نام پاکلی تاکسل (Paclitaxel)، این محصول را از لحاظ دارویی نیز حائز اهمیت نموده است (Ravichandra *et al.*, 2018). نکته مهم، استحصال تاکسول از بخش‌های زائد و عمدتاً بدون استفاده گیاه مانند پوسته سبز، پوست درخت و برگ مسن خزان شده پای درخت است (Santos *et al.*, 2004).

تعیین تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی است (Crozier, 1997). ارزیابی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و ترکیبات فیتوشیمیایی میوه یکی از ابزارهای قابل اطمینان برای شناسایی و توصیف تنوع زیستی ژنوتیپ‌های فندق است (Vahdati *et al.*, 2020). با توجه به اینکه اولین گام در هر برنامه اصلاحی، داشتن تنوع ژنتیکی بالا برای نیل به اهداف مهم است، لذا می‌بایست منابع ژرم پلاسم جمع‌آوری و ارزیابی گردد (Nass & Paterniani,

2000) با بررسی تنوع ژنتیکی در یک گونه گیاهی علاوه بر شناسایی ژنوتیپ‌های موجود و ایجاد کلکسیون جهت حفظ ذخایر ژنتیکی، می‌توان سازماندهی و مدیریت بهتر ژرم‌پلاسم موجود را به خوبی انجام داد و زمینه را برای کشت ژنوتیپ‌های امیدبخش فراهم آورد (Migicovsky *et al.*, 2019). نشانگرهای DNA کاربردهای متعددی در مطالعات تنوع ژنتیکی در گیاهان دارند. این نشانگرها شامل ISSR،SRAP و SSR است (Mahmoud & Abd El-Fatah, 2020). پلی‌مورفیسم‌های هدف‌دار کدون شروع (Start Codon Targeted Marker) (SCoT) نشانگرهای غالب و قابل تکرار هستند که براساس ناحیه حفاظت‌شده کوتاه در ژن‌های گیاهی اطراف کدون اغاز ترجمه ATG هستند و معمولاً از یک پرایمر ۱۸ واحدی در سنجش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) استفاده می‌کنند (Collard & Mackill, 2009). سطوح نوترکیبی کمتر بین نشانگرهای SCoT نسبت به نشانگرهای (Random amplification of polymorphic DNA) RAPD، (Inter-Simple Sequence repeats) ISSR یا (Simple Sequence Repeats) SSR، استفاده مستقیم از این نشانگر را در برنامه‌های اصلاحی ممکن می‌سازد (Ritland *et al.*, 2011). هدف از این پژوهش، بررسی تجزیه و تحلیل تنوع زیستی ژنوتیپ‌های فندق در زیستگاه‌های فندق شمال‌غرب کشور ایران براساس نشانگر مولکولی SCoT و ارتباط آن با صفات آنتی‌اکسیدانی و صفات مرتبط با مواد مؤثره دارویی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۸–۱۳۹۹ انجام شده است. در این پژوهش تعداد ۷۸ نمونه تک درخت بومی از جنگل‌های طبیعی فندقلو اردبیل، میانه و ارسباران انتخاب شده (بر حسب فاصله جغرافیایی نمونه‌های هر منطقه جمیعت آن منطقه در نظر گرفته شد) و موقعیت جغرافیایی هر منطقه با GPS ثبت شد (جدول ۱). صفات کمّی و کیفی فندق براساس وسعت، خصوصیات جغرافیایی و تنوع احتمالی موجود بین توده‌های فندق شمالغرب کشور و براساس توصیف‌گر فندق معاونت تحقیقات و شناسایی ارقام گیاهی، وزارت جهاد کشاورزی جمع‌آوری شد. از هر تک درخت تعدادی برگ سالم برداشت و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس از نمونه‌های جمع آوری شده، استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Galderisi *et al.*, 1999). پس از کیفیت سنجی DNA در طیف جذبی ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در نانودراپ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی SCoT (جدول ۲)، واکنش PCR انجام شد. سپس الکتروفورز نسبت به حضور یا عدم حضور نشانگر (صفر و یک) انجام و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار POP Gene v1.32 مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین میوه درختان انتخابی برداشت شده و مورد بررسی فیتوشیمیایی قرار گرفت. برای این ژنوتیپ‌ها صفات کیفی در گروه‌های ژنوتیپی براساس نشانگر SCoT بررسی شد. اندازه‌گیری صفات شامل درصد روغن، میزان پروتئین، کربوهیدرات، اسیدهای چرب، فنل تام و همچنین غلظت تاکسول نیز با روش‌های مربوطه انجام شد. درصد روغن به روش سوکسله با حلال اتر نفت (Nengroo *et al.*, 2022)، میزان پروتئین با روش کجلدال (Aydemir *et al.*, 2014) و کربوهیدرات کل به روش اشلیگل بررسی شد (Schlegel, 2011). برای تعیین غلظت تاکسول از دستگاه HPLC مدل (Knauer, Germany) مجهز به ستون C-18 (250 µm × 4.6mm، Teknokrome, Germany Perfectsil Target ODS3,5) و به کمک استاندارد تاکسول (SIGMA) استفاده شد (Salehi *et al.*, 2020). پروفایل اسیدهای چرب، با استفاده از سوکسله روغن استخراج و با دستگاه کروماتوگرافی گازی پروفایل اسیدهای چرب تعیین شد (Amaral *et al.*, 2006). میزان فنل تام با روش فولین سیو کالتیو (Folin Ciocalteu) (Cerulli *et al.*, 2018) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی براساس روش DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl-Hydrate) اندازه‌گیری شد (Riethmüller *et al.*, 2016). بعد از عصاره‌گیری فسفر به روش کالریمتری، عناصر کلسیم، پتاسیم، منیزیم، آهن و روی با استفاده از دستگاه جذب اتمی (مدل AS. A 2000- CTA) اندازه‌گیری شدند و میزان عناصر مغز فندق بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده خشک بیان شد (Ciemniewska-Żytkiewicz *et al.*, 2015).

جدول ۱- مشخصات و موقعیت جغرافیایی برخی از نمونه‌های جمع‌آوری شده
Table 1. Characteristics and geographic location of some of the samples

No.	Province	Location name	Latitude (N)	Longitude (E)
1	Ardabil	Asighran	38° 24'.508 N	48° 32'.966 E
2	Ardabil	Asighran	38° 23'.997 N	48° 32'.488 E
3	Ardabil	Asighran	38° 23'.760 N	48° 33'.493 E
4	Ardabil	Fandoghloo	38° 17'.721 N	48° 38'.009 E
5	Ardabil	Fandoghloo	38° 17'.790 N	48° 37'.935 E
6	Ardabil	Fandoghloo	38° 17'.645 N	45° 38'.005 E
7	Ardabil	Mehdi Posti	38° 20'.109 N	48° 35'.547 E
8	Ardabil	Mehdi Posti	38 ° 20'.236 N	48° 35.'669 E
9	Ardabil	Mehdi Posti	38° 20'.215 N	48° 35'.700 E
10	East Azerbaijan	Miyaneh	37° 65'.933 N	47° 50'.340 E
11	East Azerbaijan	Miyaneh	37° 46'.081N	47° 50'.376 E
12	East Azerbaijan	Miyaneh	37° 46'.145N	47° 50'.409 E
13	East Azerbaijan	Arasbaran	38° 21'.755 N	47° 16'.338 E
14	East Azerbaijan	Arasbaran	38° 21'.793 N	47° 16'.546 E
15	East Azerbaijan	Arasbaran	38° 21'.965 N	47° 16'.490 E
16	Gilan	Astara	38° 42'.271 N	48° 86'.892 E
17	Gilan	Astara	38° 42'.278 N	48° 86'.902 E

جدول ۲- توالی و مشخصات پرایمرهای **SCoT** مورد استفاده در مطالعه
Table 2. Sequences and specifications of SCoT primers used in the study

Name	Sequence	Tm (c)	GC content%
SC3	CAACAATGGCTACCACCG	55.2	55.60%
SC4	CAACAATGGCTACCACCT	53.5	50%
SC5	CAACAATGGCTACCACGA	54	50%
SC6	CAACAATGGCTACCACGC	55.9	55.60%
SC7	CAACAATGGCTACCACGG	55.2	55.60%
SC8	CAACAATGGCTACCACGT	54.3	50%
SC9	CAACAATGGCTACCAGCA	54.3	50%
SC11	AAGCAATGGCTACCACCA	55.4	50%
SC12	ACGACATGGCGACCAACG	59.8	61.10%
SC17	CATGGCTACCACCGGCCC	61.9	72.20%
SC18	ACCATGGCTACCACCGCG	61.5	66.70%
SC19	GCAACAATGGCTACCACC	55.4	55.60%
SC20	AACCATGGCTACCACCGC	59.1	61.10%
SC21	CACCATGGCTACCACCAT	55.6	55.60%
SC23	ACCATGGCTACCACGGGC	61.1	66.70%

آنالیز داده‌ها

داده‌های حاصل از مشخصات کیفی

داده‌ها ابتدا با استفاده از آمار توصیفی تجزیه‌وتحلیل شده و داده‌ها به روش UPGMA مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند (Palmé & Vendramin, 2002). داده‌های مربوط به حضور (+) و عدم حضور (-) نوارهای پلی‌مورف ژنوتیپ‌های مربوط به نوارهای SCoT نیز به روش Jaccard مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفت (Belinchón *et al.*, 2016). با توجه به معنی‌داری تأثیر نوارها در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بررسی دیگری براساس نوار مؤثر SCoT به روش PCoA انجام و گروه‌بندی در ۴ گروه جداگانه انجام گرفت. از هر گروه بسته به حجم تعداد ژنوتیپ اولیه به

صورت تصادفی تعدادی نمونه انتخاب و در میوه‌ها و برگ، ارزیابی صفات فیتوشیمیایی آنها جمعاً در ۱۷ ژنوتیپ صورت گرفت. میزان انطباق‌پذیری گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آنالیز داده NTsys ver2 و SPSSv22 انجام شد و همبستگی بین ماتریس شباهت‌های مربوط به گروه‌بندی‌ها براساس متغیرهای کیفی و متغیرهای کمّی به روش آزمون مانتل (Mantel Test) محاسبه گردید.

نتایج

براساس وجود و عدم وجود باندهای ژنتیکی SCoT در ژنوم نمونه‌های انتخابی فندق از مناطق مختلف آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCOA) انجام و نتایج آن در بای پلات درج شده است (شکل‌های ۱ و ۲). ژنوتیپ‌های ۳۵، ۵، ۱۹، ۴۴، ۴۶، ۴۳، ۷۰، ۵۰ و ۵۴ در گروه اول، ژنوتیپ‌های شماره ۲۶، ۲۴، ۲۳، ۲۸، ۲۵، ۲۳، ۳۱، ۴، ۳۳، ۲۰ و ۲۱ در گروه دوم، ژنوتیپ‌های ۲، ۹، ۱، ۳، ۱۴، ۳۴، ۸، ۶۷، ۷، ۱۰، ۶، ۱۱ و ۷۲ در گروه سوم و بقیه ژنوتیپ‌ها در گروه چهارم قرار گرفتند. هبستگی (ضریب همبستگی مانتل) بین ضریب تشابه براساس گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر SCoT و ضرایب تشابه با استفاده از داده‌های مشخصات جغرافیایی برابر با ۰/۵۴ محاسبه شد که معنی‌دار بود (Pvalue< 0.05).

بررسی میزان محتوی اطلاعات ژنتیکی (PIC) براساس پرایمرهای SCoT مورد استفاده نشان داد که در گروه‌های (جدول ۳) جدا شده براساس PCoA میزان PIC متفاوت بود (جدول ۵). به‌طوری که گروه ۱ با ۱۱ ژنوتیپ بیشترین محتوای ژنتیکی را از طریق پرایمرهای SC3، SC11، SC17 و SC23 تبیین کرده بود. اما در گروه دوم گروه‌بندی براساس SCoT بیشترین میزان محتوی ژنتیکی را پرایمرهای SC9، SC21 و کمترین محتوی ژنتیکی را SC21 به خود اختصاص داده بود. در ژنوتیپ‌های گروه سوم، بیشترین محتوی ژنتیکی PIC را پرایمرهای SC3، SC11 و SC23 را نشان داده است. اما در ژنوتیپ‌های گروه چهارم پرایمرهای SC3، SC18، SC20، SC23 و SC9 بیشترین محتوی اطلاعات ژنتیکی را به خود اختصاص داده بودند. در صورتی‌که در کل جمعیت مورد مطالعه حداکثر محتوی ژنتیکی را پرایمرهای SC3، SC9، SC18، SC20، SC23 و SC12 به خود اختصاص داده بودند. وجود محتوای ژنتیکی بالا در پرایمرهای SC3، SC9، SC23 نشان‌دهنده پتانسیل بالا و کاربردی این پرایمرها در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های فندق می‌باشد.

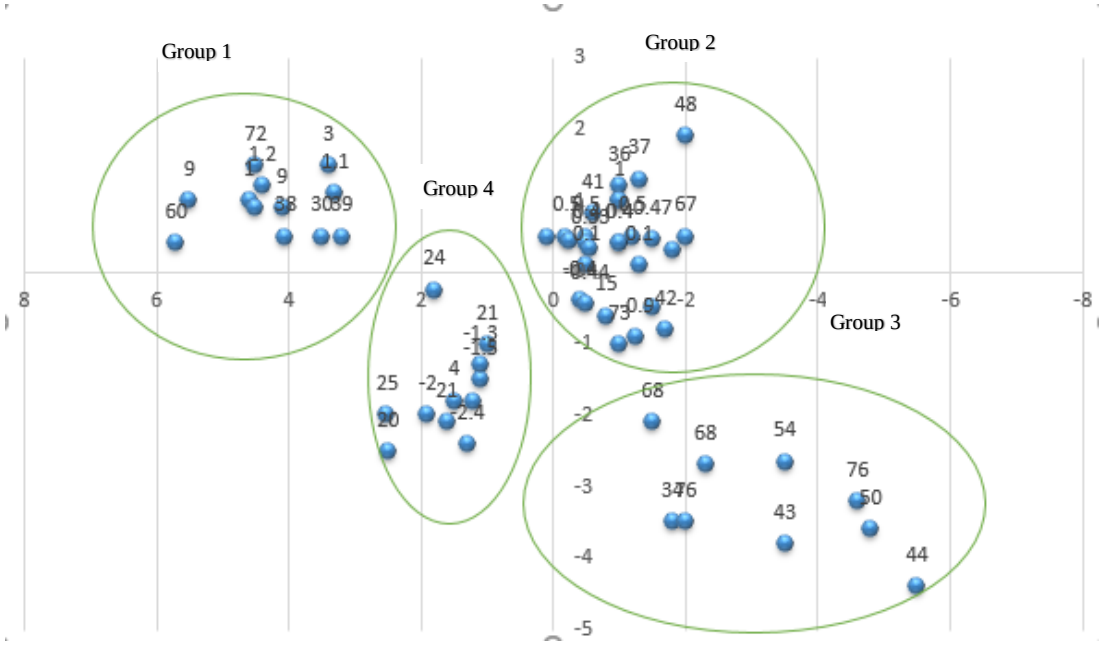
نتایج تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی فندق و تاکسول برگ برای گروه‌های ژنوتیپی حاصل از گروه‌بندی PCoA در جدول ۳ درج شده است. بین گروه‌های ژنوتیپی از نظر صفات محتویات پروتئینی براساس روش کجلدال، محتویات اسیدهای چرب، فیبر، کربوهیدرات، فنل تام و پالمیتیک اسید تفاوت معنی‌دار در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ وجود داشت و از نظر بقیه صفات تفاوت معنی‌دار دیده نشد (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس براساس گروه‌های جمعیتی فندق بررسی شده از نظر صفات فیتوشیمیایی و مواد مؤثره دارویی

Table 3. Variance analysis results based on hazelnut genotypic groups examined in terms of phytochemical traits and effective medicinal substances

Source of Deviations	df	Protein g/100g dry mat	Fat g/100 dry mat	Fiber g/100g dry mat	Total phenols Mg (Gallic Acid)/g	Pamitic acid g/100g dry mat	Taxol (g/100g) dry mat	Flavonoids Mg(Quercetin)/g	Antioxidants µMol TE/g
Between Groups	3	77/36**	5/37**	9/75**	0/154**	3/61**	0/46*	10/52ns	0/024ns
Within Groups	12	0/114	56/06	1/34	0/04	0/56	0/007	9/46	0/13

ns= No Significant, *P<0.05, **P<0.01



شکل ۱- بای پلات گروه‌بندی ژنوتیپ ها برای فندق با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی SCoT

Figure 1. Biplot grouping of genotypes for hazelnut using SCoT genetic markers

Populations 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 from Mehdi Posti area of Ardabil province, 34 from Abibigloo Region of Ardabil province and 72 from Tushmanloo Region of East Azerbaijan province were palced in the first group, population 5 from Mehdi Posti Region of Ardabil province, 19 from Assigran Region of Ardabil province, 35 from Abibigloo Region of Ardabil province, 43, 44, 46, 50, 54 from Arasbaran Region of East Azerbaijan province and 70 from Tushmanloo Region of East Azerbaijan province were placed in the third group, populations 4 from Mehdi Posti Region of Ardabil province, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 and 28 from Assigran Region of Ardabil province and 31, and 33 from the Abibigloo Region of Ardabil province were placed in the fourth group and the rest samples were placed in the second group.

مقایسه میانگین گروه‌های ژنوتیپی فندق نشان داد (جدول ۴) که از نظر محتوی پروتئینی، درصد اسیدهای چرب، میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اسید پالمیتیک، بیشترین میانگین مربوط به ژنوتیپ‌های گروه ۱ بوده است. گروه دوم از نظر محتویات پروتئینی، درصد فنل، درصد اسیدهای چرب، میزان فنل تام، تاکسول و پالمیتیک اسید، حداقل مقدار را به خود اختصاص داده بود. گروه ژنوتیپ‌های سوم هم در حد بینابین میانگین صفات قرار داشت. اما گروه ژنوتیپ‌های چهارم، از نظر درصد فلاونوئیدها و تاکسول دارای میانگین بالاتر بود.

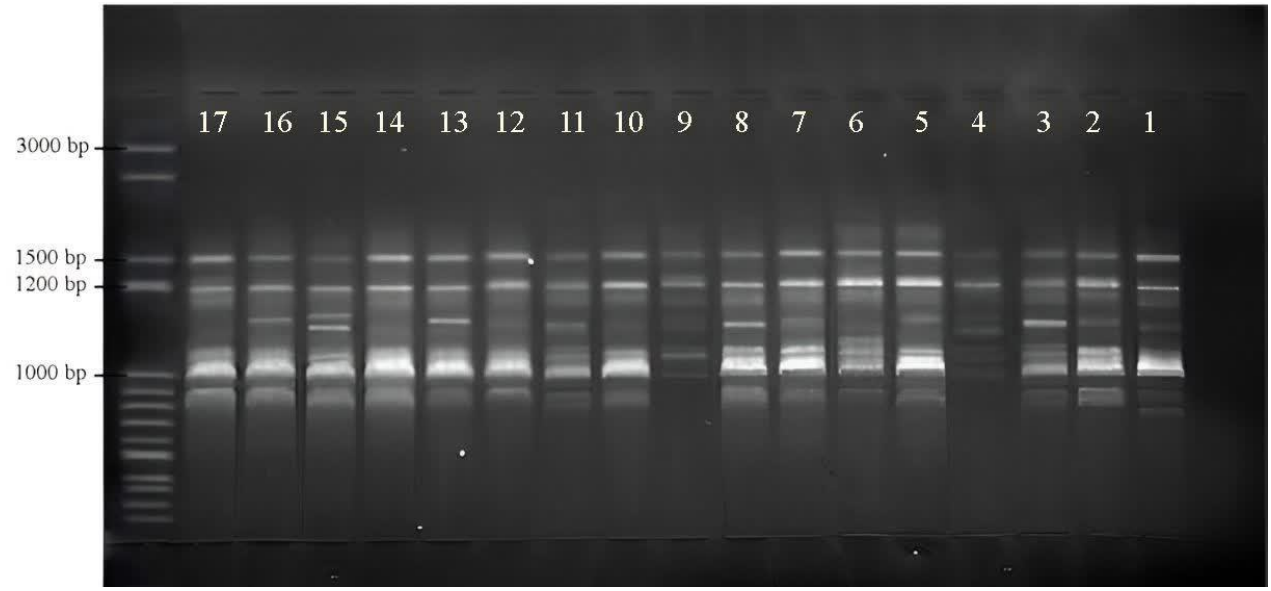
مقادیر ضرایب تشابه در گروه‌بندی براساس نشانگر SCOT و ضرایب تشابه حاصل از گروه‌بندی مورد آنالیز همبستگی مانتل قرار گرفت. نتایج نشان داد، میزان همبستگی بین ضرایب محاسبه شده ۰/۷۶ است که نشان دهنده همخوانی گروه‌بندی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین گروه‌های جمعیتی فندق براساس صفات مختلف فیتوشیمیایی

Table 4. Comparison of average genotype groups of hazelnut based on Phytochemical traits

Group	Protein g/100g dry mat	Fat g/100 dry mat	Fiber (g/100g) dry mat	Total Mg (Gallic Acid)/g	Flavonoids Mg (Quercetin)/g	Antioxidants µMol TE/g	Taxol (g/100g) dry mat	Pamitic acid (10mg/ml) (g/100g) dry mat
1	2.9 a	4.4 a	13.3b	0.67 b	2.5d	1.58 a	0.42a	8.7a
2	2.4 b	3.5a	10.11c	0.63c	4.8b	1.46a	0.36d	6.2c
3	2.6 b	39.4 a	8.1d	0.86a	3.7c	1.45a	0.55b	8.8a
4	2.73a	33.8 a	15.1a	0.65b	6.4a	1.38a	0.6a	7.9a

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan's test).



شکل ۲- تصویر باندهای ایجاد شده حاصل از واکنش PCR برای نشانگر SCoT11 برای جمعیت‌های مورد مطالعه

Figure 2. Bands generated from the PCR reaction for the ScoT11 marker

The populations include 1-3: Asigran, 4-6: Ardabil (Abi Beigloo), 7-9: Mehdiposti, 10-12: Arasbaran, 13-15: Miyaneh and 16-17: Fertil and Daviana varieties

ارزیابی جریان ژنی (Nm=estimate of gene flow (form Gst or GcsE.g., Nm=0.5(1-Gst)/Gst و (N_m) و شاخص تثبیت (Fixation index) (F_{st}) در درون جمعیت‌ها محاسبه شد و ژنوتیپ‌های درون فندق بیشترین میزان جریان ژنی N_m و کمترین میزان F_{st} را در کل جمعیت‌ها (F_{st}=۰/۵۵ و N_m=۰/۷) را نشان دادند در صورتی که همین روند در گروه‌ها نیز رعایت شده بود هرچند که میزان ضریب N_m در ژنوتیپ‌های گروه ۱ بود (۸۱/= N_m).

میزان هتروزیگوسیتی بین جمعیتی (D_{st}) ۰/۱۵ برآورد شد که نشان‌دهنده پایین بودن میزان تنوع بین جمعیت‌ها نسبت به تنوع درون جمعیت‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه بود هرچند که اختلاف در گروه ۴ بیشترین هتروزیگوتی بین جمیعت دیده شد.

میزان جریان ژنی (N_m) زمانی که بالاتر از یک باشد جمعیت‌ها در حال حفظ ارتباط ژنتیکی در طول زمان هستند و زمانی که کوچک‌تر از یک برآورد گردد جمعیت‌ها در حال واگرایی و دور شدن ژنتیکی هستند. در این بررسی میانگین جریان ژنی (N_m=۰/۷) بیانگر پایین بودن تبادل ژنی بین جمعیت های مورد مطالعه می‌باشد هر چند که مقدار آن در ژنوتیپ‌های گروه یک ۰/۱۸ بود (جدول‌های ۵ و ۶).

جدول ۵- ضرایب هتروزیگوسیتی و جریان ژنی کل جمعیت و گروه‌های جمعیتی براساس نشانگر ژنتیکی SCoT

Table 5. Heterozygosity coefficients and gene flow of the entire population and population groups based on the SCoT genetic marker

Populations	Population Size	Heterozygosiy Within Population H_S	Heterozygosiy Between Population D_{st}	Gene Flow N_m	Fixation Index Fst
Total	78	0.23	0.15	7	0.55
Group1	11	0.41	0.03	0.81	0.66
Group2	11	0.32	0.1	0.69	0.34
Group3	13	0.11	0.22	0.65	0.5
Group4	43	0.14	0.31	0.62	0.6

Populations and groups are the same as Figure 1

جدول ۶- میزان محتوی اطلاعات ژنتیکی (PIC) در گروه‌های ژنوتیپی طبقه بندی شده براساس PCoA

Table 6. The amount of genetic information content (PIC) in genotypic groups classified according to PCoA

Marker	PIC GR1	PIC GR2	PIC GR3	PIC GR4	PIC Total
Sc3	0.63	0.38	0.57	0.46	0.46
Sc4	0.5	0.34	0.34	0.4	0.38
Sc5	0.51	0.35	0.45	0.4	0.4
Sc6	0.52	0.36	0.47	0.41	0.41
Sc7	0.52	0.36	0.46	0.4	0.4
Sc8	0.53	0.38	0.47	0.42	0.42
Sc9	0.55	0.67	0.4	0.44	0.45
Sc11	0.66	0.5	0.6	0.4	0.41
Sc12	0.45	0.3	0.4	0.44	0.43
Sc17	0.55	0.38	0.5	0.43	0.43
Sc18	0.47	0.3	0.4	0.44	0.44
Sc19	0.53	0.37	0.47	0.41	0.41
Sc20	0.47	0.31	0.4	045	0.44
Sc21	0.47	0.52	0.32	0.36	0.33
Sc23	0.57	0.4	0.5	0.45	0.45

بحث

فندق گیاهی باغی با ارزش اقتصادی بالا در صنایع غذایی و دارویی بوده و شرایط و استرس‌های محیطی از جمله کم‌آبی و سرما ایجاب می‌کند علاوه بر بررسی تنوع ژنتیکی، استراتژی‌های اصلاحی آن باید در نظر گرفته شود. بررسی تنوع و اهمیت دادن به توده‌های بومی که در طول زمان انتخاب طبیعی روی آن صورت گرفته و همواره تجمعی از ژن‌های مفید و سازگار را دارد در برنامه‌های اصلاحی در درجه اول اهمیت قرار دارد.

رگه جنگل‌های طبیعی فندق در منطقه اردبیل و نیز جنگل‌های طبیعی منطقه ارسباران و میانه جنگل‌های طبیعی بوده و از ذخایر ژرم پلاسم مهم فندق ایران و دنیاست. بنابراین این پژوهش با هدف مطالعه تنوع ژنتیکی، فیتوشیمیایی، مورفوفیزیولوژیکی، صفات کیفی و میزان انطباق پذیری تنوع موجود با مؤلفه‌های اقلیمی صورت گرفت. از فرضیه‌های این پژوهش بررسی جمعیت‌های مختلف فندق ارسباران میانه و اردبیل از نظر تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی می‌باشد که با توجه به نتایج، تنوع معنی‌دار بین جمعیت‌های مورد مطالعه دیده شد. وجود اختلاف معنی‌دار بین جمعیت‌ها از نظر تعدادی از صفات ژنتیکی و فیتوشیمیایی نشانگر غنای ژنتیکی بین جمعیت‌هاست.

ژرم‌پلاسم فندق ایران به‌عنوان یکی از مراکز تنوع فندق جهان، به منظور توسعه سریع برنامه‌های به‌نژادی و همچنین حفظ و استفاده از ژرم پلاسم نیاز به شناسایی و مطالعه همه جانبه دارد (Mehlenbucher & Erdogan, 2000؛ Farrokhi *et al*., 2011). نشانگر مولکولی SCoT که براساس کدون آغاز طراحی شده است، برای مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی قابلیت مناسبی دارد و نتایج حاصل از آن به دلیل نشان دادن چندشکلی در نواحی محافظت شده قابل اعتماد است (Zarei & Erfani-Moghadam, 2021؛ Zhang *et al*., 2015). در این پژوهش مطالعه همزمان خواص فیتوشیمیایی و ژنتیکی نشان داد، تنوع وسیعی میان جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی نشان داد، به دلیل بزرگتر بودن واریانس ژنتیکی درون جمعیت‌ها از واریانس بین جمعیت‌ها، هر کدام از جمعیت‌ها از نظر پس زمینه ژنتیکی با هم تفاوت دارند. ارزیابی الل‌های شناسایی شده توسط نشانگر SCoT با صفات فیتوشیمیایی نشان داد که واریانس مشاهده شده در

صفات فیتوشیمیایی تحت تأثیر توأم عوامل محیطی و ژنتیکی قرار دارند.

نشانگرهای مبتنی بر DNA در بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی و باغی و حتی گیاهان دارویی استفاده شده است (De Masi *et al.*, 2006). این نشانگرها به دلیل تکرارپذیری و حساسیت بالا و نیز سریع بودن در اخذ نتایج همچنان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Poczai *et al.*, 2013). SCoT یک نشانگر ژنتیکی مبتنی بر DNA است که تنوع و تفاوت‌های ژنتیکی در توالی مربوط به آغاز رونویسی را در سطح DNA نشان می‌دهد. این نشانگر به‌دلیل تکرارپذیری و سرعت و دقت بالا در محصولات باغی و گیاهی استفاده شده است (Rajesh *et al.*, 2015). همانطور که در نتایج این مطالعه نشان داده شد، پرایمرهای SCoT طراحی شده دارای مقادیر قابل توجهی محتویات اطلاعات ژنتیکی (PIC) بودند. بیشترین اطلاعات ژنتیکی در گروه‌ها و کل ژنوتیپ‌ها مربوط به SCoT3، SCoT9 و SCoT23 بود. همین عامل باعث می‌شود که در فندق براساس تنوع ژنتیکی مبتنی بر DNA از این نشانگرها بتوان بهره برد. در گونه‌هایی مانند، *Elymus sibiricus*، جنس‌های پسته ایرانی(*Pistacia*) ((Zarei & Erfani-Moghadam, 2021)، جو دوسر و جنس *Echinacea* از نشانگر SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است (Jedrzejczyk, 2020). هتروزیگوسیتی درون جمعیتی در ژنوتیپ‌های گروه ۱ (۰/۴۱) تا ۰/۱۱ در گروه ۳ متغیر بود. هر چند که هتروزیگوسیتی بین جمعیت در ژنوتیپ‌های گروه ۴ بیشترین (۰/۳۱) و در گروه ۱ حداقل (۰/۳) بود. تفاوت هتروزیگوسیتی می‌تواند ناشی از شرایط محیطی و گرایش طبیعی باشد. همچنین فرایندهایی همچون جهش و مهاجرت می‌تواند عامل تمایز باشد فلور ژنی در گروه‌های براساس SCoT نسبتاً بالا بود به‌طوری که در گروه ۱ به میزان ۰/۸۱ و حداقل در گروه ۴ به میزان ۰/۶۱ برآورد شد.

تجزیه واریانس محاسبه میزان واریانس ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع و تمایز جمعیت‌ها از نظر صفات فیتوشیمیایی بود (جدول ۶). بنابراین، اگر هدف گزینش برای صفات فیتوشیمیایی و تاکسول باشد بهتر است از ژنوتیپ‌های گروه‌های ۳ و ۱۴ انتخاب شود ولی اگر استفاده به‌عنوان خوراکی و در صنایع تبدیلی ازجمله شکلات‌سازی باشد، بهتر است از ژنوتیپ‌های گروه ۱ استفاده شود.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت از آنجایی‌که همواره در مطالعه صفات فیتوشیمیایی مستلزم زمان و انجام آزمایشات متعدد است، وجود نشانگرهای نشانگر قابل اعتماد تکرارپذیر برای یافتن ژنوتیپ‌های با شاخصه‌های فیتوشیمیایی و تاکسول بالا ضرورت پیدا می‌کند. مقدار پایین پارامتر جریان ژنی (Nm) نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه میل به افتراق بالایی دارند. وجود تنوع ژنتیکی بالا درون جمعیت‌ها امکان اجرای برنامه‌های اصلاحی را توجیه پذیر می‌سازد. بالا بودن تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌ها مطالعه نشانگر SCoT (بیشترین ۰/۹۷ و کمترین ۰/۸۱) نشان داد جمعیت‌ها به یک منشأ و زمینه ژنتیکی تعلق دارند. سیستم نشانگری SCoT قابلیت شناسایی و گروه‌بندی جمعیت‌های فندق را داشت.

References

- Alasalvar, C., Shahidi, F. and Cadwallader, K.R., 2003a. Comparison of natural and roasted turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(17): 5067-5072.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C.M. and Ohshima, T., 2003b. Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 1. Compositional characteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(13): 3790-3796.
- Amaral, J.S., Casal, S., Citová, I., Santos, A., Seabra, R.M. and Oliveira, B.P., 2006. Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition.

European Food Research and Technology, 222: 274-280.
- Aydemir, L.Y., Gökbulut, A.A., Baran, Y. and Yemenicioğlu, A., 2014. Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. Food Hydrocolloids, 36: 130-142.
- Belinchón, R., Coppins, B.J., Yahr, R. and Ellis, C.J., 2016. The diversity and community dynamics of hazelwood lichens and bryophytes along a major gradient of human impact. Plant Ecology & Diversity, 9: 359-370.
- Cerulli, A., Masullo, M., Montoro, P., Hošek, J., Pizza, C. and Piacente, S., 2018. Metabolite profiling of "green" extracts of *Corylus avellana* leaves by 1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 160: 168-178.
- Ciemniewska-Żytkiewicz, H., Bryś, J., Sujka, K. and Koczoń, P., 2015. Assessment of the hazelnuts roasting process by pressure differential scanning calorimetry and MID-FT-IR spectroscopy. Food Analytical Methods, 8: 2465-2473.
- Collard, B.C. and Mackill, D.J., 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant molecular biology reporter, 27: 86-93.
- Crozier, R.H., 1997. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny, and conservation worth. Annual Review of Ecology and Systematics, 243-268.
- De Masi, L., Siviero, P., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F. and Laratta, B., 2006. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). European Food Research and Technology 223: 273-281.
- Farrokhi, J., Darvishzadeh, R., Naseri, L., Mohseni Azar, M. and Hatami Maleki, H., 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian apple (Malus×domestica Borkh.) cultivars and landraces using simple sequence repeat markers. Australian Journal of Crop Science, 7: 815-821
- Galderisi, U., Cipollaro, M., Di Bernardo, G., De Masi, L., Galano, G. and Cascino, A., 1999. Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis. Plant Cell Reports, 18: 652-655.
- Hamid, S.A., 2015. Chemical and biochemical aspects of seed dormancy and recalcitrance in hazelnuts (*Corylus Avellana* L.). Student thesis, Doctoral Thesis, Teesside University, UK., 289p.
- Jedrzejczyk, I., 2020. Genome size and SCoT markers as tools for identification and genetic diversity assessment in Echinacea genus. Industrial crops and products, 144: 112055.
- Mahmoud, A.F. and Abd El-Fatah, B.E., 2020. Genetic diversity studies and identification of molecular and biochemical markers associated with fusarium wilt resistance in cultivated faba bean (*Vicia faba*). The plant pathology journal, 36(1): 11-28.
- Mehlenbucher, S.A. and Erdogan V., 2000. Incompatibility in wild Corylus species. Acta Horticulturae, 556: 163-170.
- Migicovsky, Z., Warschefsky, E., Klein, L.L. and Miller, A.J., 2019. Using living germplasm collections to characterize, improve, and conserve woody perennials. Crop Science, 59: 2365-2380.
- Nass, L.L. and Paterniani, E., 2000. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. SciELO Brasil, 581-587.
- Nengroo, Z.R., Azeem, M. and Parveen, M., 2022. Fatty acid composition, antioxidant, antifungal activities and functional group analysis of *Corylus jacquemontii* seeds grown in Kashmir. International Journal of Plant Based Pharmaceuticals, 2: 89-97.
- Palmé, A. and Vendramin, G., 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. Molecular ecology, 11: 1769-1779.
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J. and Hyvönen, J., 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. Plant methods, 9: 1-32.
- Rajesh, M., Sabana, A., Rachana, K., Rahman, S., Jerard, B. and Karun, A., 2015. Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT analysis. 3 Biotech, 5(6): 999-1006.
- Ravichandra, V., Ramesh, C., Swamy, M.K., Purushotham, B. and Rudramurthy, G.R., 2018. Anticancer plants: chemistry, pharmacology, and potential applications. Anticancer plants: properties and application. Springer, 485-515.
- Riethmüller, E., Könczöl, Á., Szakál, D., Végh, K., Balogh, G.T. and Kéry, Á., 2016. HPLC-DPPH screening method for evaluation of antioxidant compounds in *Corylus* species. Natural Product Communications, 11(5): 641-644.
- Ritland, K., Krutovsky, K.V., Tsumura, Y., Pelgas, B., Isabel, N. and Bousquet, J., 2011. Genetic mapping in conifers. Genetics, genomics and breeding of conifers, 43p.
- Rodriguez, R., Rodriguez, A., Gonzalez, A. and Perez, C., 1989. Hazelnut (*Corylus avellana* L.). Trees II.

Springer, 127-160.
- Salehi, M., Moieni, A., Safaie, N. and Farhadi, S., 2020. Whole fungal elicitors boost paclitaxel biosynthesis induction in *Corylus avellana* cell culture. Plos one, 15(7): e0236191.
- Santos, A., Carvalho, J., Lopes, A., Assunção, A., Silva, A. and Santos, F., 2004. Phenological tree traits and fruit properties of several hazelnut cultivars grown under different microclimates. VI International Congress on Hazelnut, 686(8): 79-86.
- Schlegel, H.B., 2011.Geometry optimization. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 1(5):790-809.
- Vahdati, K., Arab, M.M., Sarikhani, S., Sadat-Hosseini, M., Leslie, C.A. and Brown, P.J., 2020. Advances in persian walnut (*Juglans regia* L.) breeding strategies. Nut and Beverage Crops: 4: 401.
- Zarei, A. and Erfani-Moghadam, J., 2021. SCoT markers provide insight into the genetic diversity, population structure and phylogenetic relationships among three Pistacia species of Iran. Genetic Resources and Crop Evolution, 68: 1625-1643.
- Zhang, J., Xie, W., Wang, Y. and Zhao, X., 2015. Potential of start codon targeted (SCoT) markers to estimate genetic diversity and relationships among Chinese Elymus sibiricus accessions. Molecules, 20(4): 5987-6001.