

## تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های پیاز با استفاده از نشانگر ریزماهواره

زهرا کریمی نافچی<sup>۱</sup>، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی<sup>۲\*</sup> و مصطفی مبلی<sup>۳</sup>  
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان  
(تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۸ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱/۲۸)

### چکیده

به منظور بررسی روابط ژنتیکی توده‌های بومی پیاز ایران و مقایسه با برخی ارقام خارجی، از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره (SSRs) استفاده شد. بر اساس الگوی نواری حاصل، ۱۲ جفت آغازگر ریزماهواره در ۱۸ توده بومی و پنج رقم خارجی الگوی چند شکل و قابل امتیاز دهی تولید کردند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل از دو تا شش آلل با میانگین ۳/۳ آلل متغیر بود و محتوی اطلاعات چند شکل از ۰/۲ تا ۰/۷۶ با میانگین ۰/۵۲ ارزیابی شد که هتروزیگوسیتی بالا را در این توده‌ها نشان داد. میانگین تنوع ژنتیکی درون توده‌ها و ارقام خارجی از ۰/۱۲ تا ۰/۲۸ متغیر بود. تجزیه واریانس مولکولی بر اساس مربع فاصله اقلیدسی تنوع معنی داری را بین و درون توده‌ها و ارقام خارجی پیاز نشان داد ولی میزان واریانس بین ارقام (۰/۴۲) نسبت به درون ارقام (۰/۵۸) کمتر بود. گروه‌بندی با استفاده از ضریب تشابه نی و الگوریتم UPGMA، توده‌ها و ارقام خارجی را در شش گروه و یک توده مستقل قرار داد. اگر چه گروه بندی بر اساس داده‌های مولکولی تقریباً منطبق با برخی صفات مورفولوژیکی بود ولی به طور کلی با گروه بندی جغرافیایی انطباق نداشت.

**واژه‌های کلیدی:** پیاز خوراکی، ریزماهواره، هتروزیگوسیتی، میانگین تنوع ژنتیکی.

### مقدمه

فراوانی که روی آنها صورت گرفته است، اطلاعات چندانی از روابط ژنتیکی آنها در دست نمی‌باشد. بنابراین ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین توده‌های بومی پیاز به منظور بهره‌گیری از این خزانه ژنی مهم در اصلاح این محصول از اهمیت زیادی برخوردار است.

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی پیاز خوراکی از نشانگرهای مولکولی رپید (RAPD)<sup>۱</sup>، (Moosavizadeh et al., 2006; Sang et al., 2006; Shete et al., 2000; Tani Kawa et al., 2002; Wilkie et al, 1993) و ای.اف.ال.پی (AFLP)<sup>۲</sup>، (Havey et al., 1997; Wako et al., 2005) استفاده بیشتری شده است. بر خلاف سودمندی این نشانگرهای مولکولی، تکرارپذیری پایین

پیاز خوراکی متعلق به جنس *Allium* بوده و از نظر ارزش تولیدی بعد از گوجه‌فرنگی دومین سبزی مهم جهان می‌باشد. در این جنس حدود ۷۵۰ گونه وجود دارد که اغلب آنها سوخ تولید می‌کنند (Ohri et al., 1998). بسیاری از ژنوتیپ‌های پیاز در شمال آفریقا، اروپا و آسیا پیدا شده‌اند. اگرچه سطوح مختلفی از پلوئیدی در جنس *Allium* وجود دارد، ولی بسیاری از گونه‌های مهم دیپلوئیدهای با ۸ جفت کروموزوم ( $2n=2x=16$ ) هستند. به دلیل نزدیکی ایران به خاستگاه پیاز خوراکی در ناحیه آسیای مرکزی و کشت پیاز در نواحی مختلف آن، تنوع ژنتیکی زیادی در بین توده‌های بومی پیاز ایران مشاهده می‌شود (Mobli et al., 2001). اکثر توده‌های پیاز در نواحی مختلف ایران با اسامی محلی نامگذاری شده‌اند و علیرغم مطالعات مورفولوژیکی

1. Random Amplified Polymorphic DNA  
2. Amplified Fragment Length Polymorphism

بعد از انجماد سریع با نیتروژن مایع، تا زمان استخراج دی.ان.آ ژنومی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

استخراج دی.ان.آ از برگ‌های جوان به روش Murray & Thompson (1980) انجام گرفت، با این تفاوت که به بافر استخراج مقدار ۲٪ بتا مریکاپتواتانول<sup>۳</sup> اضافه شد و مرحله خالص‌سازی با مخلوط کلروفرم/ایزوامیل الکل (۲۴:۱) برای هر نمونه دو بار انجام گرفت. تعیین کمیت و کیفیت دی.ان.آ به روش الکتروفورز انجام شد. در این روش پنج میکرولیتر از دی.ان.آ به دست آمده در ژل آگارز ۰/۷٪ در بافر TAE<sup>۴</sup> و مقایسه با تراکم باندی آن با مقدار استاندارد قطعات نشانگر III  $\lambda$ DNA برش یافته با آنزیم‌های برشی EcoRI و HindIII استفاده شد.

#### تکثیر ریزماهورها

همانطور که قبلاً نیز اشاره گردید با توجه به اینکه تنها ۱۵ جفت آغازگر ریزماهور در پیاز خوراکی مورد بررسی قرار گرفته بود (Fischer & Bachman, 2000)، لذا به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی پیاز و ارقام خارجی این آغازگرها انتخاب شد (جدول ۲) و پس از ساخت توسط شرکت آیزوژن (Isogen Co., The Netherlands) در این پژوهش استفاده گردید.

#### انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش PCR برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر از ترکیب ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (Cinnagen Co.)، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (Cinnagen Co.)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (Cinnagen Co.) و ۳۰ نانوگرم دی.ان.آ ژنومی از هر نمونه تهیه شد. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی سترون به هر نمونه، لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر مدل 512-Tc<sup>۵</sup>، (Techne Co.) قرار گرفتند که در آن انجام واکنش PCR به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی<sup>۶</sup> اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به

رپید و هزینه بالا به همراه پیچیدگی روش در استفاده از ای.اف.ال.پی کاربرد این نشانگرها را کاهش داده است، در مقابل استفاده از نشانگرهای ریزماهوره<sup>۱</sup> (SSR)<sup>۲</sup> به دلیل سادگی، تکرارپذیری بالا و هم بارز بودن و مقدار چندشکلی زیاد (Chamber & MacAvoy, 2000; Dimitry et al., 2006; Oliveria et al., 2006) می‌رسد که مفیدتر باشد، البته شناسایی این نواحی و طراحی آغازگر ریزماهوره از محدودیت‌های این روش محسوب می‌شود. بررسی منابع حاکی از آن است که تاکنون تنها ۳۰ جفت آغازگر اختصاصی ریزماهوره در پیاز خوراکی معرفی شده است که تنها ۱۵ جفت از آنها در تفکیک رقم‌های دیپلوئید پیاز خوراکی مورد استفاده قرار گرفته است (Fischer & Bachman, 2000).

بررسی مطالعات مولکولی نشان می‌دهد که تاکنون تنها با استفاده از نشانگر رپید تنوع ۲۰ توده بومی پیاز ایران مورد بررسی قرار گرفته است (Moosavizadeh et al., 2006) و بر این اساس اطلاعات کافی در زمینه روابط ژنتیکی توده‌های بومی پیاز ایران تهیه نشده است، لذا تعیین تنوع درون و بین توده‌های بومی پیاز ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی رابطه ژنتیکی درون و بین برخی از توده‌های بومی پیاز ایران و مقایسه با برخی ارقام خارجی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره ای انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه نمونه و استخراج دی.ان.آ

بدور ۱۸ توده بومی پیاز ایران که در چندین بررسی مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفته بودند (Dehdari et al., 2001; Rafiepour, 2002; Mobli et al., 2001) به همراه پنج رقم خارجی (رقم یلوسوئیت اسپانیش به همراه چهار دو رگ) که همه توسط پژوهشگران جمع‌آوری شده بودند کشت گردید (جدول ۱) و بعد از رسیدن به مرحله چهار برگی از داخل هر توده بومی به منظور بررسی‌های مولکولی ۵ بوته به طور تصادفی انتخاب گردید. نمونه‌های برگی هر بوته به طور جداگانه

3.  $\beta$ - mercaptoethanol

4. Tris-Acetate-EDTA

5. TC-512 Thermocycler

6. Denaturing

1. Microsatellite

2. Simple Sequence Repeat

جدول ۱- برخی از اطلاعات مربوط به توده‌های محلی و ارقام خارجی مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	نام	مبدا	رنگ سوخ	محل تشکیل سوخ
۱	سفیده کمره خمین	ایران	سفید	هم سطح خاک
۲	قرمز خمین	ایران	قرمز	هم سطح خاک
۳	سفید قم	ایران	سفید	داخل - هم سطح خاک
۴	سفید کاشان	ایران	سفید	هم سطح - داخل خاک
۵	قرمز آذر شهر	ایران	قرمز تیره	داخل - هم سطح خاک
۶	درچه اصفهان	ایران	صورتی گلی - قرمز روشن	داخل - هم سطح خاک
۷	سفید ساری	ایران	سفید	داخل خاک
۸	محلی طارم زنجان	ایران	زرد (طلایی روشن)	داخل خاک
۹	کزیبر زنجان	ایران	قرمز (صورتی گلی)	هم سطح - داخل خاک
۱۰	سفید گرگان	ایران	سفید	داخل خاک
۱۱	قرمز محلی کازرون	ایران	گلی قرمز روشن	هم سطح خاک
۱۲	محلی کوار شیراز	ایران	گلی صورتی (قرمز روشن)	هم سطح - داخل خاک
۱۳	سفید ابرکوه	ایران	سفید	داخل - هم سطح خاک
۱۴	هوراند آذربایجان	ایران	گلی صورتی (مسی)	هم سطح خاک
۱۵	محلی یاسوج	ایران	گلی صورتی	هم سطح - داخل خاک
۱۶	کینوات زنجان	ایران	گلی صورتی	داخل - هم سطح خاک
۱۷	مراغه	ایران	گلی صورتی	هم سطح خاک
۱۸	محلی دره گز	ایران		داخل - هم سطح خاک
۱۹	Yellow sweet spanish	هلند	زرد (طلایی)	بالای خاک
۲۰	Texas yellow grano	آمریکا	زرد	
۲۱	Primavera	آمریکا	زرد	هم سطح خاک
۲۲	Agriago	آفریقا	زرد	هم سطح خاک
۲۳	Southern white	آمریکا	سفید	

\* بخش عمده‌ای از اطلاعات این جدول از منبع Mobli et al. (2001) برگرفته شده است.

در ژل، از رنگ‌آمیزی به روش نیترا ت نقره (Bassam et al., 1991) استفاده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بر اساس حضور و عدم حضور باندها در هر نمونه دی.ان.آ مورد بررسی، الگوی باندها به صورت حروف لاتین امتیازدهی شدند. در جفت آغازگرهایی که چند مکان ژنی ریزماهواره را تکثیر می‌کردند، هر مکان ژنی به طور جداگانه امتیازدهی گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار Power Marker v.3.25 تجزیه و تحلیل شد و بر اساس دندروگرام‌های مختلف به دست آمده با این نرم افزار به واسطه آزمون Bootstrap، درخت فیلوژنتیکی مورد توافق<sup>۴</sup> با کمک نرم‌افزار MEGA3 رسم گردید.

مدت ۲ دقیقه، تعداد چرخه مناسب برای هر آغازگر شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال<sup>۱</sup> دی.ان.آ در دمای تهیه شده برای هر آغازگر (بر اساس آزمایشات مقدماتی، جدول ۲) به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر<sup>۲</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و نیز یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برنامه‌ریزی شده بود. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۵ میکرولیتر از بافر نمونه‌گذاری<sup>۳</sup> مخلوط شد. سپس در چاهک ژل اکریل امید ۱۲٪ غیر واسرشت بارگذاری شد و به مدت ۳ الی ۴ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ میلی‌آمپر الکتروفورز گردید. جهت نمایان کردن قطعات دی.ان.آ

1. Annealing
2. Extension
3. Loading Buffer

جدول ۲- اطلاعات مربوط به جفت آغازگرهای ریزماهوره مورد استفاده در این پژوهش  
برای انگشت نگاری ژنتیکی توده‌های بومی و ارقام خارجی پیاز

نام جفت آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)/ تعداد چرخه در هر دما
AMS 04	F: TAT GTT TTC AGC TGC GAT GTG AG R: AAA TCT AAG CAC GGA TAC CAA GTG	۵۴-۵۲-۵۰-۴۸-۵۰ ۰۵-۰۳-۰۲-۰۲-۳۶
AMS 06	F: GGT GCA TAG GGT CTC ATC TG R: ATT GAT TGT TTG TTT GGA TGT G	۶۳-۶۱-۶۰-۵۸ ۰۸-۰۳-۰۳-۳۵
AMS07	F: TGC GAA TGT GAG GTT TTC TGC R: CGA CCC GGA AAT TTC GAT C	۶۷-۶۵-۶۳-۶۲ ۰۸-۰۳-۰۳-۳۵
AMS08	F: GCC ACG ATG TTG AGA TTT CG R: CCC GAA TAT CCC ACC AGT TC	۵۶-۵۴-۵۲-۵۱-۵۳ ۰۸-۰۵-۰۳-۰۲-۳۵
AMS10	F: TTC ATG TTG TAT TGA GAT TTG G R: GAA GGA ATG GAA GCA GTT C	۵۸-۵۶-۵۴-۵۲-۵۴ ۰۵-۰۵-۰۴-۰۲-۳۵
AMS 12	F: AAT GTT GCT TTC TTT AGA TGT TG R: TGC AAA ATT ACA AGC AAA CTG	۶۱-۵۹-۵۷-۵۵-۵۷ ۰۵-۰۳-۰۳-۰۲-۳۵
AMS13	F: ACC TTT TAA ATT GAC GAT ATT CC R: CTG CAC TAT TCT GTG ATG TAT TTC	۶۱-۵۹-۵۷-۵۵-۵۷ ۰۴-۰۳-۰۳-۰۲-۳۵
AMS14	F: CCC CTG AGT AAA TTC AAA ATC C R: TCC TTA GTA TAA TTT CGG GGT AAC	۶۰-۵۸-۵۶ ۰۳-۰۳-۳۵
AMS16	F: CTG CAT TAA AAC AAC CAA ACT TG R: GAG CTC CAC TTC TTC CAA ACT AG	۶۲-۶۰-۵۸-۵۶-۵۸ ۰۸-۰۵-۰۳-۰۲-۳۵
AMS22	F: CAC CGT TTC CAT AAT CAA GG R: ATT TTT TGG GCA TTG TTG G	۶۴-۶۲-۶۱-۶۰-۵۹ ۰۳-۰۳-۰۳-۰۲-۳۵
AMS23	F: GCT GTT CAC TGG TCT ATC TGG R: ATT CGG TGC TGA TTT TCG	۵۸-۵۷-۵۶-۵۵-۵۶ ۰۸-۰۵-۰۳-۰۳-۳۵
AMS25	F: GAG GGC AGT GTT AGC ATT CC R: GCA ACC TTT CCC CGA GAG	۶۵-۶۳-۶۱-۵۹ ۰۸-۰۵-۰۳-۴۰
AMS26	F: ATC TAA TCA AAG CAT ATG TG R: TTG TCC AAG TAG TTG TGA	۵۶-۵۴-۵۳-۵۲-۵۴ ۰۶-۰۳-۰۳-۰۲-۳۶
AMS29	F: CAT CAG AAA ATC GAC TCA C R: TTG AAA CTT GGA AGG TTG TC	۵۵-۵۴-۵۳-۵۲-۵۴ ۰۶-۰۳-۰۳-۰۲-۳۶
AMS30	F: CAC TAA TGG GGT AAA TAA TGT TCT AC R: TTG CCT TGA AAT CCA GAC	۵۶-۵۴-۵۲-۵۴ ۰۸-۰۵-۰۳-۳۵

### نتایج و بحث

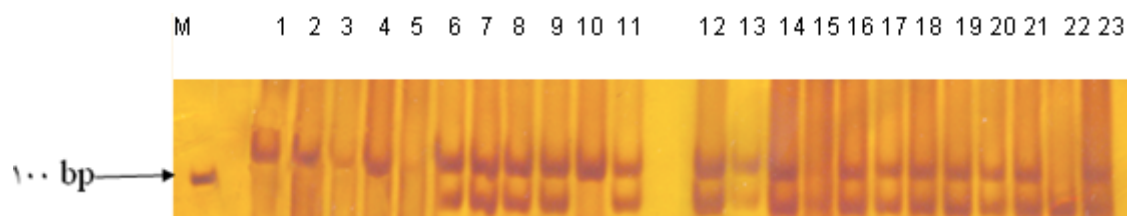
میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۷۵ تخمین زده شد که بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۶۰) است این نسبت بالای هتروزیگوسیتی با طبیعت دگرگشن، شرایط کشت، وجود حشرات گرده‌افشان و حتی وقوع طبیعی نر عقیمی سیتوپلاسمی (گرچه فراوانی کمی دارد)، در پیاز می‌تواند قابل توجه باشد. در این پژوهش میانگین محاسبه اطلاعات چندشکلی ریزماهوره‌ها (PIC)، ۰/۵۲ بود. بالاترین PIC (۰/۷۶) در جایگاه AMS23 (با ۸ آلل) و پایین‌ترین PIC (۰/۲۰) در نشانگر AMS04 (با ۲ آلل) مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع

از ۱۵ جفت آغازگر بررسی شده، ۱۴ جفت آغازگر (فاجد جفت آغازگر AMS25) قادر به انجام تکثیر مناسب ۱۵ مکان ریزماهوره‌ای در توده‌ها و ارقام خارجی مورد بررسی بودند. در این بررسی به غیر از جفت آغازگرهای AMS04 و AMS07 بقیه آغازگرها واجد چند شکلی بودند (شکل ۱). تعداد آلل‌های مشاهده شده در مکان‌های مختلف از دو آلل (AMS04) تا شش آلل (AMS23) متغیر بود. در کل تعداد ۴۳ آلل چند شکل مشاهده شد که متوسط تعداد آلل به ازای هر مکان ۳/۳ ارزیابی شد.

جدول ۳ نتایج به دست آمده از هر مکان ژنی ریزماهوره‌ای به کار رفته در پیاز را نشان می‌دهد.

درصد گزارش شده است (Yao et al., 2008). بنابراین می‌توان گفت که در توده‌های بومی پیاز ایران تمایز جمعیتی بیشتری نسبت به دیگر گونه‌های دگر بارور که جریان ژنی آزادانه دارند، دیده می‌شود. تمایز جمعیتی بیشتر در توده‌های بومی پیاز ایران را می‌توان عمدتاً به گرده‌افشانی آنها توسط حشرات نسبت داد. البته مقدار کم تمایز درون جمعیتی در این مطالعه را احتمالاً می‌توان به خطای نمونه‌برداری به علت اندازه کوچک نمونه‌ها مربوط دانست (Moosavizadeh et al., 2006). البته انتخاب در طی کشت و کار طولانی مدت این ژنوتیپ‌ها نیز می‌تواند در به ثبات رسیدن صفات در

ژنتیکی بین و درون توده‌ها و ارقام خارجی پیاز معنی‌دار است (جدول ۴). همچنین ۴۲ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین توده‌ها و ارقام خارجی بود و ۵۸ درصد آن به تنوع درون آنها مربوط شد. در مقایسه با نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بر روی دیگر گیاهان دگرگشن به طور مثال مشخص شده که در داده‌های حاصل از نه نشانگر ریزماهواره روی شش جمعیت یونجه ایرانی میانگین واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌ها تنها ۲/۴ درصد است (Falahati et al., 2007). همچنین در بررسی روی ۲۰ توده بومی ذرت توسط ۴۵ نشانگر ریزماهواره میانگین واریانس ژنتیکی بین توده‌ها ۱۳



شکل ۱- الگوی بانندی ریزماهواره حاصل از جفت آغازگر ۰۶ AMS

M: نشانگر اندازه ۱۰۰، ۱-درچه اصفهان ۱، ۲-درچه اصفهان ۲، ۳-درچه اصفهان ۳، ۴-درچه اصفهان ۴، ۵-درچه اصفهان ۵، ۶-محلی طارم ۱، ۷-محلی طارم ۲، ۸-محلی طارم ۳، ۹-محلی طارم ۴، ۱۰-محلی طارم ۵، ۱۱-سفید گرگان ۱، ۱۲-سفید گرگان ۲، ۱۳-سفید گرگان ۳، ۱۴-سفید گرگان ۴، ۱۵-سفید گرگان ۵، ۱۶-یلو سوئیت اسپانیش ۱، ۱۷-یلو سوئیت اسپانیش ۲، ۱۸-یلو سوئیت اسپانیش ۳، ۱۹-یلو سوئیت اسپانیش ۴، ۲۰-یلو سوئیت اسپانیش ۵، ۲۱-هوراند ۱، ۲۲-هوراند ۲، ۲۳-هوراند ۳.

جدول ۳- تعداد و فراوانی آللی، هتروزیگوتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چند شکلی جفت آغازگرهای

ریزماهواره مورد استفاده برای انگشت نگاری ژنتیکی توده های بومی و ارقام خارجی پیاز

شماره	جفت آغازگر	فراوانی آلل حداکثر	تعداد ژنوتیپ	تعداد آلل	تنوع ژنی	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	PIC
۱	AMS 06	۰/۱۸۶۸۷	۲	۲	۰/۲۲۸۱	۰/۲۶۲۶	۰/۲۰۲۱
۲	AMS 08	۰/۵۶۵۷	۳	۲	۰/۴۹۱۴	۰/۱۲۱۲	۰/۳۷۰۷
۳	AMS 10	۰/۵۰۵۱	۳	۲	۰/۴۹۹۹	۰/۹۴۹۵	۰/۳۷۵۰
۴	AMS 12	۰/۳۶۸۷	۵	۳	۰/۶۶۱۱	۰/۶۸۶۹	۰/۵۸۶۸
۵	AMS 13	۰/۳۵۳۵	۶	۴	۰/۷۳۱۱	۰/۹۸۹۹	۰/۶۸۲۲
۶	AMS 14	۰/۳۹۳۹	۱۰	۵	۰/۷۴۱۶	۰/۹۷۹۸	۰/۷۰۲۴
۷	AMS 16	۰/۴۳۴۳	۵	۴	۰/۶۴۶۷	۱/۰۰۰۰	۰/۵۷۸۴
۸	AMS 22 (1)	۰/۵۲۰۲	۲	۲	۰/۴۹۹۲	۰/۹۵۹۶	۰/۳۷۴۶
۹	AMS 22 (2)	۰/۵۳۵۴	۳	۲	۰/۴۹۷۵	۰/۸۶۸۷	۰/۳۷۳۷
۱۰	AMS 23	۰/۳۰۸۱	۱۱	۶	۰/۷۹۶۳	۰/۶۱۶۲	۰/۷۶۷۰
۱۱	AMS 26	۰/۴۰۵۳	۶	۳	۰/۶۵۳۹	۰/۶۹۴۷	۰/۵۷۹۴
۱۲	AMS 29	۰/۴۷۹۸	۹	۴	۰/۶۵۹۱	۰/۷۶۷۷	۰/۶۰۲۷
۱۳	AMS 30	۰/۳۳۸۴	۶	۴	۰/۷۳۷۰	۰/۹۷۹۸	۰/۶۸۸۸
۱۴	میانگین	۰/۴۶۷۵	۵/۴۶۱۵	۳/۳۰۷۷	۰/۶۰۳۳	۰/۷۵۹۷	۰/۵۲۹۵

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی برای توده‌های بومی و ارقام خارجی پیاز

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات انحرافات	واریانس	درصد واریانس	سطح معنی‌دار
بین ارقام	۱۸	۳۳۸/۴۹۴	۲/۹۶۹۳۸	۴۲	$P < 0.001$
درون ارقام	۷۹	۳۱۹/۹۵۰	۴/۰۵۰۰۰	۵۸	$P < 0.001$

داخل توده‌ها مؤثر باشد.

مربوطه ترسیم گردید. بر اساس دندروگرام، توده‌ها و ارقام خارجی در شش دسته و یک توده مستقل تقسیم شدند (شکل ۲).

نگاه کلی به گروه‌بندی صورت گرفته با نشانگرهای ریزماهواره، این نکته را نشان می‌دهد که توده‌های مربوط به مناطق شمال و شمال غرب کشور (استان‌های مازندران، گلستان، آذربایجان شرقی و زنجان) تا حدودی در کنار هم قرار گرفته‌اند. اگرچه استثنائاتی در این میان دیده می‌شود که از آن جمله حضور توده محلی یاسوج در کنار توده‌های مربوط به شمال غرب و حضور توده قرمز آذرشهر در کنار توده‌های مربوط به مرکز کشور است. این نتیجه گویای پیروی نکردن گوناگونی ژنتیکی

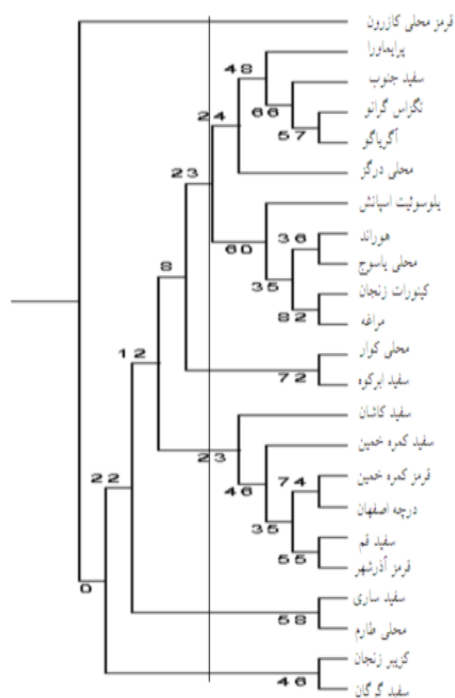
بر اساس شاخص تنوع ژنی Nei & Takezaki (2004) تنوع ژنتیکی درون توده‌ها و ارقام خارجی پیاز برآورد گردید. بیشترین میانگین سطح تنوع در توده بومی سفید گرگان مشاهده شد (۰/۲۸) و این مقدار در رقم خارجی یلو سوئیت اسپانیش حداقل بود (۰/۱۲) بود (جدول ۵).

برای تعیین روابط ژنتیکی توده‌ها و ارقام خارجی مورد بررسی، بر اساس اطلاعات به دست آمده از نشانگر ریزماهواره و با استفاده از ضریب تشابه Nei & Takezaki (2004) و روش UPGMA<sup>۱</sup> دندروگرام

1. Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average

جدول ۵- میانگین تنوع ژنتیکی و تعداد کل نوارهای چند شکل

رقم	میانگین تنوع ژنتیکی	تعداد کل نوارهای چند شکل
سفید کمره خمین	۰/۲۷	۲۰
قرمز کمره خمین	۰/۲۶	۲۳
سفید قم	۰/۲۳	۲۰
سفید کاشان	۰/۱۸	۱۵
قرمز آذرشهر	۰/۲۵	۲۱
درچه اصفهان	۰/۲۰	۲۱
سفید ساری	۰/۲۴	۲۲
محلی طارم	۰/۲۶	۲۳
کزیبر زنجان	۰/۲۴	۱۸
سفید گرگان	۰/۲۸	۲۴
قرمز محلی کازرون	۰/۱۴	۱۲
محلی کوار شیراز	۰/۲۰	۱۷
سفید ابرکوه	۰/۲۰	۱۷
هوراند	۰/۱۹	۱۷
محلی یاسوج	۰/۱۷	۱۳
کینوات زنجان	۰/۱۸	۱۵
مراغه	۰/۱۶	۱۶
محلی دره گز	۰/۱۳	۱۲
یلوسوئیت اسپانیش	۰/۱۲	۱۱
هیبریدها (خارجی)	۰/۱۹	۱۵



شکل ۲- دندروگرام ۱۸ توده بومی و پنج رقم خارجی پیاز بر اساس اطلاعات الگوهای بانندی ۱۲ نشانگر چند شکلی ریزماهواره، با استفاده از ضریب تشابه نی و روش UPGMA و Bootstrap Consensus Tree.

بالای جهشی است که در آنها رخ می‌دهد، در نتیجه نمی‌توان ارتباط و همبستگی پایداری با تغییرات کنده که در صفات تک ژنی یا چند ژنی از جمله شکل سوخ، رنگ پوست سوخ یا واکنش به طول روز رخ می‌دهد را انتظار داشت (Fischer & Bachman, 2000). با توجه به این که مطالعات تنوع ژنتیکی در رابطه با توده‌های بومی پیاز تنها در یک مورد با استفاده از نشانگر رپید صورت گرفته است (Sang et al., 2006). لذا تفسیر نتایج این مطالعه را مشکل می‌سازد.

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در گروه اول، چهار رقم خارجی پرایم‌اورا، سفید جنوب، آگریاگو و تگزاس گرانو همراه با توده محلی دره گز کنار هم قرار گرفته‌اند. چهار هیبرید خارجی ذکر شده جزء پیازهای روز کوتاه می‌باشند. در این گروه توده محلی دره گز با فاصله‌ای حدود ۰/۴۵ از این ارقام قرار گرفته است. شاید بتوان عنوان کرد که این توده رابطه ژنتیکی نزدیکی نسبت به این ارقام دارد. متأسفانه در بررسی‌های مورفولوژیکی که تا کنون بر روی توده‌های بومی پیاز ایران صورت گرفته است این توده مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا اطلاعات مورفولوژیکی این توده موجود

از تنوع جغرافیایی می‌باشد که (Dehdari et al., 2001) نیز که روی ۲۰ توده بومی پیاز ایرانی بر اساس صفات مورفولوژیکی کار نموده‌اند، این مطلب را تأیید کرده‌اند. گزارش‌های ضد و نقیضی در زمینه ارتباط تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی وجود دارد. بر اساس نشانگرهای رپید و ریزماهواره در پیاز نبودن ارتباط میان تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی گزارش شده است (Bittanszky et al., 2006; Fischer & Bachman, 2000; Havey et al., 1997; Dennequin et al., 1997) اما در مطالعه‌ای نیز با استفاده از نشانگر رپید در پیاز ارتباط میان تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی گزارش شده است (Sang et al., 2006). در این تحقیق تجزیه خوشه‌ای داده‌ها نتوانست توده‌های مورد بررسی را به خوبی از هم تفکیک نماید. از جمله دلایلی که می‌توان برای این امر ذکر کرد این است که احتمالاً توده‌های بومی از یک منطقه به منطقه دیگر برده شده و نام جدیدی بر آن گذاشته شده است. همچنین به دلیل طبیعت آزاد گرده‌افشانی توده‌های پیاز، اختلاط ژنتیکی این توده‌ها نیز می‌تواند رخ داده باشد. علاوه بر این تنوع در ریزماهواره‌ها در نتیجه عواملی از جمله میزان

شمال کشور می‌باشد و همانند توده‌های این منطقه نیازمند طول روز بلند برای غده‌دهی می‌باشد، منطقی به نظر می‌رسد. همچنین دو توده سفید گرگان و کزبیر زنجان نیز با فاصله بسیار کم ۰/۱۳ در کنار هم قرار گرفته‌اند که می‌تواند نمایانگر ارتباط ژنتیکی نزدیک این دو توده باشد. جدا قرار گرفتن توده محلی کازرون نیز احتمالاً به خاطر ویژگی‌های ژنتیکی و نیز منشاء این توده (استان فارس) و سازگاری آن با شرایط آب و هوایی آن منطقه می‌باشد که با منشاء سایر توده‌ها متفاوت است. ضمناً در گروه‌بندی که توسط Dehdari et al. (2001) و Mobli et al. (2001) بر روی ۲۰ توده داخلی مشابه، بر اساس صفات مورفولوژیک صورت گرفته است، توده کازرون در یک گروه جداگانه قرار گرفته است.

به منظور بررسی نحوه پراکنش نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده در این تحقیق تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که سه مؤلفه اول در مجموع ۶۱/۷۸ درصد از تغییرات را توجیه می‌نمایند (جدول ۶). مؤلفه اول ۵۱/۱۵ درصد از تغییرات را توجیه می‌نماید. این مقدار برای مؤلفه‌های دوم و سوم به ترتیب ۶/۱۲ و ۴/۴۰ درصد بود. سهم سه مؤلفه اول در توجیه تغییرات تا حدودی بالا است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آغازگرهای ریزماهوره کاملاً در سطح ژنوم پراکنده نیستند و ممکن است در یک قسمت یا قسمت‌هایی از ژنوم بیشتر تجمع پیدا کرده باشند. به سبب بالا بودن سهم سه مؤلفه اول تقسیم‌بندی نمودار دو بعدی (شکل ۳) با تقسیم‌بندی حاصل از دندروگرام مطابقت داشت. لذا از این روش نیز می‌توان در گروه‌بندی توده‌ها و ارقام خارجی پیاز مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۶- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه و واریانس توجیه شده توسط سه مؤلفه اول مربوط به نشانگر ریزماهوره

مؤلفه اصلی	مقادیر ویژه	واریانس توجیه شده	واریانس جمععی
اول	۵۰/۶۴	۵۱/۱۵	۵۱/۱۵
دوم	۶/۱۲	۶/۱۸	۵۷/۳۴
سوم	۴/۴۰	۴/۴۴	۶۱/۷۸

نمی‌باشد تا بتوان قرارگیری آن را در این دسته با اطلاعات بیشتری مورد بررسی قرار داد.

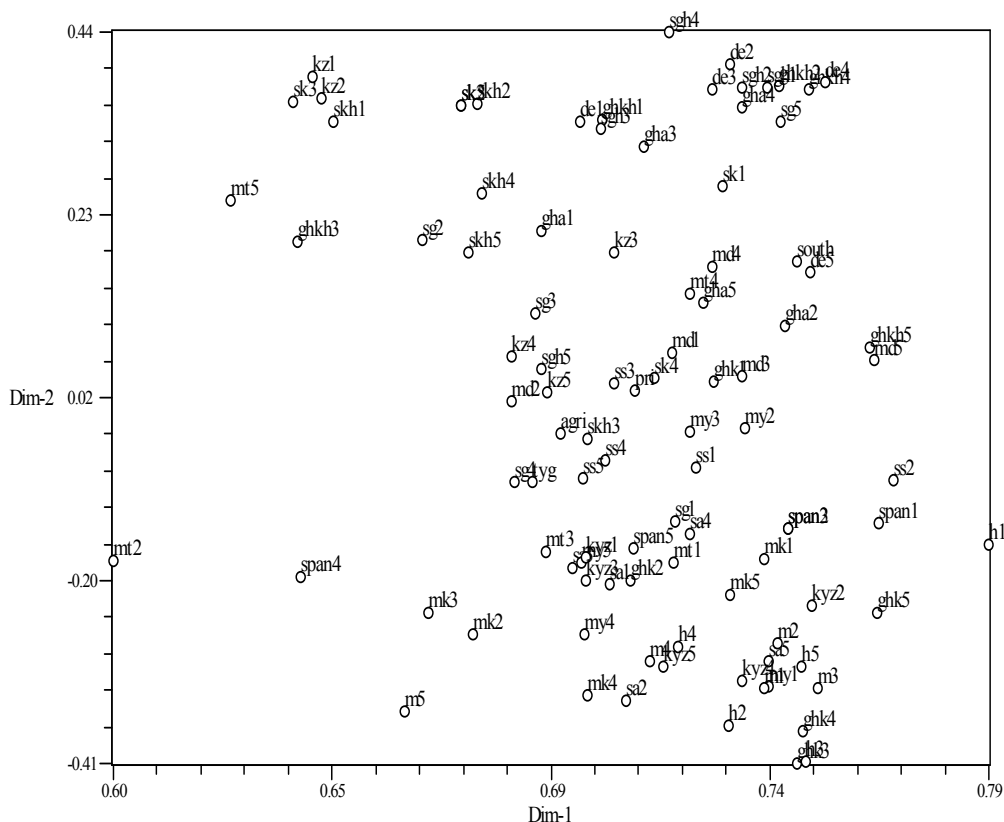
در گروه دوم توده‌های هوراند، کینوات زنجان و مراغه که مربوط به منطقه شمال غرب کشور می‌باشند در کنار هم قرار گرفته‌اند که گروه‌بندی آنها با هم با توجه به اینکه هر سه توده مربوط به یک منطقه می‌باشند منطقی به نظر می‌رسد. همچنین در این دسته رقم خارجی یلوسوئیت اسپانیش و توده محلی یاسوج نیز قرار گرفته‌اند. قرارگیری توده محلی یاسوج در کنار توده‌های مربوط به منطقه شمال غرب، با خصوصیات مشترک آنها از قبیل رنگ پوست سوخ (گلی صورتی) و محل تشکیل سوخ (هم‌سطح خاک) که بین آنها مشترک است، قابل توجیه می‌باشد. همان طور که عنوان شد رقم خارجی یلوسوئیت اسپانیش جزء پیازهای تقریباً روز بلند می‌باشد و قرارگیری آن در این گروه در کنار توده‌های مربوط به منطقه شمال غرب کشور که آنها نیازمند طول روز نسبتاً بلند برای غده‌دهی می‌باشند، می‌تواند توجیه شود.

در گروه سوم توده محلی کوار و سفید ابرکوه که هر دو مربوط به منطقه مرکزی ایران (فارس و یزد) هستند کاملاً نزدیک به هم با فاصله بسیار کم ۰/۰۷ از یکدیگر قرار گرفته‌اند. این امر می‌تواند به رابطه ژنتیکی نزدیک این دو توده نسبت به یکدیگر اشاره داشته باشد.

توده‌های سفید کاشان، سفید کمره خمین، قرمز کمره خمین، درچه اصفهان، قرمز آذرشهر و سفید قم که متعلق به منطقه مرکزی ایران (به جز یک مورد) هستند، در گروه چهارم قرار گرفته‌اند. در اکثر مطالعاتی که در رابطه با بررسی‌های مورفولوژیکی صورت گرفته است حضور توده بومی درچه اصفهان در کنار قرمز آذرشهر دیده شده است (Rafiepour, 2002; Mobli et al., 2001; Moosavizadeh et al., 2006) همچنین در تنها مطالعه مولکولی انجام شده با استفاده از نشانگر رپید در توده‌های بومی پیاز ایران نیز این دو توده در یک گروه قرار گرفتند (Moosavizadeh et al., 2006). این امر احتمالاً حاکی از نزدیکی ژنتیکی این دو توده علاوه بر ارتباط مورفولوژیکی می‌باشد.

قرارگیری توده محلی طارم در کنار توده سفید ساری از این نظر که توده طارم سازگار با مناطق معتدل





شکل ۳- نمایش دو بعدی داده‌های حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم در نشانگر ریزماهوره. (کد نمونه‌ها بر اساس جدول ۱ انتخاب شده است)

ژنهاست که بخش محدودی از ژنوم را پوشانده است، در صورتی که مطالعه مولکولی همه قسمت‌های ژنوم (شامل فواصل بین ژنی و اینترون‌ها) را نیز مورد بررسی قرار می‌دهد. لذا اختلاف حاصل از نتایج مولکولی و مورفولوژیک دور از انتظار نیست. البته استفاده از نشانگرهایی مبتنی بر اگزون‌ها مانند EST می‌تواند راهگشای رفع این مشکل باشد.

#### نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نشانگر ریزماهوره یک روش مناسب برای مطالعات تنوع ژنتیکی می‌باشد و انتظار می‌رود در آینده با استفاده از تعداد بیشتری آغازگرهای ریزماهوره‌ای، صحت نتایج به دست آمده در این پژوهش تأیید گردد تا با اطمینان بیشتر نسبت به جایگاه توده‌های بومی اظهارنظر شود. لازم به ذکر است که صفات مورفولوژیک نتیجه بروز

#### REFERENCES

1. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Greeshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 19, 680-683.
2. Bittsanszky, A., Gyulai, G., Gajdos, L., Szabo, Z., Juhasz, A. G., Kiss, J., Lagler, R. & Heszky, L. (2006). Genotype identification of onion (*Allium cepa* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*, 725, 699-701.
3. Chamber, G. K. & MacAvoy, E. S. (2000). Microsatellites: Consensus and Controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126, 455-476.
4. Dehdari, A., Rezai, A. & Mobli, M. (2001). Morphological and agronomic characteristics of landrace Varieties of onion (*Allium cepa* L.) and their classification. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 5(2), 109-124. (In Farsi).
5. Dennequin, L. T., Panaud, O., Robert, T. & Ricroch, A. (1997). Assessment of genetic relationship among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity*, 78, 403-409.

6. Dimitry, A. C., Hellemans, B. & Volekaert, F. (2006). Microsatellite and their genomic distribution, evolution, function and application: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 225, 1-29.
7. Falahati-anbaran, M., Habashi, A. A., Esfahany, M., Mohammadi, S. A. & Ghareyazie, B. (2007). Population genetic structure based on SSR marker in alfalfa (*Medicago sativa*) from various regions contiguous to the centers of the origin of the species. *Journal of Genetics*, 86, 59-63.
8. Fischer, D. & Bachman, K. (2000). Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra and inter specific relatedness within the subgenus rhizirideum. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 153-164.
9. Havey, M., King, J., Bradeen, M., Bark, O. & Sato, Y. (1997). A low – density genetic map of onion and its use for marker – facilitated selection of maintainer lines. *Acta Horticulturae*, 555, 87-89.
10. Mobli, M., Dehdari, A. & Rezai, A. (2001). Genetic diversity and relationship between physiological and agronomic characteristics of Iranian landraces of onion (*Allium cepa* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 2(3&4), 109- 124. (In Farsi).
11. Moosavizadeh, A., Tourchi, M., Moghaddam, M., Mohammadi, A. & Masiha, S. (2006). Genetic diversity of Iranian landraces of onion using RAPD marker. *Agricultural Science*, 16, 265-277. (In Farsi).
12. Murray, G. C. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acid Resources*, 8, 4321-4325.
13. Nei, M. & Takezaki, N. (2004). Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis. In: *Proceedings of 5<sup>th</sup> World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, 21, 405-412.
14. Ohri, D., Ferssch, R. M. & Hanelt, P. (1998). Evolution of genome size an *allium*. *Plant Systematics and Evolution*, 210, 57-86.
15. Oliveria, E. J., Padua, J. G., Imaculade, M., Vencovsky, Z. R., Lucia, M. & Vieria, C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellite. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294-301.
16. Rafiepour, M. (2002). *Evaluation of morphological, agronomical and storage characteristics of Iranian landraces of onions (Allium cepa L.)*. M. Sc. thesis in horticulture, College of Agriculture, University of Tabriz. 97 p. (In Farsi).
17. Sang, E., Kutty, M., Gowda, V., Anand, R. & Taha, L. (2006). Analysis of genetic diversity among Indian short – day onion (*Allium cepa*) cultivars using RAPD marker. *Horticultural Science and Biotechnology*, 81, 774-778.
18. Shete, S., Tiwari, H. & Elston, R. (2000). On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical Population Biology*, 57, 265-271.
19. Tani Kawa, T., Takagi, M. & Ichii, M. (2002). Cultivar identification and genetic diversity in onion as evaluated by random amplified polymorphic DNA analysis. *Japanese Journal of Crop Science*, 71, 244-251.
20. Wako, T., Nunome, T. & Kojima, A. (2005). Genetic mapping of AFLP marker in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica*, 144, 255-263.
21. Wilkie, S., Isaac, P. & Salter, R. (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 497-504.
22. Yao, Q. L., Ping, F., Cheng, K. K. & Tang, P. (2008). Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from wuling mountain region in China. *Genetics*, 87, 287-291.