

مطالعه ژنتیکی موسیر ایرانی (*Allium hirtifolium* Boiss.) با استفاده از

نشانه‌های مورفولوژیکی و مولکولی

راهله ابراهیمی^۱، محمدرضا حسندخت^{۲*}، ذبیح‌اله زمانی^۳، عبدالکریم کاشی^۴ و ایزابل رولدان رویز^۵

۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استادن پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۵. استاد بخش علوم گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و شیلات بلژیک

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۸/۱۹)

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۲۱ توده موسیر (*Allium hirtifolium* Boiss.) وحشی ایران از مناطق جنوب، جنوب غرب، غرب و مرکز ایران با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانه‌های AFLP ارزیابی شد. نتایج نشان داد توده خوانسار دارای بیشترین عرض برگ (۵/۴۲ سانتی‌متر)، میانگین تعداد برگ در بوته (۵/۴۱)، قطر سوخ (۱۰/۸۴ سانتی‌متر)، ارتفاع سوخ (۴/۹۵ سانتی‌متر) و وزن متوسط سوخ (۱۲۲/۵ گرم) بود و بنابراین، توده مناسبی برای اهلی‌سازی و کشت است. براساس تجزیه کلاستر توده‌های مطالعه‌شده از نظر صفات مورفولوژیکی در سه گروه قرار گرفتند که تا حد زیادی براساس نزدیکی و دوری جغرافیایی بود. در بررسی مولکولی توسط نشانه‌های AFLP از چهار ترکیب آغازگری *EcoRI* و *MseI* دارای سه نوکلئوتید انتخابی استفاده شد. در آنالیز مولکولی، ۳۷۶ نشانه‌گر حاصل شد که ۲۰۴ نشانه‌گر (۵۳/۲۸ درصد) چندشکلی نشان دادند. براساس دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی، توده‌های موسیر بومی ایران در حد تشابه ۷۰ درصد در پنج گروه قرار گرفتند که مطابقت زیادی با پراکنش جغرافیایی آن‌ها نشان داد. همچنین توده کازرون از منطقه گرم‌تر جنوبی با توده‌های شمالی‌تر که از مناطق سردتر بودند تفاوت‌های ژنتیکی بارزتری داشت. نتایج نشان داد تکنیک AFLP ابزار مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های موسیر ایرانی است.

واژه‌های کلیدی: اهلی‌سازی، تجزیه کلاستر، تنوع ژنتیکی، توده بومی، AFLP.

مقدمه

محیطی مختلف، متفاوت باشد و تکیه بر این صفات، طبقه‌بندی توده‌ها را با مشکل مواجه می‌کند. به‌منظور حذف این اشکالات تکنیک RAPD^۱ برای ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های موسیر انجام شده است (Ebrahimi *et al.*, 2009). نتایج بررسی تنوع ژنتیکی با تکنیک RAPD بیانگر وجود تنوع بالا بین توده‌های موسیر ایرانی بود و گروه‌بندی توده‌ها با این تکنیک در بیشتر موارد با

موسیر ایرانی (*Allium hirtifolium* Boiss.) یکی از سبزی‌های مهم و اقتصادی جنس آلیوم و بومی ایران است که به‌صورت وحشی در کوه‌های زاگرس رشد می‌کند (Ghahreman, 1984). تاکنون تنوع ژنتیکی برخی توده‌های بومی موسیر ایرانی با استفاده از صفات مورفولوژیکی بررسی شده است (Ebrahimi *et al.*, 2008)، اما صفات مورفولوژیکی ممکن است در شرایط

سیر را با استفاده از تکنیک ITS و AFLP مطالعه کردند. تکنیک AFLP نشان داد که *A. tuncelianum* و سیر از نظر ژنتیکی با هم متفاوتند و احتمالاً هر کدام گونه‌ای جداگانه‌اند (Ipek et al., 2008a). همچنین در آزمایشی دیگر ارتباط ژنتیکی بین دو توده سیر Kastamonu ترکیه با ۲۰ توده سیر به‌وسیله نشانگر AFLP بررسی و پیشنهاد شد که سیر Kastamonu گیاهی متمایز از سایر سیرها نیست (Ipek et al., 2008b). علاوه بر این، بررسی تنوع ژنتیکی روی توده‌های سیر به‌وسیله سه نوع نشانگر ایزوزایم، RAPD و AFLP نشان داد که از این میان، نشانگر AFLP بهترین نتایج را در گروه‌بندی دقیق توده‌ها داشته است (Ipek et al., 2003).

با توجه به اهمیت اقتصادی گیاه موسیر و لزوم شناسایی کامل‌تر توده‌های موسیر بومی ایران، در این پژوهش تنوع ژنتیکی توده‌های بومی موسیر ایرانی با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولی AFLP مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و کشت سوخ‌ها

در این پژوهش ۲۱ توده موسیر از مناطق جنوب، جنوب غرب، غرب و مرکز ایران جمع‌آوری شد (جدول ۱). در آبان‌ماه پس از تهیه زمین، سوخ‌های دارای قطر چهار سانتی‌متر، ارتفاع سه سانتی‌متر و وزن متوسط ۵۰ گرم به‌صورت جوی پشته به عرض ۵۰ سانتی‌متر در وسط پشته‌ها در مرکز تحقیقات علوم باغبانی دانشگاه تهران واقع در کرج کشت شد. آزمایش به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۲۱ توده در سه تکرار پیاده شد. هر واحد آزمایشی یک ردیف داشت و در روی هر ردیف ۱۰ سوخ با فاصله ۲۰ سانتی‌متر از هم کشت شد. بافت خاک محل آزمایش شنی لومی بود. بلافاصله بعد از کاشت آبیاری انجام شد و پس از آن تا اردیبهشت‌ماه به‌علت بارندگی‌های فصلی، آبیاری انجام نشد. از اردیبهشت تا قبل از برداشت آبیاری هر هفته یک‌بار انجام شد. عملیات داشت شامل دفع علف‌های هرز بود که دوبار با دست صورت گرفت. در دوره رشد، هیچ علامت آفت و بیماری روی گیاهان مشاهده نشد. شایان ذکر است که هیچ‌گونه عمل کوددهی انجام نگرفت.

پراکنش جغرافیایی مطابقت داشت. نشانگر RAPD به‌رغم داشتن مزایای زیاد از جمله سادگی و کم‌هزینه بودن، از دقت پایینی برخوردار است و استفاده از نشانگرهای دقیق‌تری مانند AFLP^۱ می‌تواند نتیجه قابل اعتمادتری در ارزیابی تنوع ژنتیکی داشته باشد. AFLP یک نشانگر مبتنی بر PCR و غالب است (Vos et al., 1995). نشانگر AFLP نیازی به پروب و اطلاعات ژنتیکی ندارد و می‌تواند با کمی تغییرات در همه گونه‌ها استفاده شود (Barker et al., 1999).

نتایج ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۸ توده تیره ایرانی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، AFLP و RAPD نشان داد که کارایی تکنیک AFLP در بررسی روابط خویشاوندی درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای گیاهان جنس آلیوم بالاست (Dashti, 2003).

نتایج مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های سیر با نشانگرهای مورفولوژیک و AFLP نشان داد که AFLP نه‌تنها توانایی تفکیک و شناسایی گونه‌ها را داراست، بلکه امکان تفکیک واریته‌های گیاه‌شناسی و اکوتیپ‌های مختلف را نیز به‌خوبی فراهم می‌کند (Vafaei et al., 2002; Lee et al., 2009).

نتایج ارزیابی ۲۱۱ توده از ژرم پلاس سیر سازمان کشاورزی آمریکا و *Allium longicuspis* با استفاده از تکنیک AFLP نشان داد که ۶۴ درصد از توده‌های نگهداری‌شده در ایستگاه ملی مواد گیاهی و ۴۱ درصد از توده‌های تجاری آمریکا در تمامی نوارهای حاصل از آغازگرهای استفاده‌شده مشابه بوده و به‌منزله توده‌های تکراری در این مجموعه شناسایی شدند (Volk et al., 2004).

نتایج تنوع ژنتیکی بین ۴۵ توده سیر و سه توده *Allium longicuspis* با استفاده از نشانگرهای AFLP و ایزوزایم نشان داد که *Allium longicuspis* و توده‌های سیر از لحاظ ژنتیکی تفاوت زیادی با هم ندارند و از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایز نیستند. نتایج حاصل از ایزوزایم نیز با نتایج AFLP همخوانی داشت (Ipek & Simon, 2001).

پژوهشگران برای تعیین رابطه ژنتیکی و فیلوژنتیکی بین دو گیاه سیر و *Allium tuncelianum* تعداد ۲۴ توده

جدول ۱. ویژگی‌های توپوگرافی مناطق جمع‌آوری توده‌های موسیر ایرانی در این مطالعه

ردیف	مناطق جمع‌آوری	استان	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	ملایر	همدان	N ۳۴° ۱۷'	E ۴۸° ۴۹'	۱۷۵۰
۲	سنندج	کردستان	N ۳۵° ۱۹'	E ۴۷° ۰۰'	۱۳۷۲
۳	کوهرنگ	چهارمحال و بختیاری	N ۳۲° ۱۸'	E ۵۰° ۴۸'	۲۱۲۰
۴	یاسوج	کهگیلویه و بویراحمد	N ۳۰° ۴۰'	E ۵۱° ۳۶'	۱۸۷۰
۵	بروجرد	لرستان	N ۳۳° ۵۴'	E ۴۸° ۴۰'	۱۵۸۰
۶	خرم‌آباد	لرستان	N ۳۳° ۳۲'	E ۴۸° ۲۱'	۱۲۰۰
۷	الیگودرز	لرستان	N ۳۳° ۲۲'	E ۴۹° ۴۳'	۱۹۸۱
۸	اراک	مرکزی	N ۳۴° ۰۵'	E ۴۹° ۴۲'	۱۷۵۵
۹	نورآباد	لرستان	N ۳۴° ۰۵'	E ۴۷° ۵۸'	۱۸۰۰
۱۰	خمین	مرکزی	N ۳۳° ۳۸'	E ۵۰° ۰۳'	۱۸۱۵
۱۱	کنگاور	کرمانشاه	N ۳۴° ۳۰'	E ۴۷° ۵۷'	۱۵۰۰
۱۲	صحنه	کرمانشاه	N ۳۴° ۱۶'	E ۴۷° ۳۴'	۱۵۳۰
۱۳	دورود	لرستان	N ۳۳° ۲۸'	E ۴۹° ۰۴'	۱۴۵۰
۱۴	کازرون	فارس	N ۲۹° ۳۶'	E ۵۱° ۴۰'	۸۶۰
۱۵	داران	اصفهان	N ۳۲° ۵۸'	E ۵۰° ۲۲'	۲۳۹۰
۱۶	خوانسار	اصفهان	N ۳۳° ۱۳'	E ۵۰° ۱۹'	۲۲۵۰
۱۷	همدان	همدان	N ۳۴° ۴۸'	E ۴۸° ۳۷'	۱۸۵۰
۱۸	کرمانشاه	کرمانشاه	N ۳۴° ۱۹'	E ۴۷° ۰۷'	۱۳۲۲
۱۹	توحیدلو	همدان	N ۳۴° ۲۶'	E ۴۸° ۲۹'	۱۸۴۰
۲۰	نهایوند	همدان	N ۳۴° ۱۲'	E ۴۸° ۲۲'	۱۶۶۰
۲۱	غرق‌آباد	همدان	N ۳۴° ۲۲'	E ۴۸° ۲۴'	۱۸۳۰

ارزیابی صفات مورفولوژیک

نه صفت مورفولوژیکی کمی شامل طول برگ، عرض برگ، تعداد برگ در بوته، طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل‌آذین، تعداد گل در گل‌آذین، قطر سوخ، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ و ۱۱ صفت کیفی شامل فرم بوته، وجود آنتوسیانین در پایه برگ، قابلیت گل‌کردن، وضعیت ساقه گل‌دهنده، وجود انشعاب در گل‌آذین، وجود آنتوسیانین در پایه گل‌آذین، زمان گل‌دهی، وجود آنتوسیانین در پایه دم‌گلچه، رنگ سوخ، رنگ برگ و وجود کرک در برگ بررسی شدند. میانگین چهار سوخ برای محاسبات در نظر گرفته شد. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن، تجزیه به عامل‌ها با چرخش عامل‌ها به روش وریماکس و تجزیه کلاستر به روش UPGMA و با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

استخراج DNA

از هر توده برگ‌های جوان چهار گیاه جدا و استخراج DNA با استفاده از روش Doyle & Doyle (1987) با

کمی تغییرات انجام شد. غلظت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین و به غلظت ۱۵ نانوگرم در میکرولیتر رسانده شد.

روش AFLP

آنالیز AFLP براساس روش Vos et al. (1995) با کمی تغییرات و با استفاده از آنزیم‌های برشگر *EcoRI/MseI* انجام شد. حدود ۲۸۰ نانوگرم DNA ژنومی نمونه‌های موسیر با آنزیم‌های برشگر *EcoRI* و *MseI* به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد. غیرفعال سازی آنزیم‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد، سپس اتصال سازگارهای *EcoRI* و *MseI* با قطعات DNA به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط آنزیم تی‌فوردی‌ان‌ای. لیگاز^۱ انجام گرفت. بعد از اتصال سازگارها، مخلوط واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش AFLP با استفاده از آغازگرهای (E+A/M+C) در ۲۵ چرخه به شرح زیر گرفت: واسرشت‌سازی DNA در

1. T4 DNA ligase

اسپات در آغاز ظهور سبز و در زمان باز شدن سبز کم رنگ مایل به سفید بود. در گل آذین توده‌ها هیچ انشعاب جانبی دیده نشد، اما در مطالعه قبلی (Ebrahimi *et al.*, 2008) برخی توده‌ها از جمله آشتیان، اراک و خمین انشعاب در گل آذین داشتند.

همه توده‌ها آنتوسیانین در پایه گل آذین و پایه دم‌گلچه داشتند. از نظر زمان گل‌دهی نیز تفاوت‌هایی بین توده‌ها مشاهده شد و بر این اساس توده‌ها به انواع زودگل، میان‌گل و دیرگل تقسیم شدند. از نظر رنگ سوخ تمام توده‌ها رنگ زرد کم رنگ داشتند و پوشش روی سوخ در تمامی آن‌ها سفید رنگ بود.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد توده‌های مطالعه شده از نظر صفات طول برگ، طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل آذین، تعداد گل در گل آذین، قطر سوخ، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ در سطح ۱ درصد و از نظر صفت عرض برگ در سطح ۵ درصد تفاوت معناداری داشتند. توده‌های مطالعه شده از نظر تعداد برگ در بوته تفاوت معناداری نداشتند.

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان داد توده همدان دارای بیشترین طول برگ (۳۶/۷۱ سانتی‌متر)، توده سنندج دارای بیشترین تعداد گل در گل آذین (۱۴۶/۵۰)، توده خوانسار دارای بیشترین عرض برگ (۵/۴۲ سانتی‌متر)، میانگین تعداد برگ در بوته (۶)، قطر سوخ (۱۰/۸۴ سانتی‌متر)، ارتفاع سوخ (۴/۹۵ سانتی‌متر) و وزن متوسط سوخ (۱۲۲/۵ گرم)، توده یاسوج دارای بیشترین طول ساقه گل‌دهنده (۵۳/۸۴ سانتی‌متر) و قطر گل آذین (۱۱/۸۶ سانتی‌متر) بود.

در ضریب تشابه ۵۰ درصد توده‌های بومی موسیر در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۱). گروه اول شامل دو زیرگروه بود که در زیرگروه اول توده‌های ملایر، نهاوند، همدان، توحیدلو، غرق‌آباد، اراک، کنگاور، سنندج و یاسوج قرار گرفتند و زیرگروه دوم شامل توده‌های خمین، صحنه و کرمانشاه بود. توده‌های قرار گرفته در این گروه دارای طول برگ، عرض برگ، تعداد برگ در بوته، طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل آذین، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ بیشتر از میانگین و تعداد گل در گل آذین و قطر سوخ کمتر از مقدار میانگین بودند (جدول ۳).

گروه دوم خود به دو زیرگروه تقسیم شد که در زیرگروه اول توده‌های بروجرد، خرم‌آباد، الیگودرز، دورود و

دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه. محصولات تکثیر مقدماتی با استفاده از بافر TE چهار بار رقیق شدند و برای تکثیر انتخابی استفاده شد. تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگر نشاندار *EcoRI* (E+2) و آغازگر غیرنشاندار *MseI* (M+2) انجام شد. واکنش AFLP در ۳۱ چرخه به صورت زیر انجام شد: واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، اتصال در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه. در هشت چرخه اول در هر چرخه دمای اتصال ۱/۱ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و در ۲۳ چرخه باقی‌مانده دمای اتصال روی ۵۶ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد. هر گیاه با چهار ترکیب آغازگری آنالیز شد (جدول ۵). تفکیک قطعات و تعیین آن‌ها با دستگاه کاپیلاری ABI Prism Genescan 3130XL انجام شد. در هر نمونه سایز مارکر Perkin Elmer 500 Rox-Labelled (Perkin Elmer) قرار داده شد. الگوی نواری AFLP فلورسنت بین ۵۰ تا ۵۰۰ جفت باز با استفاده از نرم‌افزار GeneMapper v4.1 تعیین شد. تجزیه داده‌های مولکولی نیز با نرم‌افزار GenALex v6.1 انجام شد.

نتایج

ارزیابی صفات مورفولوژیکی

توده‌های مطالعه شده از نظر برخی صفات کیفی مشابه و از نظر برخی صفات دیگر متفاوت بودند. همه بوته‌ها فرم بوته ایستاده را داشتند. رنگ برگ در همه توده‌ها سبز تیره بود و پشت و حاشیه برگ همه توده‌ها، به جز توده‌های صحنه، کرمانشاه و خمین، کرک داشتند. توده‌های صحنه و کرمانشاه در پایه برگ حاوی آنتوسیانین بودند، اما در سایر توده‌ها آنتوسیانین مشاهده نشد.

توانایی گل‌کردن در توده‌ها متفاوت بود. ساقه گل‌دهنده در تمامی توده‌ها ابتدا توپر و در زمان خشک شدن بوته‌ها، کاملاً توخالی بود. رنگ گل‌ها در تمامی توده‌ها ارغوانی بود. در همه توده‌ها یک ساقه گل‌دهنده مشاهده شد، ولی در مطالعه قبلی (Ebrahimi *et al.*, 2008) تعدادی از بوته‌های توده‌های یاسوج و آشتیان دو ساقه گل‌دهنده در هر بوته داشتند. رنگ

نورآباد و در زیرگروه دوم توده کازرون به تنهایی قرار گرفت. توده‌های این گروه از نظر طول برگ، عرض برگ، تعداد برگ در بوته، طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل‌آذین، تعداد گل در گل‌آذین، قطر سوخ، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ کمتر از مقدار میانگین بودند (جدول ۳).

جدول ۲. مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک ارزیابی‌شده در توده‌های موسیر ایرانی

ردیف	صفات توده	طول برگ (سانتی‌متر)	عرض برگ (سانتی‌متر)	تعداد برگ در بوته (سانتی‌متر)	تعداد برگ (سانتی‌متر)	قطر گل‌آذین (سانتی‌متر)	تعداد گل در گل‌آذین (سانتی‌متر)	قطر (میلی‌متر)	ارتفاع سوخ (میلی‌متر)	وزن متوسط سوخ (گرم)
۱	ملایر	۳۵a-d	۴/۵۲a-d	۴/۳۱ab	۳۸ef	۱۰a-g	۱۱۳fg	۵۹/۱۰d	۴۶b	۹۰/۲۵ef
۲	سنندج	۳۲/۸۰ef	۵/۲۰ab	۵/۲۵ab	۳۷/۳۱e-g	۱۰/۲۳a-f	۱۴۶/۵۰a	۵۶/۷۳e	۴۲/۱۸cd	۸۷/۴۵g
۳	کوه‌رنگ	۳۳/۷۱d-f	۴/۳۳a-d	۵/۲۵ab	۴۹/۵۰b	۱۰/۸۴a-c	۱۴۶a	۹۰/۴۳b	۴۹/۲۴a	۹۷/۴۱b
۴	یاسوج	۳۶/۲۵ab	۴/۱۲a-d	۴/۷۵ab	۵۳/۸۴a	۱۱/۸۶a	۱۳۰/۵۰b	۶۰/۲۵cd	۴۶/۲۳b	۹۱/۷۸e
۵	بروجرد	۲۶/۹۰hi	۳/۱۰d	۴b	۲۴/۷۵m	۹/۱۵c-g	۱۱۱/۵۰gh	۴۷/۲۳g	۳۶/۹۲f	۵۵/۳۲i
۶	خرم‌آباد	۲۵/۸۹ij	۳/۶۲b-d	۴b	۲۳n	۸/۹۸c-g	۱۱۰/۵۰hi	۴۵/۱۰h	۳۵g	۵۳/۸۲ij
۷	الیگودرز	۲۴/۵۰jk	۳/۲۵cd	۴/۲۵b	۲۱o	۸/۵e-g	۱۰۷jk	۴۵/۵۰gh	۳۴/۲۰gh	۵۳/۱۷j
۸	اراک	۳۲/۹۴ef	۴/۲۶a-d	۴/۵۰ab	۲۵/۳۴m	۱۰/۳۶a-e	۱۰۴/۵۰l	۵۸/۳۱de	۴۱/۱۰de	۸۸/۳۲g
۹	نورآباد	۲۳/۵۰k	۳/۱۸d	۴b	۲۰o	۸/۲۰g	۱۰۷k	۴۲i	۳۲i	۵۱k
۱۰	خمین	۲۹/۶۱g	۴/۴۱a-d	۴b	۳۴/۶۱hi	۹/۶۵b-g	۷۹p	۵۲/۵۰f	۴۲/۲۵cd	۸۳/۲۷h
۱۱	کنگاور	۳۴/۶۲b-f	۴/۳۲a-d	۴/۷۵ab	۳۰/۴۷k	۱۰/۵۰a-d	۱۰۱/۵۰m	۶۰/۲۰cd	۴۳/۲۰c	۸۸/۲۸g
۱۲	صحنه	۳۲/۱۴f	۴a-d	۴/۲۵b	۲۸/۷۳l	۱۰/۶۱a-d	۸۵/۵۰n	۵۲/۸۹f	۴۰/۹۸de	۸۲/۲۰h
۱۳	دورود	۲۴/۱۲jk	۳/۲۸cd	۴/۵۰ab	۲۱o	۸/۴۰fg	۱۰۷/۵۰k	۴۴/۲۰h	۳۲/۹۰hi	۵۲/۵۰jk
۱۴	کازرون	۲۸/۵۰gh	۳/۱۰d	۴/۵۰ab	۴۵/۳۱c	۸/۷۱d-g	۸۳o	۳۵/۵۰z	۳۱/۲۰i	۳۵/۸۴i
۱۵	داران	۳۲/۶۰f	۴/۸۹a-d	۵/۵۰ab	۳۷fg	۹/۲۰c-g	۱۱۸d	۸۹/۶۱b	۴۷/۹۷a	۹۵/۲۰c
۱۶	خوانسار	۳۳/۸۶c-f	۵/۴۲a	۶a	۳۸/۸۴e	۹/۹۱b-g	۱۲۰/۵۰c	۱۰۸/۴۰a	۴۹/۵۰a	۱۲۲/۵۰a
۱۷	همدان	۳۶/۷۱a	۵/۱۴ab	۵/۵۰ab	۴۰/۴۸d	۱۱/۲۱ab	۱۱۵/۵۰e	۶۱/۵۰c	۴۸/۲۱a	۹۳/۴۲d
۱۸	کرمانشاه	۳۳/۳۰df	۴/۵a-d	۴/۵۰ab	۳۴/۱۲ij	۹/۳b-g	۶۳/۵۰q	۵۳/۴۱f	۳۹/۸۷e	۸۳h
۱۹	توحیدلو	۳۲/۱۰f	۴/۲۳a-d	۴/۵۰ab	۳۳j	۸/۱۰g	۱۰۹/۵۰ij	۵۶/۵۰e	۴۳c	۸۷/۲۰g
۲۰	نهبوند	۳۵/۷۳a-c	۴/۹۸a-c	۵ab	۳۸/۱۲ef	۱۰/۴۰a-e	۱۱۳/۵۰f	۵۸/۹۰d	۴۶/۱۵b	۹۰f
۲۱	غرق‌آباد	۳۳/۴۱d-f	۴/۳۰a-d	۴/۵۰ab	۳۶gh	۹/۲۰c-g	۱۱۰hi	۵۷e	۴۵/۱۰b	۸۸/۸۰fg
	میانگین	۳۱/۳۴	۴/۲۰	۴/۴۴	۳۳/۸۳	۶/۶۸	۱۰۸/۷۸	۵۸/۸۲	۴۱/۵۸	۷۹/۵۵

ستون‌های دارای حروف مشابه، تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد با هم ندارند.

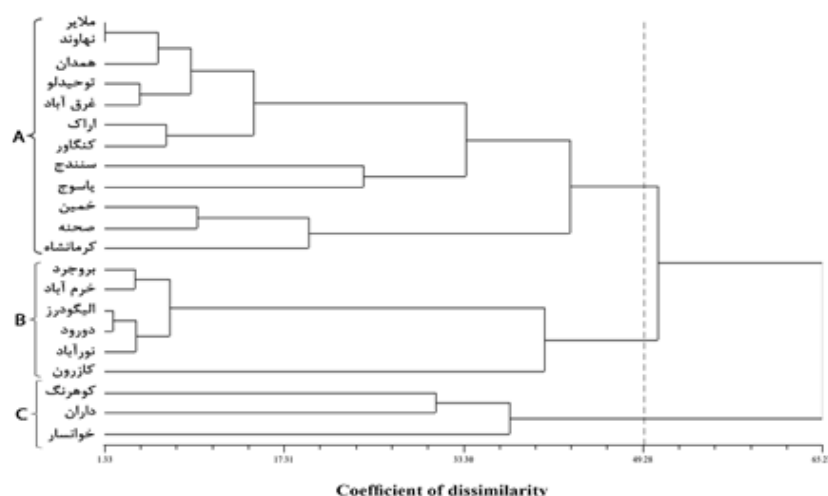
برگ قرار گرفتند و با ضرایب مثبت بالا توانستند ۲۱/۶۵ درصد واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه به عامل‌ها توانست ۲۰ صفت مطالعه‌شده را به دو عامل کاهش دهد که بیشترین سهم را در توجیه واریانس داشتند (جدول ۴).

جدول ۳. مقایسه میانگین هر کلاستر با میانگین کل صفات مطالعه‌شده در توده‌های موسیر ایرانی

صفات	نام کلاستر	یک	دو	سه	میانگین کل
طول برگ		۳۳/۷۲	۲۵/۵۷	۳۳/۳۹	۳۱/۳۴
عرض برگ		۴/۵۰	۳/۲۵	۴/۱۸۸	۴/۲۰
تعداد برگ در بوته		۴/۶۵	۴/۲۱	۵/۵۸	۴/۴۴
طول ساقه گل‌دهنده		۳۵/۸۳	۲۵/۸۴	۴۱/۷۸	۳۳/۸۳
قطر گل‌آذین		۱۰/۱۲	۸/۶۶	۹/۹۸	۹/۶۸
تعداد گل در گل‌آذین		۱۰۶/۰۴	۱۰۵/۲۵	۱۲۸/۱۷	۱۰۸/۷۸
قطر سوخ		۵۷/۲۷	۴۳/۲۵	۹۶/۱۵	۵۸/۸۲
ارتفاع سوخ		۴۳/۶۹	۳۳/۷۰	۴۸/۹۰	۴۱/۵۸
وزن متوسط سوخ		۸۷/۸۳	۵۰/۲۷	۱۰۵/۰۴	۷۹/۵۵

گروه سوم دو زیرگروه داشت. زیرگروه اول شامل توده‌های کوه‌رنگ و داران و توده خوانسار به تنهایی در زیرگروه دوم قرار گرفت. توده‌های این گروه از نظر طول برگ، عرض برگ، تعداد برگ در بوته، طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل‌آذین، تعداد گل در گل‌آذین، قطر سوخ، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ بیشتر از مقدار میانگین بودند (جدول ۳).

در تجزیه به عامل‌ها، دو عامل اصلی و مستقل مجموعاً ۷۸/۲۶ درصد واریانس کل را توجیه کردند. در عامل اول صفات طول برگ، عرض برگ، تعداد برگ در بوته، طول ساقه گل‌دهنده، قطر سوخ، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ و قابلیت گل‌کردن با ضرایب مثبت بالاتر توانستند ۵۶/۶۰ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. در عامل دوم صفات تعداد گل در گل‌آذین و وجود کرک در



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای توده‌های موسبیر ایرانی براساس داده‌های مورفولوژیکی

جدول ۴. نتایج تجزیه به عامل‌ها و مقدار واریانس توجیه‌شده

در توده‌های موسبیر ایرانی		
ضرایب عاملی		
صفات	۱	۲
طول برگ	۰/۸۸	-۰/۰۲
عرض برگ	۰/۸۹	۰/۰۳
تعداد برگ در بوته	۰/۷۷	۰/۳۸
طول ساقه گل‌دهنده	۰/۷۱	۰/۱۲
قطر گل‌آذین	۰/۷۳	-۰/۰۱
تعداد گل در گل‌آذین	۰/۳۷	۰/۷۸
قطر سوخ	۰/۸۰	۰/۲۵
ارتفاع سوخ	۰/۹۴	۰/۱۴
وزن متوسط سوخ	۰/۹۴	۰/۰۲
آنتوسیانین در پایه برگ	۰/۰۹	-۰/۸۸
قابلیت گل‌کردن	۰/۸۸	-۰/۳۶
زمان گل‌دهی	-۰/۸۸	۰/۳۶
وجود کرک در برگ	-۰/۰۹	۰/۹۶
مقادیر ویژه	۷/۳۶	۲/۸۱
درصد واریانس	۵۶/۶۰	۲۱/۶۵
درصد تجمعی واریانس	۵۶/۶۰	۷۸/۲۶

براساس ضریب تشابه ۷۲ درصد، نمونه‌های موسبیر بررسی‌شده در پنج گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل توده کازرون بود و در گروه دوم فقط توده یاسوج قرار گرفت. توده‌های الیگودرز ۱، الیگودرز ۲، خوانسار، داران، کوهرنگ و سندیج گروه سوم را تشکیل دادند. گروه چهارم شامل توده‌های الیگودرز ۳ و خمین بودند. گروه پنجم بزرگ‌ترین گروه بود و توده‌های ملایر، الیگودرز ۴، خرم‌آباد، نورآباد، کنگاور، همدان، کرمانشاه، بروجرد، غرق‌آباد، اراک، دورود، توحیدلو و نهاوند در این گروه قرار گرفتند.

روابط ژنتیکی درون‌توده‌ای با استفاده از آنالیز پی.سی.او.^۱ براساس داده‌های آ.اف.ال.بی. انجام شد. که آلل‌ها در دو عامل اصلی که ارزش تأثیر بالایی داشتند، قرار گرفتند (جدول ۶). عامل اول ۸۳/۸۲ درصد و عامل دوم ۱/۵۲ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. در مجموع عامل‌های اول و دوم ۸۵/۳۵ درصد از واریانس را توجیه کردند.

بحث

در گروه‌بندی براساس صفات مورفولوژیکی توده‌ها به سه گروه تقسیم شدند. در گروه اول تمام توده‌های متعلق به استان همدان، یک توده از استان مرکزی، یک توده از استان کرمانشاه، یک توده از استان کردستان و یک توده از استان کهگیلویه و بویراحمد در یک زیرگروه قرار گرفتند. در زیرگروه اول توده‌های ملایر و نهاوند در یک

نتایج AFLP

چهار ترکیب آغازگری استفاده‌شده در مجموع ۳۷۶ نوار تولید کردند که ۲۰۴ عدد آن‌ها چندشکلی نشان دادند (جدول ۵). اندازه این نوارها در محدوده ۵۰-۵۰۰ جفت باز بود. در شکل ۲ الگوی نواری ترکیب آغازگری E-AGA+M-CGT با روش کاپیلاری نشان داده‌شده است. بر اساس ضریب تشابه به‌دست‌آمده از آلل‌های آ.اف.ال.بی. دندروگرام با روش UPGMA رسم شد (شکل ۳). ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه و دندروگرام معنادار بود ($r=0/80$) که نشان‌دهنده برآزش خوب روابط مولکولی داخل توده‌هاست.

گرفت. اگرچه کازرون کمترین عرض جغرافیایی را داشت، ولی از نظر صفات مورفولوژیکی در کنار توده‌های بسیار دور از نظر جغرافیایی قرار گرفت. قرارگیری توده‌ها در این گروه براساس صفات مورفولوژیکی، به جز در مورد توده کازرون، منطبق با پراکنش جغرافیایی بود. گروه سوم گروه کوچک‌تری را تشکیل داد که متعلق به استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری بودند که از نظر جغرافیایی در مجاورت هم هستند و از نظر شرایط آب‌وهوایی شبیه به هم هستند. بنابراین، این گروه نیز تا حد زیادی با پراکنش جغرافیایی مطابق بود.

دسته کاملاً مشابه قرار گرفتند که نشان‌دهنده تشابه بسیار زیاد این دو توده است. در زیرگروه دوم یک توده از استان مرکزی و دو توده متعلق به استان کرمانشاه قرار گرفتند. این استان‌ها جزء استان‌های مرکزی، جنوب غربی و غرب کشور است که از نظر شرایط آب و هوایی شبیه به هم هستند.

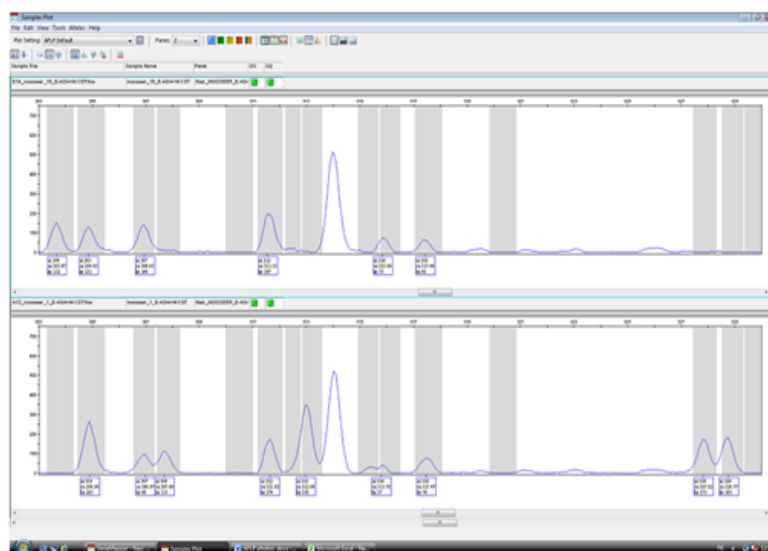
در گروه دوم تمامی توده‌های متعلق به استان لرستان در یک زیرگروه قرار گرفتند که این مناطق از نظر شرایط آب و هوایی بسیار شبیه به هم هستند. توده کازرون متعلق به استان فارس به تنهایی در زیرگروه دوم قرار

جدول ۵. توالی و تعداد نشانگرهای حاصل از چهار ترکیب آغازگری AFLP استفاده شده روی توده‌های موسیر ایرانی

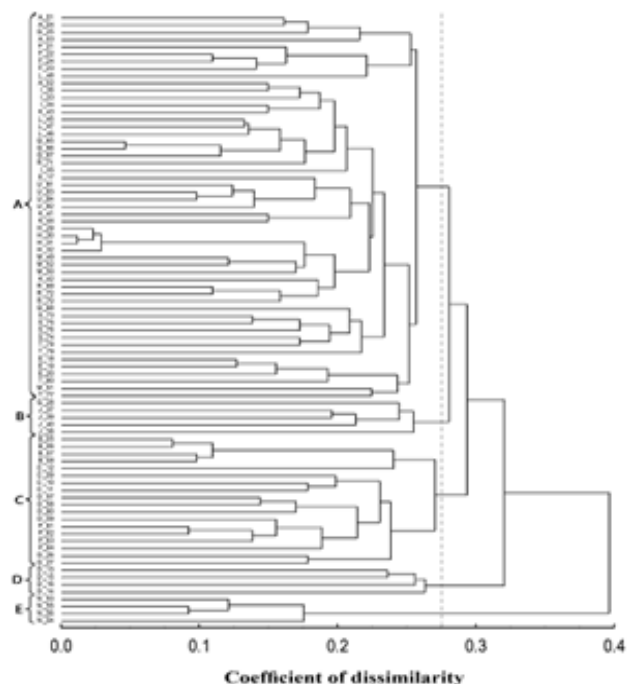
جفت آغازگر	تعداد کل باندهای تولیدشده	تعداد باندهای واجد تنوع	درصد باندهای چندشکل هر آغازگر
E-ACC+M-CGA	۹۰	۵۵	۶۱/۱۱
E-ACC+M-CGT	۵۸	۲۵	۴۳/۱۰
E-AGA+M-CGT	۱۱۱	۶۳	۵۶/۷۶
E-AGG+M-CGT	۱۱۷	۶۱	۵۲/۱۴
مجموع	۳۷۶	۲۰۴	-
میانگین	۹۴	۵۱	۵۳/۲۸

جدول ۶. مقادیر ویژه، درصد واریانس و واریانس تجمعی برای دو عامل اصلی مشتق شده از مکان‌های AFLP در توده‌های موسیر ایرانی مطالعه شده

عامل	مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد تجمعی واریانس
۱	۷۰/۴۱	۸۳/۸۲	۸۳/۸۲
۲	۱/۲۸	۱/۵۲	۸۵/۳۵



شکل ۲. الگوی باندهای ترکیب آغازگری E-AGA + M-CGT با روش کاپیلاری روی دو توده از موسیرهای ایرانی



شکل ۳. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای توده‌های موسیر ایرانی براساس داده‌های AFLP به روش UPGMA. A: ملایر، B: سنندج، C: کوه‌رنگ، D: یاسوج، E: بروجرد، F: خرم‌آباد، G: الیگودرز، H: اراک، I: نورآباد، J: خمین، K: کنگاور، L: صحنه، M: دورود، N: کازرون، O: داران، P: خوانسار، Q: همدان، R: کرمانشاه، S: توحیدلو، T: نهاوند، U: غرق‌آباد

شده چندشکلی نشان دادند، اما توده‌های موسیر مطالعه‌شده در هر گروه درصد زیادی از نشانگرهای AFLP را به اشتراک گذاشتند. بخشی از تنوع مشاهده‌شده در این پژوهش می‌تواند حاصل تغییرات کروموزومی و موتاسیون‌ها در طول زمان باشد (Matus *et al.*, 1999).

گروه اول فقط شامل توده کازرون بود که از نظر عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با مناطق دیگر کاملاً متفاوت بود و تنها منطقه پراکنش موسیر در جنوب ایران است که هوای نسبتاً گرم دارد. توده کازرون در پایین‌ترین قسمت دندروگرام و با تفاوت زیادی (۴۰ درصد) نسبت به سایر توده‌ها قرار گرفت. کازرون در ناحیه غرب استان فارس با عرض ۲۹ درجه و ۳۹ دقیقه شمالی و طول ۵۱ درجه و ۳۹ دقیقه شرقی واقع شده است. کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده از این منطقه مشابه بودند و در تجزیه خوشه‌ای کاملاً کنار هم قرار گرفتند. این امر نشان‌دهنده این است که به احتمال زیاد نمونه‌های متعلق به توده کازرون از طریق تکثیر غیرجنسی به وجود آمده‌اند. بنابراین، قرارگرفتن همه نمونه‌های این منطقه در یک خوشه و در کنار هم امری طبیعی است. این منطقه تابستان‌های گرم و زمستان‌های معتدل دارد و میانگین بارندگی آن ۵۰۰ میلی‌متر در

نتایج حاصل از مطالعه مورفولوژیکی قبلی (Ebrahimi *et al.*, 2008) روی توده‌های موسیر ایرانی آن‌ها را در سه گروه اصلی قرار داد. در گروه اول دو توده مربوط به استان فارس، یک توده از استان مرکزی، کرمانشاه، اصفهان و همدان قرار گرفتند. گروه دوم شامل توده‌های کهگیلویه و بویراحمد، یک توده از استان مرکزی، لرستان، کردستان و یک توده مربوط به استان فارس بود و در گروه سوم توده‌های مربوط به استان‌های چهارمحال و بختیاری، یک توده از استان مرکزی، کرمانشاه و دو توده از استان فارس جای گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه از نظر جغرافیایی تا حد زیادی با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. همچنین در بین توده‌های مطالعه‌شده در پژوهش قبلی توده خوانسار بیشترین میانگین وزن سوخ و عملکرد در مترمربع داشت که با نتایج ما مطابقت دارد، اما طول ساقه گل‌دهنده و تعداد گل در گل‌آذین بین توده‌های مطالعه‌شده در آزمایش کنونی کمتر از مطالعه قبلی بود که دلیل آن وجود سرمای ناگهانی (۵- درجه سانتی‌گراد) در اوایل فروردین‌ماه و ظهور پیش از موعد ساقه‌های گل‌دهنده با طول کمتر بود. در بقیه صفات تفاوت قابل ملاحظه‌ای با مطالعه قبلی مشاهده نشد. بیشتر قطعات حاصل از ترکیبات آغازگری استفاده

غیرجنسی آن سبب شباهت آن‌ها به هم و قرارگیری ۲۰ توده در کنار هم شده است. براساس نتایج این مطالعه شاید بتوان گفت که موسیر در دو شرایط آب و هوایی از ایران پراکنش دارد: یکی مناطق با آب و هوای گرم (استان فارس) و دیگری مناطقی با اقلیم سرد (استان‌های مرکزی، جنوب غرب و غرب).

قرارگرفتن گیاهان متعلق به یک توده در کنار هم، می‌تواند غیر از تکثیر با سوخ‌های کوچک کنار سوخ مادری، احتمالاً ناشی از تولید بذریه‌های حاصل از آپومیکیسی (Apomict) در این گیاه باشد که در نتیجه منجر به تولید گیاهان مشابه گیاه مادری شده است که نیاز به بررسی بیشتر دارد. این پدیده قبلاً در برخی از گونه‌های جنس آلیوم از جمله برخی از واریته‌های *Allium tuberosum* (Fritsch & Friesen, 2002) و همچنین پیاز قرمز آذرشهر (Hassandokht & Campion, 2002) گزارش شده است. همچنین از آنجا که در مطالعات قبلی (Ebrahimi et al., 2008) تشکیل پیازچه هوایی (Bulbil) در گل‌آذین موسیر ایرانی مشاهده شده است، می‌تواند عاملی در جهت تکثیر غیرجنسی این گیاه در طبیعت باشد. وجود پیازچه‌های هوایی در گل‌آذین سیر نیز به فراوانی دیده شده است و یکی از روش‌های تکثیر این گیاه است.

Ebrahimi et al. (2009) با مطالعه مولکولی توده‌های موسیر ایرانی با نشانگر RAPD گزارش کردند در تجزیه خوشه‌ای با میزان تشابه ۵۲ درصد توده‌های مطالعه‌شده در سه گروه اصلی قرار گرفتند. در گروه اول توده‌های مربوط به استان‌های کردستان، لرستان، همدان، مرکزی، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و چهارمحال و بختیاری قرار گرفتند. در گروه دوم پنج توده متعلق به استان فارس جای گرفتند و توده خوانسار متعلق به استان اصفهان به‌تنهایی گروه سوم را تشکیل داد. گروه‌بندی توده‌ها در دندروگرام با منشأ جغرافیایی آن‌ها مطابقت مطلوبی نشان داد. نتایج پژوهش مذکور تا حد زیادی با نتایج حاصل از نشانگر AFLP استفاده‌شده در آزمایش حاضر مطابقت دارد و نشان می‌دهد که نشانگر RAPD به‌رغم دقت پایین نسبت به نشانگر AFLP توانایی بالایی در تفکیک توده‌های مطالعه‌شده داشت و توانست توده‌های مربوط به منطقه گرم استان فارس را از سایر توده‌ها تفکیک کند.

سال یعنی دو برابر متوسط بارندگی کل کشور است و ازجمله پرباران‌ترین شهرهای استان فارس محسوب می‌شود. پروفیل بانندی حاصل از داده‌های AFLP توده کازرون در بیشتر مکان‌های ژنی مطالعه‌شده با بقیه توده‌های مطالعه‌شده متفاوت بود.

کلیه نمونه‌های متعلق به توده یاسوج در گروه دوم قرارگرفتند و باز احتمالاً به دلیل تکثیر غیرجنسی همه نمونه‌های این منطقه نیز در کنار هم جای گرفتند. توده یاسوج با فاصله در گروه مجزایی قرار گرفت. یاسوج از نظر عرض جغرافیایی با بقیه مناطق مطالعه‌شده دیگر تفاوت داشت. گروه سوم به دو زیرگروه تقسیم شد: زیرگروه اول شامل توده‌های سنندج و کوه‌رنگ بود. کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده از این مناطق مشابه بودند و در تجزیه خوشه‌ای کاملاً کنار هم قرار گرفتند. زیرگروه دوم شامل توده‌های داران، خوانسار و الیگودرز ۱ و الیگودرز ۲ بود که دو توده اول از نظر عرض جغرافیایی بسیار نزدیک به هم و توده الیگودرز مربوط به منطقه جغرافیایی دیگری است. این امر می‌تواند به دلیل جابه‌جایی بذر این گیاه توسط چرای دام‌ها و همچنین انتقال سوخ آن به‌وسیله افراد محلی به این منطقه در زمان‌های گذشته باشد. در گروه سوم توده‌های داران، کوه‌رنگ و خوانسار هر سه مربوط به دو استان اصفهان و چهارمحال بختیاری هستند که این دو استان از نظر عرض جغرافیایی و شرایط اقلیمی نزدیک به هم هستند.

در گروه چهارم دو توده الیگودرز ۳ و خمین که هر دو عرض جغرافیایی بسیار نزدیک به هم دارند قرار گرفتند و این گروه نیز منطبق بر پراکنش جغرافیایی است. در گروه پنجم توده‌ها متعلق به چهار استان لرستان، کرمانشاه، همدان و مرکزی قرار داشتند. این توده‌ها متعلق به مرکز و غرب کشور هستند که از نظر شرایط اقلیمی مشابه بوده و همگی آب و هوای سرد و زمستان‌های برفی دارند و استان‌های مجاور هم هستند.

براساس ضریب تشابه ۶۰ درصد در آنالیز AFLP، توده کازرون با فاصله زیاد از سایر توده‌ها در گروه مجزایی قرار گرفت و بقیه موسیرهای مطالعه‌شده در گروه دوم قرار گرفتند. می‌توان نتیجه گرفت که بیشتر موسیرهای ایرانی مربوط به مناطق جنوب غرب، مرکز و غرب کشور، که به این گروه تعلق دارند، تشابه ژنتیکی زیادی دارند. به احتمال زیاد جابه‌جایی سوخ در این مناطق و تکثیر

نتیجه‌گیری

تکنیک AFLP توانست توده‌های بومی موسیر ایرانی را از هم تفکیک کند و این روش ابزاری مناسب برای مطالعه تنوع درون‌توده‌ای موسیر است. همچنین اگرچه موسیر از طریق روش‌های غیرجنسی نیز در طبیعت قابل تکثیر است، اما توده‌های بومی موسیر ایرانی تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی دارد. با این حال بیشتر نمونه‌های مناطق مجاور هم از نظر جغرافیایی، در گروه‌بندی خوشه‌ای در کنار هم قرار گرفتند، به طوری که نمونه‌های منطقه کازرون که منطقه گرمسیری است به طور کامل از بقیه نمونه‌ها تفکیک شد. از میان توده‌های مطالعه‌شده، توده خوانسار که بیشترین میانگین تعداد برگ در بوته، قطر سوخ، ارتفاع سوخ و وزن متوسط سوخ را داشت برای کشت و بهره‌برداری در مناطق دارای آب و هوای مساعد توصیه می‌شود.

پنج ترکیب آغازگری (Sadeghzadeh-Ahari (2010) را برای مطالعه تنوع درون و بین توده‌های شنبلیله‌های ایرانی استفاده کرد و نتیجه گرفت که باندهای تولیدشده در محدوده ۵۰ تا ۷۰۰ جفت باز بود و متوسط تعداد نوارهای مشاهده‌شده به‌ازای هر ترکیب آغازگر ۲۹/۴ و متوسط نوارهای چندشکل در هر لاین ۲۵/۳ بود. همچنین Mehdi- Khanlou *et al.* (2011) در مطالعه تنوع ژنتیکی رقم‌های یونجه با نشانگر AFLP نتیجه گرفتند که این نشانگر ابزار مناسب و دقیقی برای ارزیابی تنوع درون و بین توده‌ای در گیاه مذکور است. اگرچه Volk *et al.* (2004) توانستند با استفاده از تکنیک AFLP از میان توده‌های مطالعه‌شده سیر، نمونه‌های تکراری را شناسایی کنند، اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که توده‌های موسیر بومی ایران از نظر ژنتیکی توده‌هایی متفاوت بود و نمونه تکراری در آن‌ها وجود نداشت.

REFERENCES

- Barker, J.H.A., Matthes, M., Arnold, G.M., Edwards, K.J., Ahman, I., Larsson, S. & Karp, A. (1999). Characterization of genetic diversity in potential biomass willows by RAPD and AFLP analysis. *Genome*, 42, 173-183.
- Dashti, F. (2003). The study of genetic diversity and phylogeny of Tareh Irani in *Alliums* using morphological characters and molecular markers. Ph.D. Dissertation in Horticultural Science, University of Tehran, pp. 103. (In Farsi)
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). Isolation of DNA from fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Ebrahimi, R., Zamani, Z. & Kashi, A. (2008). Genetic diversity evaluation of Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) genotypes using morphological characters. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 39(1), 147-154. (In Farsi)
- Ebrahimi, R., Zamani, Z. & Kashi, A. (2009). Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 119, 345-351.
- Fritsch, R.M. & Friesen, N. (2002). Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch H.D., Currah L. (eds.) *Allium Crop Science: Recent Advances*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 5-30.
- Gahreman, A. (1984). Color Atlas of Iranian Plants. Institute of Forestries and Grasslands, Botany Division, No. 5, 512 pp. (In Farsi)
- Hassandokht, M.R. & Campion, B. (2002). Low temperature, medium and genotype effect on the gynogenic ability of onion (*Allium cepa* L.) flowers cultured *in vitro*. *Advances in Horticultural Science*, 16 (2), 72- 78.
- Ipek, M. & Simon, P.W. (2001). Genetic diversity in garlic (*Allium sativum* L.) as assessed by AFLPs and Isozymes. *American Society for Horticultural Science 98th Annual Conference and Exhibition*.
- Ipek, M., Ipek, A. & Simon, P.W. (2003). Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 246-252.
- Ipek, M., Ipek, A. & Simon, P.W. (2008a). Genetic characterization of *Allium tuncelianum*: An endemic edible *Allium* species with garlic odor. *Scientia Horticulturae*, 115, 409-415.
- Ipek, M., Ipek, A. & Simon, P.W. (2008b). Molecular characterization of Kastamonu garlic: An economically important garlic clone in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 115, 203-208.
- Lee, M., Lim, Y.P. & Bang, J.W. (2002). Genetic analysis of garlic (*Allium sativum* L.) cultivars using AFLP. *Korean Journal of Genetics*, 24(1), 75- 81.
- Matus, I., Gonzalez, M.I. & Del Poso, A. (1999). Evaluation of phenotypic variation in a chilean collection of garlic (*Allium sativum* L.) using multivariate analysis. *International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)*. Newsletter, 117, 31-36.
- Mehdi-Khanlou, Kh., Vandepitte, K., Kheibarshekan, L. & Van Bockstaele, E. (2011). Towards an optimal sampling strategy for assessing genetic variation within and among white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using AFLP. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2), 252-258.

16. Sadeghzadeh-Ahari, D. (2010). Evaluation of drought and genetic diversity of Iranian fenugreek landraces using AFLP markers. Ph.D. Thesis in Horticultural Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, pp. 194. (In Farsi)
17. Vafae, Y., Dashti, F., Mardi, M. & Ershadi, A. (2009). A detection of genetic diversity among Iranian garlic clones (*Allium sativum* L.) via morphological characters and AFLP marker. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 40(1), 13-22. (In Farsi)
18. Volk, G.M., Henk, A.D. & Richards, Ch.M. (2004). Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(4), 559-569.
19. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.