ارزیابی تنوع برخی از ژنوتیپ‌های پیاز جنوب و مرکز ایران از نظر مقاومت به بولتینگ و ارتباط آن با نشانگر مولکولی SSR

Evaluation the Diversity of Some Center and South Iranian Onion (*Allium cepa* L.) Genotypes for Bolting Resistance and It`s Relationship With SSR Marker

اسد معصومی اصل[۱*]، سیده مریم زرین[۲]، مسعود دهداری[۳] و رضا امیری فهلیانی[۱]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲۲

چکیده

تشکیل ساقه گل‌دهنده در زمان تولید سوخ پیاز، کیفیت و کمیت محصول را کاهش می‌دهد. بنابراین، مطالعه نحوه بروز این پدیده جهت شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به بولتینگ مهم است. با هدف بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های پیاز مرکز و جنوب ایران از جهت گل‌دهی، بذور ۱۶ ژنوتیپ پیاز بومی ایران (۶ ژنوتیپ دریافتی از بانک ژن ملی ایران و ۱۰ ژنوتیپ جمع‌آوری شده از نواحی مختلف جنوب و مرکز کشور) به همراه دو رقم خارجی در گلدان کشت و در مرحله هشت برگی، به مدت ۴۵ و ۷۰ روز تحت تیمار دمایی قرار گرفتند. از ۱۲ آغازگر ریزماهواره فقط ۱۰ آغازگر باندهای قابل‌قبولی تولید کردند. متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، ۰/۳۸ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و موردانتظار به‌ترتیب ۰/۴۹ و ۰/۴۱ بودند. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در شش گروه قرار داد. نتایج حاصل از رگرسیون لجستیک نیز نشان داد که بین برخی آلل‌ها با ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مرتبط با بولتینگ پیوستگی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تجزیه خوشه‌ای، گل‌دهی، رگرسیون لجستیک

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب استادیاران، دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج
*: نویسنده مسوول Email: Masoumiasl@yu.ac.ir

مقدمه

پیاز گیاهی است دو ساله و از جنس *Allium* که بیشتر برای تولید محصول به‌عنوان گیاه یک‌ساله کشت می‌شود. پیاز به‌دلیل وجود ترکیبات معدنی، قند، ویتامین ث و ترکیبات فرار گوگردی، دارای ارزش غذایی زیادی است. پیاز پس از سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی در رتبه سوم تولید قرار دارد و از سبزیجات مهم در سبد غذایی مردم است، ولی به‌دلیل رطوبت بالا، فسادپذیر می‌باشد و انبارداری آن ضمن هزینه‌بر بودن، نمی‌تواند کیفیت محصول تولیدی را حفظ نماید. بر همین اساس، تولید مستمر محصول تازه آن یکی از دغدغه‌های برنامه‌ریزان کشاورزی است ولی کشت پاییزه آن با مشکل بولتینگ روبه‌رو است (عالم‌زاده انصاری، ۱۳۸۹). هرچند گل‌دهی یکی از مراحل اصلی تولید بذر به شمار می‌رود، ولی تشکیل شاخه گل‌دهنده در زمان تولید سوخ پیاز به‌واسطه مصرف موادغذایی ذخیره شده در غده، باعث کاهش کیفیت و کمیت محصول می‌شود؛ بنابراین مطالعه نحوه بروز این پدیده، شرایط محیطی مؤثر و عوامل تحریک‌کننده آن جهت شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به بولتینگ و ترکیب آن‌ها در ارقام مادری برای تولید بذور دورگ مهم است و می‌تواند منجر به پایداری بیشتر عملکرد محصول گردد. نتایج محققان حاکی از آن است که اندازه بحرانی گیاه جهت تحریک شدن به تولید گل‌آذین، به رقم بستگی دارد *بروستر* (Brewster, 1985). هم‌چنین مدت زمان لازم برای بهاره‌سازی در ارقام مختلف متفاوت است. ارقامی که در عرض‌های جغرافیایی کم رشد می‌کنند، مدت زمان لازم برای بهاره کردن آنها کوتاه است، اما ارقامی که در عرض‌های جغرافیایی زیاد رشد و نمو می‌کنند، مدت زمان نسبتاً زیادی نیاز دارند (عالم‌زاده انصاری، ۱۳۸۹). در بررسی‌های دیگر نیز گفته شده که دمای مورد نیاز برای تحریک گل‌دهی بستگی به رقم داشته و بین ۵ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد متغیر است *خوخار* و همکاران؛ *ویب*؛ *بروستر* (Khokhar *et al*., 2007; Wiebe, 1990; Brewster, 1982). مطالعات زیادی در خصوص استفاده از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع در گونه‌های گیاهی انجام شده است. در پیاز خوراکی، *فیشر* و *باخمن* (Fischer and Bachman, 2000)، تعداد ۳۰ ریزماهواره را شناسایی کردند که بیش‌تر آن‌ها دارای موتیف GT بودند و از آن‌ها در ارزیابی تنوع ژرم‌پلاسم پیاز استفاده کردند، نتایج آن‌ها نشان‌داد که از ۳۰ جفت آغازگر اختصاصی ریزماهواره معرفی‌شده در پیاز خوراکی، تنها ۱۵ جفت از آن‌ها در تفکیک رقم‌های دیپلوئید این جنس می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. *دنیکوئین* و همکاران (Dannequin *et al*., 1997)، *مک‌کالوم* و همکاران (McCallum *et al*., 2006) و *ماهاجان* و همکاران (Mahajan *et al*., 2009) نیز از نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در پیاز استفاده کرده‌اند. موسوی‌زاده و همکاران (۱۳۸۵) برای اولین بار تنوع درون و بین ۲۰ توده بومی پیاز ایران را با استفاده از نشانگر RAPD مورد مطالعه قراردادند. احمدی‌مشگنانی و همکاران (۱۳۹۴) نیز از ۱۱ آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی سیزده ژنوتیپ پیاز ایرانی در مقایسه با دو ژنوتیپ خارجی استفاده کردند. کریمی‌نافچی و همکاران (۱۳۹۰) نیز با بررسی روابط ژنتیکی توده‌های بومی پیاز ایران و مقایسه با برخی از ارقام خارجی، از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره (SSR) استفاده کرده و هتروزیگوسیتی بالا را در این توده‌ها نشان دادند. بررسی ژنتیکی و مطالعات مولکولی گل‌دهی در پیاز توسط *یون هیون* و همکاران (Yun Hyun *et al*., 2009) با تلاقی بین دو رقم متفاوت از نظر مقاومت به گل‌دهی (MOS8 نرعقیم و مقاوم به گل‌دهی، Guikum حساس به گل‌دهی) انجام شد. نسبت‌های تفرق در جمعیت F_2 نشان داد که صفت تأخیر در گل‌دهی به‌وسیله یک مکان ژنی غالب کنترل می‌شود که خاصیت تأخیر در گل‌دهی را به آن می‌دهد. چون تاکنون بررسی تنوع ژنتیکی توده پیازهای بومی ایران از نظر مقاومت به بولتینگ به‌وسیله نشانگر SSR گزارش نشده‌است و با توجه به کارآیی این نشانگر، می‌توان اطلاعات ژنتیکی مفیدی را از نظر ارزیابی ژنتیکی ارقام بومی جمع‌آوری شده به دست آورده و از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی پیاز استفاده نمود. لذا این تحقیق با هدف بررسی تنوع پیازهای مرکز و جنوب کشور از نظر مقاومت به بولتینگ و پیدا کردن نشانگر احتمالی مرتبط با این صفت طراحی گردیده است.

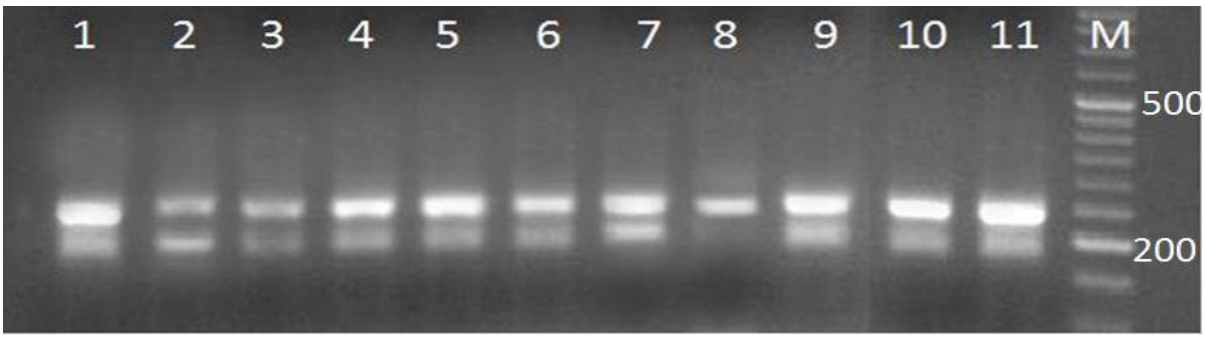
مواد و روش‌ها

در این تحقیق بذور ۶ ژنوتیپ پیاز بومی لرستان، قم، بوشهر، کرمان، هرمزگان و سیستان (دریافتی از بانک ژن موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج)، ۱۰ توده بومی رامهرمز، کازرون، سربیاره (یاسوج)، تشون (بهبهان)، دیل (گچساران)، قلعه‌رئیسی (دهدشت)، بادرود (کاشان)، بهرغان (شیراز) درچه (اصفهان) و نطنز جمع‌آوری شده از مناطق مختلف مرکز و جنوب کشور و نیز دو ژنوتیپ تجاری خارجی گاردسکو و گلدن در شرایط گلدانی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج کشت شدند (تعداد ۱۰ الی ۱۲ عدد بذر از هر توده در یک گلدان حاوی خاک مزرعه، ماسه و کود دامی پوسیده به‌ترتیب به نسبت ۱:۲:۲). تمامی گلدان‌ها در مرحله هشت برگی به اتاق سرما منتقل شدند. اتاق سرما با میانگین دمای شبانه‌روزی ۸ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۱ ساعت روشنایی برای شبیه‌سازی زمستان تنظیم شد. برای بررسی نیاز سرمایی توده‌ها جهت گل‌انگیزی، دو تیمار متفاوت زمانی (۴۵ و ۷۰ روز) برای اعمال بهاره‌سازی در نظر گرفته شد.

پس از پایان هر کدام از دوره‌های سرمایی، گلدان‌ها به گلخانه انتقال داده شدند. صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، وزن، قطر، طول و حجم پیاز و نیز میزان مواد جامد محلول کل برگ، از دستگاه رفراکتومتر ساخت کشور ژاپن (ATAGO مدل E_1) استفاده شد. ابتدا رفراکتومتر توسط آب مقطر کالیبره شد. سپس یک قطره از عصاره برگ بر روی منشور شیشه‌ای ریخته شد و در مقابل نور، عدد بریکس یا مواد جامد محلول که عمدتاً نشانه میزان قند تولید شده در داخل نمونه است، قرائت گردید. و پروتئین کل محلول برگ به روش *کارا* و *میشرا* (Kara and Mishra, 1976) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در این روش مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ درون هاون چینی سرد با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶/۸ یکنواخت شده (هموژن) و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. ۵۰ میکرولیتر از روشناور برداشته، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد به آن اضافه کرده و میزان جذب نوری آن در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل SHIMADZO 54A قرائت گردید و سپس با استفاده از غلظت‌های استاندارد، میزان جذب نوری به غلظت تبدیل شد (r^2=۰/۹۳).

به‌منظور انجام بررسی‌های مولکولی، از نمونه‌های برگی به‌دست آمده از مرحله ۴ برگی استفاده شد. استخراج DNA از برگ‌های جوان به روش *ماری* و *تامسون* (Murray and Thampson, 1980) انجام شد. از دو روش معمول استفاده از سنجش طیف جذبی DNA (روش اسپکتروفتومتری) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استفاده شد. از ۱۲ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد که در جدول ۱ مشخصات این آغازگرها آمده است. کلیه آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش بر اساس مقاله *فیشر* و *باخمن* (2000) انتخاب و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز گردیدند.

برای انجام PCR، ابتدا داخل هر تیوب ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر dNTPmix (۱۰mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر (۴m، ۱۰µ) میکرولیتر DNA (۱۰ng/ml) و ۰/۱۲۵ میکرولیتر Taq DNA Polymerase (۱۰U/µl) اضافه شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل واسرشت‌سازی اولیه ۲ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه‌ای آغاز شد. دمای اتصال هر جفت آغازگر براساس جدول ۱ تنظیم شد و با بسط ۶۰ ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجه با ۳۵ چرخه ادامه یافت. بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام و نهایتاً الکتروفورز محصول PCR روی آگارز دو درصد انجام شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، الگوی نواری حاصل براساس حضور و عدم‌حضور نوار، به صورت صفر و یک مشخص شدند. تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Alex، NTSYS PC 2.02 و Popgene 1.32 صورت پذیرفت. برای رسم دندروگرام روابط ژنتیکی بین توده‌های بومی پیاز و ارقام خارجی پس از مقایسه هر سه ضریب تشابه (دایس، جاکارد و تطابق ساده) با آزمون منتل، ضریب جاکارد (r=۰/۹۹۶) به‌عنوان مناسب‌ترین ضریب برای ترسیم دندروگرام انتخاب گردید. براساس ماتریس تشابه جاکارد، روش‌های مختلف خوشه‌بندی مورد مقایسه قرار گرفت و با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس‌های تشابه و خروجی دندروگرام (r=۰/۷۶۹)، خوشه‌بندی براساس روش UPGMA مناسب‌ترین گروه‌بندی را ایجاد نمود. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات ظاهری مورد مطالعه و بررسی ارتباط بین نشانگرها و مهم‌ترین ویژگی‌های تحمل به بولتینگ از رابطه غیرخطی لجستیک (مخصوص مشاهدات دوتایی) استفاده شد. در این روش از روی ضرایب تأثیر B برای بررسی ارتباط بین نشانگرها و برخی صفات استفاده می‌شود. وقتی ضریب تأثیر B یک متغیر مستقل بر متغیر وابسته مثبت و بزرگ باشد، مرتبط با حضور باند است و اگر منفی باشد، مرتبط با عدم‌حضور باند است. در این بخش از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید.



شکل ۱: الگوی نواری ایجاد شده توسط آغازگر AMS16 برای ژنوتیپ‌های رامهرمز (۱)، کازرون (۲)، سربیاره (۳)، تشون (۴)، دیل (۵)، قلعه‌رئیسی (۶)، بادرود (۷)، نطنز (۸)، بهرغان (۹)، لرستان (۱۰) و قم (۱۱)، چاهک M: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی (شرکت سیناژن)

Fig. 1: Banding pattern produced by AMS16 primer for Ramhormoz (1), Kazeron (2), Sarbiareh (3), Tashon (4), Dil (5), Galaeh-Reisi (6), Badrood (7), Natanz (8), Bahreghan (9), Lorestan (10) and Gom (11) genotypes, M: DNA Ladder 50bp (Cinnagen Company)

جدول ۱: مشخصات جفت آغازگرهای مورد استفاده

Table 1: Characteristics of used primers

نام جفت آغازگر Name of paired primer	توالی آغازگر '3→5' Sequence of primer 5'→3'	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing temperature
AMS 04	F: TAT GTT TTC AGC TGC GAT GTG AG R: AAA TCT AAG CAC GGA TAC CAA GTG	56
AMS 06	F: TGC GAA TGT GAG GTT TTC TGC R: CGA CCC GGA AAT TTC GAT C	55
AMS 08	F: GCC ACG ATG TTG AGA TTT CG R:CCC GAA TAT CCC ACC AGT TC	56
AMS 10	F: TTC ATG TTG TAT TGA GAT TTG G R: GAA GGA ATG GAA GCA GTT C	52
AMS 12	F: AAT GTT GCT TTC TTT AGA TGT TG R: TGC AAA ATT ACA AGC AAA CTG	56
AMS 13	F: CCC CTG AGT AAA TTC AAA ATC C R: TCC TTA GTA TAA TTT CGG GGT AAC	58
AMS 14	F: CCC CTG AGT AAA TTC AAA ATC C R: TCC TTA GTA TAA TTT CGG GGT AAC	60
AMS 16	F:CTG CAT TAA AAC AAC CAA ACT TG R: GAG CTC CAC TTC TTC CAA ACT AG	58
AMS 23	F: GCT GTT CAC TGG TCT ATC TGG R: ATT CGG TGC TGA TTT TCG	58
AMS 26	F: ATC TAA TCA AAG CAT ATG TG R: TTG TCC AAG TAG TTG TGA	52
AMS 29	F: CAT CAG AAA ATC GAC TCA C R: TTG AAA CTT GGA AGG TTG TC	54
AMS 30	F: CAC TAA TGG GGT AAA TAA TGT TCT AC R: TTG CCT TGA AAT CCA GAC	57

جدول ۲: تجزیه واریانس مولکولی برای ژنوتیپ‌های پیاز مورد بررسی

Table 2: Analysis of molecular variance for assessed onion genotypes

سطح معنی‌داری Significant level	درصد واریانس Variance percent	واریانس Variance	میانگین مربعات Mean of Square	درجه آزادی df	منابع تغییر Source of variance
0.19^{ns}	12	0.29	3.22	1	بین توده‌ها و ارقام Between accessions and cultivars
0.12	88	2.18	2.18	16	درون توده‌ها Within accessions

جدول ۳: مشخصات شش مؤلفه اول براساس داده‌های مولکولی

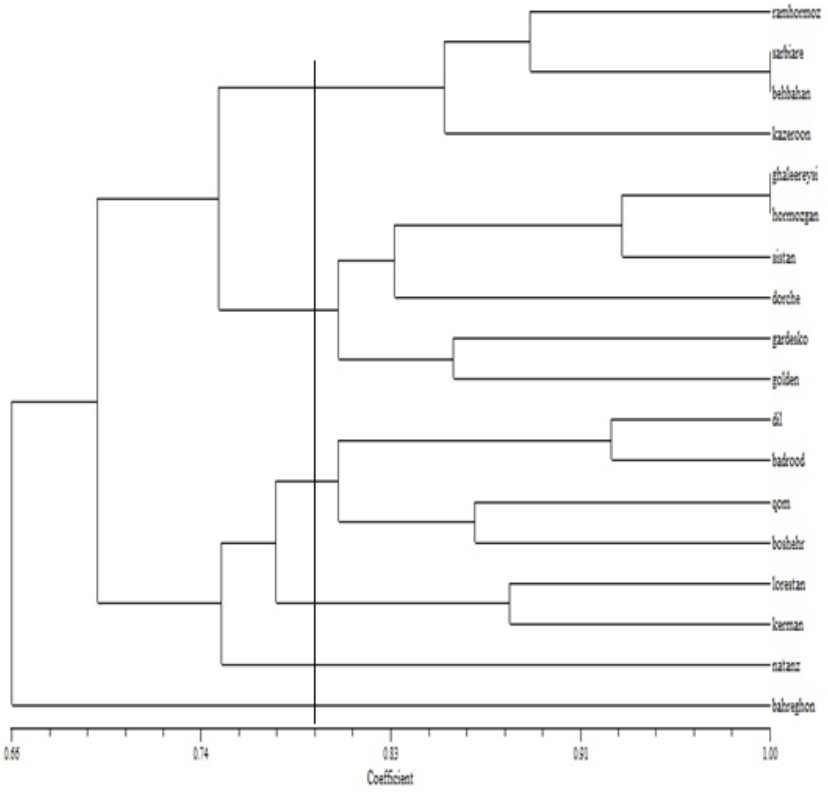
Table 3: Characteristics of six first components based on molecular data

مؤلفه‌ها Components	مقادیر ویژه Eigen values	واریانس جزء Component variance	واریانس تجمعی Accumulative variance
PC1	13.52	75.13	75.13
PC2	1.04	5.79	80.92
PC3	0.71	3.94	84.87
PC4	0.42	2.31	87.18
PC5	0.36	1.98	89.15
PC6	0.32	1.81	90.96

جدول ۴: شاخص‌های تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در ژنوتیپ‌های مورد بررسی پیاز با استفاده از نشانگر SSR

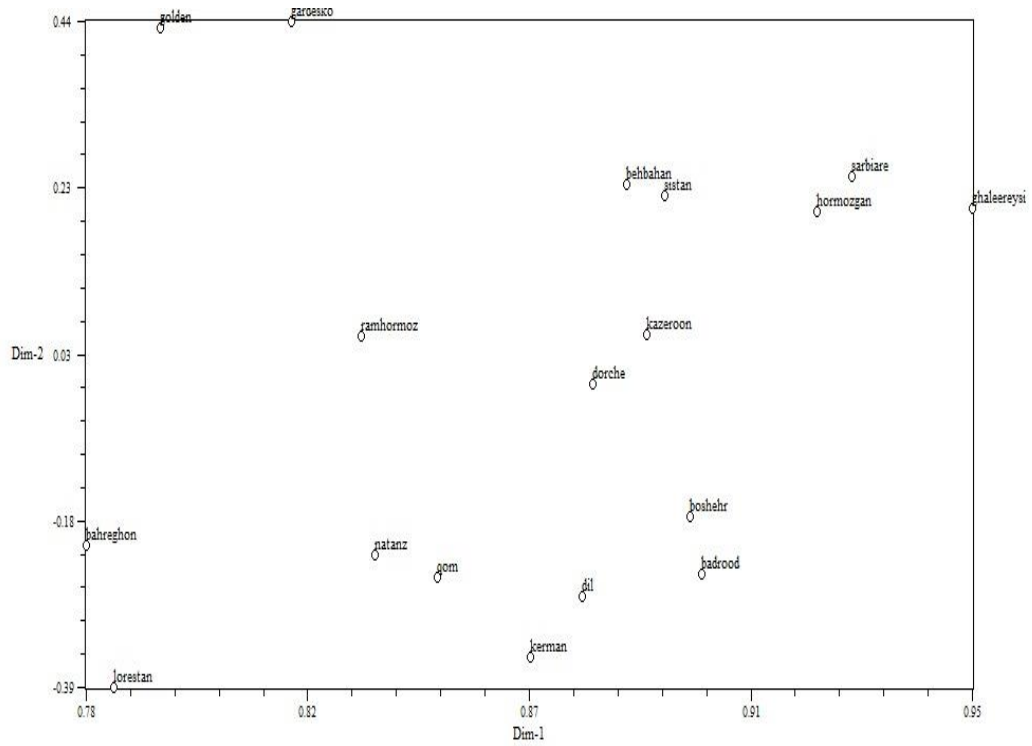
Table 4: Genetic diversity indices obtained from assessed onion genotypes by using SSR marker

آغازگر Primer	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphism information content	تعداد آلل‌های مشاهده شده Observed alleles	تعداد آلل‌های موثر Effective alleles	شاخص شانون Shannon`s index
AMS06	0.00	0.00	0.00	1	1	0.00
AMS10	0.50	0.51	0.08	2	1.97	0.68
AMS12	0.88	0.51	0.79	2	1.98	0.69
AMS13	0.62	0.44	0.35	2	1.75	0.62
AMS14	0.31	0.49	0.16	2	1.93	0.67
AMS16	0.88	0.51	0.79	2	1.97	0.69
AMS23	0.27	0.46	0.39	2	1.8	0.64
AMS26	1.00	0.52	1	2	2	0.69
AMS29	0.18	0.34	0.13	2	1.48	0.51
AMS30	0.35	0.29	0.11	2	1.41	0.47
میانگین Mean	0.49	0.41	0.38	1.9	1.73	0.56



شکل۲: گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پیاز براساس نشانگر SSR به روش UPGMA

Fig. 2: Clustering the studied genotypes based on SSR markers using UPGMA method



شکل ۳: نمودار دو بعدی ۱۸ ژنوتیپ پیاز براساس داده‌های نشانگرهای SSR

Fig. 3: Two dimensional graph of 18 onion genotypes based on SSR markers data

جدول ۴: ضرایب تأثیر B در تجزیه لجستیک دوتایی بین برخی صفات پیاز و آلل‌های SSR در شرایط بهاره‌سازی ۴۵ روز

Table 4: Effect coefficients B in binary logistic analysis between some onion traits and SSR alleles in 45 and 70 day vernalization conditions

پرایمر Primer / صفات Traits	ALL1-P2	ALL2-P2	ALL2-P3	ALL1-P4	ALL1-P5	ALL2-P5	ALL2-P6	ALL1-P7	ALL2-P7	ALL1-P9	ALL2-P9	ALL1-P10
ارتفاع بوته Plant height	-0.097	-9.7	-1.61	0.163	0.176	-32.05	-0.64	0.057	-0.023	3.8	-3.5	-3.08
قطر سوخ Bulb diameter	0.102	12.01	-1.46	-0.45	1.77	-6.48	-1.55	-0.078	0.07	0.97	-1.4	26.7
وزن سوخ Bulb weight	1.62	-46.2	48.86	4.36	13.8	-21.3	75.2	-1.9	4.6	-54.4	21.9	-105.5
طول سوخ Bulb length	0.062	-26.5	0.54	0.37	-8.11	19.2	-2.24	0.34	-0.497	14.6	-3.5	2.2
حجم سوخ Bulb volume	-3.62	246.3	-45.67	0.47	160.12	10.3	13.3	-4.4	5.6	-142.02	22.5	-276.8
پروتئین کل Total soluble protein	-0.3	-165.5	6.98	-3.32	-172.9	178.9	9.9	-1.14	0.284	45.2	-4.7	131.1
مواد جامد محلول کل Total soluble solids	-0.39	-209.1	-3.7	-2.18	82.97	172.9	14.6	-2.2	1.5	-100.4	130.4	-605.2
گل‌دهی Flowering	1.84	313.7-	43.3	-8.13	432.28	224.9	64.03	-1.2	4.5	69.3	83.4	-42.9

نتایج و بحث

از ۱۲ آغازگر ریزماهواره مورد استفاده، ۱۰ جفت آغازگر قادر به انجام تکثیر مناسب مکان‌های ریزماهواره‌ای و تولید باند مناسب در توده‌ها و ارقام خارجی مورد بررسی بودند (شکل ۱). آغازگرهای AMS04 و AMS08 تکثیر مناسبی نداشتند. در این بررسی به غیر از جفت آغازگر AMS06 بقیه آغازگرها دارای چندشکلی بودند. این ۱۰ جفت آغازگر در مجموع ۱۹ آلل مختلف با متوسط ۱/۹ آلل در هر مکان ژنی تولید کردند (جدول ۲). کریمی نافچی و همکاران (۱۳۹۰) نیز ۴۳ آلل را در ۱۳ جایگاه SSR در ۲۰ توده پیاز گزارش کردند. علت تفاوت در تعداد آلل بین پژوهش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تعداد متفاوت ژنوتیپ‌ها و تفاوت در پایه ژنتیکی آن‌ها باشد. تعداد آلل‌های مؤثر

از ۲ آلل در مکان ژنی AMS26 تا ۱ در مکان ژنی AMS06 متغیر و با متوسط ۱/۷۳ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به‌ترتیب ۰/۴۱ و ۰/۴۹ برآورد گردید. هتروزیگوسیتی برای یک جایگاه ژنی، فراوانی افراد هتروزیگوس برای آن جایگاه نسبت به کل افراد جمعیت را نشان می‌دهد *فالکونر* (Falconer, 1989). بیش‌ترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۱/۰۰) در مکان ژنی AMS26 و کم‌ترین میزان آن در مکان ژنی AMS06 با مقدار صفر بود. وجود هتروزیگوسیتی در بیشتر نشانگرها ناشی از نحوه تولید مثل گیاه است. با توجه به این‌که پیاز گیاهی دگرگشن است، بنابراین انتظار می‌رود هتروزیگوسیتی در این گیاه بالا باشد. کریمی‌نافچی و همکاران (۱۳۹۰) نیز بیان کردند که نسبت بالای هتروزیگوسیتی در پیاز را با طبیعت دگرگشن، شرایط کشت، وجود حشرات گرده‌افشان و حتی وقوع طبیعی نرعقیمی سیتوپلاسمی (گرچه فراوانی کمی دارد) قابل توجیه است. تنوع ژنی یا هتروزیگوسیتی مورد انتظار که احتمال متفاوت بودن دو آلل تصادفی از دو فرد را نشان می‌دهد، در محدوده بیش‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۵۲) و کم‌ترین میزان آن صفر، به‌ترتیب در مکان‌های ژنی AMS26 و AMS06 برآورد شد (جدول ۲). محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) در مجموع نشانگرهای مورد استفاده از ۱/۰۰ تا صفر با میانگین ۰/۳۸ متغیر بود که دلالت بر ظرفیت نسبتاً بالای برخی نشانگرها در تفکیک و تمایز توده‌ها دارد. میزان اطلاعات چندشکلی در مطالعه کریمی نافچی (۱۳۹۰) ۰/۵۲ گزارش شده است. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از صفات مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد و مقدار آن می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد که با استفاده از فراوانی آلل‌ها در هر مکان ژنی، قدرت تفکیک آن را مشخص می‌کند *اندرسون* (Anderson, 1993). مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر می‌باشد *ریبرو-کاروالو* (Robeiro-Carvalho *et al.*, 2004). همان‌طوری‌که ملاحظه می‌شود نشانگرهایی که دارای چندشکلی بالایی بودند، تنوع ژنی بالایی نیز داشتند که این موضوع نشان دهنده همبستگی بین PIC و تنوع ژنی است. شاخص شانون بیانگر میزان تنوع در هر آغازگر می‌باشد. میانگین شاخص شانون در این مطالعه ۰/۵۶ بود. به استثنای مکان‌های ژنی AMS06 و AMS30 که به‌ترتیب با صفر و ۰/۴۷ میزان تنوع پایینی را نشان دادند، تمام مکان‌های ژنی تنوع نسبتاً خوبی نشان دادند که بیش‌ترین میزان تنوع مربوط به مکان ژنی AMS26 معادل ۰/۶۹ بود (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۳) نشان داد که تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌ها و ارقام خارجی پیاز معنی‌دار نیست.هم‌چنین ۱۲٪ از تنوع کل مربوط به تنوع بین توده‌ها و ارقام خارجی بود و ۸۸٪ آن به تنوع درون آن‌ها مربوط شد. کریمی نافچی و همکاران (۱۳۹۰) نیز مطالعه مشابهی روی ۱۸ توده بومی پیاز ایرانی و دو رقم خارجی با استفاده از نشانگر SSR انجام دادند، نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌ها معنی‌دار است. هم‌چنین ۴۲ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین توده‌ها و ارقام خارجی است و ۵۸ درصد آن به تنوع درون توده‌ها مربوط می‌باشد که نشان از تمایز جمعیتی بالای توده‌های بومی پیاز ایران است. موسوی‌زاده (۱۳۸۵) با بررسی ۲۰ توده بومی و دو رقم دورگ با استفاده از نشانگر RAPD، تجزیه واریانس مولکولی تنوع معنی‌داری را در بین و درون توده‌های پیاز نشان داد. آن‌ها بیان کردند که علت این تمایز جمعیتی بیشتر در توده‌های بومی پیاز ایران را می‌توان عمدتاً به گرده-افشانی آن‌ها توسط حشراتی که فواصل مهاجرتی کوتاهی دارند نسبت داد.

نتایج تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های پیاز را به ۶ گروه ژنوتیپی منتسب کرد (شکل ۲). توده‌های رامهرمز، سربیاره، بهبهان که در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند، همراه با کازرون در گروه اول قرار دارند. توده رامهرمز و بهبهان در یک منطقه اقلیمی مشابه کشت و کار می‌شوند و قرار گرفتن آن‌ها در کنار هم مورد انتظار بود، اما توده سربیاره متعلق به منطقه یاسوج بوده و در اقلیمی متفاوت کشت می‌شود. گروه دوم به دو زیر گروه فرعی تقسیم شد. زیر گروه اول، توده‌های ایرانی، شامل توده‌های قلعه‌رئیسی، هرمزگان، سیستان و درچه و زیر گروه دوم ارقام خارجی گلدن و گاردسکو است. قرار گرفتن توده‌های ایرانی در گروه دوم در کنار ارقام خارجی شباهت این توده‌ها را به این ارقام نشان می‌دهد و نتایج *دنیکوئین* و همکاران (1997) مبنی به مهاجرت پیاز از آسیا به آفریقا و اروپا را تائید می‌کند و با نتایج احمدی‌مشگنانی و همکاران (۱۳۹۴) نیز مطابقت دارد. در گروه سوم توده‌های دیل و بادرود و همین‌طور توده‌های بوشهر و قم در دو زیر گروه قرار دارند. گروه چهارم، توده‌های لرستان و کرمان را شامل می‌شود. توده نطنز و بهرغان هر یک در یک گروه مستقل از سایرین قرار گرفته‌اند. این نشان‌دهنده این است که این ژنوتیپ‌ها تشابه ژنتیکی کمتری با بقیه دارند. تجزیه خوشه‌ای در دو مورد می‌تواند به به‌نژادگر کمک نماید: یکی پیدا کردن گروه‌های واقعی افراد براساس تشابه ژنتیکی بین آن‌ها و دیگر کاهش داده‌ها و انتخاب افراد محدودی از هر گروه یا دسته. قرار گرفتن توده‌های ایرانی در گروه‌های متفاوت نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی موجود در بین توده‌های ایرانی است. همان‌طورکه انتظار می‌رفت دو رقم خارجی در کنار هم قرار گرفتند. هرچند نتایج این گروه‌بندی نتوانست

به‌خوبی ارتباط بین تنوع مولکولی و صفات مرتبط با بولتینگ را نشان دهد؛ به‌طوری‌که ارقام و توده‌هایی که بولتینگ در آن‌ها رخ نداده و مقاوم به بولتینگ بودند (گلدن، گاردسکو و قلعه‌رئیسی)، در کنار توده‌هایی که درصد بالایی از گل‌دهی را داشتند (لرستان، درچه و سیستان) در گروه دوم در کنار هم قرار گرفتند اما تا اندازه‌ای توانست قرابت ژنتیکی ارقام خارجی مقاوم با یکی از توده‌های ایرانی مقاوم به بولتینگ را نشان دهد. تجزیه خوشه‌ای براساس نتایج مولکولی نتوانست ژنوتیپ‌های یک منطقه را در یک گروه قرار دهد. کریمی نافچی (۱۳۹۰) با انجام تجزیه کلاستر نیز ۲۰ نمونه پیاز را در ۶ گروه و یک ژنوتیپ مستقل گروه‌بندی کرد. بر این اساس نشان داد که توده‌های مربوط به شمال و شمال غرب کشور تا حدودی در کنار هم قرار گرفته‌اند. ولی در سایر توده‌های مورد بررسی آن‌ها نیز تنوع ژنتیکی از پراکنش جغرافیایی پیروی نمی‌کرد. هرچند گزارشات ضد و نقیضی در رابطه با ارتباط بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی وجود دارد. چن و همکاران (Chen *et al.*, 2012) بیان کردند عدم مطابقت الگوی گروه‌بندی با منشاء جغرافیایی در تجزیه کلاستر، می‌تواند دو دلیل داشته باشد، یکی اینکه تعداد نشانگرهای استفاده شده کافی نبوده و تمامی ژنوم را پوشش نداده‌اند و دیگری وجود یکسری مضاعف‌شدگی‌ها در ژرم‌پلاسم پس از ذخیره طولانی مدت و استفاده مجدد باعث بروز یکسری اشتباهات و در نتیجه تفکیک این ژنوتیپ‌های یکسان از یکدیگر جدا می‌شوند. همچنین از آنجا که تنوع موجود در ارقام بومی تحت گزینش طبیعی (گزینش تحت تأثیر شرایط محیطی)، گزینش مصنوعی (گزینش توسط کشاورز) و جهش قرار می‌گیرد، در نتیجه تفکیک ایجاد شده با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به‌طور کامل با منشاء جغرافیایی ارقام مطابقت ندارد. *عبداللهی- سیسی* (Abdollahi-Sisi, 2012) و شوروزدی و همکاران (۱۳۹۲) نیز عدم قرار گرفتن ژنوتیپ‌های بومی با منشاء جغرافیایی را در کنار هم به پراکنش جغرافیایی وسیع آن‌ها و هم‌چنین تأثیر نیروهای تکاملی متفاوت بر ساختار ژنتیکی آن‌ها اظهار داشتند.

تجریه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که مؤلفه اول و دوم به‌ترتیب ۷۵/۱۳ و ۵/۷۹ از تغییرات نمونه‌ها را در بر می‌گیرند. این دو مؤلفه در مجموع ۸۰/۹۲ از واریانس کل را توجیه می‌کند (جدول ۳). در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، بهتر است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در سطح ژنوم داشته باشند. بنابراین اگر نشانگر از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها لازم است *پیرسیدی* و همکاران (Pirseyedi *et al.*, 2006). آرایش تجمعی ژنوتیپ‌های پیاز با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر نشانگر به وسیله این دو مؤلفه، در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. توزیع ژنوتیپ‌ها در این نمودار تا حدود زیادی مطابق با توزیع توده‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل در این مطالعه می‌باشد. در نگاه کلی پراکنش ژنوتیپ‌ها حاکی از وجود تنوع بالا در بین توده‌های مورد بررسی است و همان‌طورکه انتظار می‌رفت دو رقم خارجی در کنار هم و در جایی دورتر از سایر توده‌ها قرار گرفتند.

تجزیه لجستیک داده‌های مولکولی نیز نشان داد صفات اندازه‌گیری شده به‌دلیل داشتن خطای معیار بالا تأثیر معنی‌داری بر آلل‌ها نداشتند. جدول ۴ ضریب تأثیر B حاصل از رگرسیون لجستیک را برای برخی صفات اندازه‌گیری شده در شرایط بهاره‌سازی ۴۵ روز نشان می‌دهد. طبق جدول ۴ مکان‌های ریزماهواره‌ای ALL2-P2 با صفات حجم سوخ، پروتئین کل محلول، قند محلول کل و گل‌دهی ارتباط داشتند. آلل‌های ALL2-P9 و ALL1-P9 با صفات حجم سوخ و قند محلول برگ مرتبط‌اند. این ارتباط برای آلل ALL1-P10 با صفات حجم سوخ، پروتئین کل محلول و قند محلول کل معنی‌دار بود. این نتایج نشان‌می‌دهد در بهاره‌سازی ۴۵ روز گل‌دهی احتمالا با آلل‌های ALL1-P2، ALL1-P5 و ALL2-P5 مرتبط است و این احتمال با ضریب تأثیر ۴۳۲/۲۸ برای آلل ALL1-P5 بیشتر از سایرین است. هم‌چنین صفت قند محلول با آلل‌های ALL2-P2، ALL2-P5، ALL1-P9، ALL2-P9 و ALL1-P10 ارتباط دارد. بررسی رابطه بین صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک پیاز با بولتینگ نشان داده است که بین صفات میزان قند کل، پروتئین محلول کل و وزن خشک سوخ همبستگی بالایی وجود دارند (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، لذا از ارتباط این صفات با آلل‌های مذکور می‌توان در شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به بولتینگ در مراحل اولیه رشد بهره برد. کریمی نافچی و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند صفات مورفولوژیک نتیجه بروز ژن‌هاست که بخش محدودی از ژنوم را پوشانده است، درصورتی‌که مطالعات مولکولی همه قسمت‌های ژنوم (شامل فواصل بین ژنی و اینترون‌ها) را مورد بررسی قرار می‌دهد. لذا اختلاف حاصل از نتایج مولکولی و مورفولوژیک دور از انتظار نیست. پژوهش حاضر نخستین گزارش از بررسی ژنوتیپ های پیاز ایرانی از لحاظ مقاومت به بولتینگ با استفاده از صفات نشانگرهای ریزماهواره است که امید است تحقیقات بعدی در جهت تکمیل آن انجام گردد.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۲۰-۲۱ متن انگلیسی مراجعه شود.