بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌هایی از جنس *Allium* L. بر اساس نشانگر ISSR در استان کردستان

شهلا حسینی[1,*]، محمدرضا رهگذر[2] و هدیه بدخشان[3]

۱- استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲)

چکیده

جنس *Allium* L.، به‌ویژه زیر جنس *Melanocrommyum* شامل بخش‌هایی است که از لحاظ تاکسونومیکی بسیار پیچیده هستند. موقعیت سیستماتیکی گونه‌های هرکدام از بخش‌ها، در طول زمان به‌دفعات بازبینی‌شده است. در مطالعه‌ی حاضر تنوع ژنتیکی بین ۳۲ اکوتیپ متعلق به ۱۰ گونه مختلف از جنس *Allium* و ارتباط آن‌ها با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نه آغازگر مورد استفاده، ۱۶۶ نوار چندشکل را با میانگین ۱۸ نوار به ازای هر آغازگر تولید کردند. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر ISSR873، با ۲۷ نوار، بیشترین و آغازگرISSR4 با ۲ نوار کمترین تعداد نوار چندشکل را ایجاد نمودند. شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) نشانگرها بین ۰/۰۴ تا ۰/۴۳ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی، اکوتیپ‌های موردمطالعه را در چهار گروه قرار داد. نتیجه تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که بیشتر گونه‌هایی که از لحاظ مورفولوژیکی به هم شبیه هستند در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند. بر اساس ضریب تشابه دایس، بیشترین درصد تشابه در بین اکوتیپ‌های *Allium stipitatum* و *Allium saralicum* (۷۲ درصد) از زیر جنس *Melanocrommyum* و کمترین شباهت در بین اکوتیپ‌های گونه‌های *Allium tripedale* و *Allium iranicum* (۱۲ درصد) به‌دست آمد. اکوتیپ‌های با کمترین درصد تشابه به زیرجنس‌های *Allium* و *Nectaroscordum* تعلق دارند که در خوشه‌های مجزا قرار گرفتند. بر اساس نتایج، اکوتیپ‌های بخش‌های *Pseudoprason*، *Melanocrommyum* و *Proceallium* بیشترین قرابت را نشان دادند. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای ISSR برای طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Allium* مفید بوده و پتانسیل کافی برای بررسی‌های فیلوژنتیک گونه‌ها را دارا هستند. به‌علاوه با توجه به نتایج مبنی‌بر وجود تنوع ژنتیکی قابل‌توجه در بین اکوتیپ‌های مطالعه شده از گونه‌های وحشی جنس *Allium*، از این تنوع می‌توان در آینده در فرآیندهای به‌نژادی گونه‌های زراعی بهره جست.

واژگان کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، *Melanocrommyum*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **sh.hosseini@uok.ac.ir**

مقدمه

جنس *Allium* L. به خانواده Amaryllidaceae (نرگسیان)، زیرخانواده Allioideae Herb. و قبیله Allieae تعلق داشته و بالغبر ۹۰۰ گونه از آن در دنیا شناخته شده است. گیاهان این خانواده در ۱۵ زیر جنس و ۵۷ بخش طبقه‌بندی شده‌اند. گونه‌های این جنس عمدتاً در اوراسیا و آمریکای شمالی، از غرب مدیترانه تا شرق آسیا با مرکز اصلی تنوع در جنوب غربی و آسیای مرکزی پراکنش دارند. این جنس شامل بسیاری از گیاهان دارویی و زینتی و همچنین سبزیجات خوراکی است (Fritsch and Abbasi, 2013). تعداد گونه‌های *Allium* در ایران ۱۳۵ گونه گزارش شده است (Fritsch and Maroofi, 2010). پس از آن چندین گونه و زیرگونه جدید از *Allium* توصیف و برای کشور ایران ثبت شده است (Razyfard *et al*., 2011; Memariani *et al*., 2012; Fritsch and Amini Rad, 2013; Fritsch and Abbasi, 2013). گونه‌های جنس *Allium* در زیر جنس *Melanocrommuym* (Webb and Berthel)، از ۱۷۰ گونه و زیرگونه تشکیل شده‌اند و شامل تنوع بالایی به‌ویژه در ایران و ترکیه هستند. با وجود تنوع بالای گونه‌های این زیر جنس تصور بر این است که گونه‌های آن تک نیا باشند (Friesen et al., 2006; Gurushidze *et al*., 2008, 2010). مطالعات فیلوژنتیک متعددی روی گونه‌های این زیر جنس با استفاده از نشانگرهای مختلف انجام شده است (Fritsch and Gurushidze 2009; Li *et al*., 2010; Gurushidze *et al*., 2008, 2010). در بیشتر این مطالعات گونه‌های زیرجنس *Melanocrommyum* پلی‌فایلتیک یا پارافایلتیک تشخیص داده شده است. این نتایج مغایر با رده‌بندی بر پایه صفات مورفولوژیکی است. بنابراین ارزیابی مجدد رده‌بندی گونه‌ها در سطح بخش به‌عنوان نیاز مبرم پیشنهاد شده است (Gurushidze *et al*., 2008, 2010). محدوده و محتوای بخش‌های مختلف جنس *Allium* به‌خصوص زیر جنس *Melanocrommyum* به‌طور مکرر تغییر کرده است و این نشان از تنوع بالای مورفولوژیک و تعداد نسبتاً زیاد گونه‌های این جنس است که با وجود ارزیابی صفات متنوع ریخت‌شناختی (Razyfard *et al*., 2011; Fritsch and Abbasi, 2009, 2013; Memariani *et al*., 2012; Fritsch 2012)، مولکولی (Friesen *et al*., 2006; Gurushidze, 2009; Fritsch *et al*., 2010)، کروموزومی (Fritsch and Abbasi, 2013; Hosseini and Go, 2010; Hosseini, 2018) و غیره همچنان ارتباط درون‌گونه‌ای به‌خوبی و دقیق مستند نشده است. در بین تنوع وسیع نشانگرهای مولکولی، نشانگر توالی تکراری ساده (ISSR) که نخستین بار توسط زیتکیویچ و همکاران (Zietkiewicz *et al*., 1994) معرفی شد، برای تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی گیاهان استفاده شده است. در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی آلیوم‌های ایران با استفاده از نشانگر ISSR انجام شده است. در مطالعه اخوان و همکاران (Akhavan *et al*., 2015) تنوع ژنتیکی گونه‌هایی از بخش‌های مختلف زیر جنس *Melanocrommyum* مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه کار آن‌ها نشان داد که آنالیز داده‌های ISSR برای تشخیص ارتباطات نزدیک درون‌گونه‌ای مناسب است. هرچند گروه‌بندی‌های به‌دست آمده تنها تا حدودی مطالعات گذشته بر پایه داده‌های مولکولی را تأیید کرده است. سودها و همکاران (Sudha *et al*., 2019) نیز در مطالعه‌ای برای تشخیص تنوع ژنتیکی درون کولتیوارهای پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) از توالی‌های تکراری ساده و توالی‌های تکثیر شده تصادفی (RAPD) استفاده کردند. در مطالعه اخیر بینشی جدید برای تغییر استراتژی‌های اصلاحی در ارقام پیاز با ارزیابی داده‌های مولکولی به‌دست آمد. در مطالعه سمیعی و همکاران (Samiei *et al*., 2015) نیز ISSR به‌عنوان یک نشانگر مؤثر در آنالیز تنوع ژنتیکی و ارتباطات درون‌گونه‌ای *Allium* تشخیص داده شده است. رضایی و همکاران (Rezaee *et al*., 2018) نیز نشان دادند که نشانگرهای مولکولی ISSR برای نمایش تنوع در جنس *Allium* مفید بوده و می‌توانند برای بهبود دقت طبقه‌بندی استفاده شوند.

نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی درون و بین گونه‌ها هستند و در بین آن‌ها نشانگرهای توالی تکراری ساده، یک روش مبتنی‌بر PCR است که شامل تکثیر بخش‌هایی از DNA است که در یک فاصله قابل تکثیر بین دو ناحیه تکراری ریزماهواره یکسان در دو سوی مختلف قرار دارند. نشانگر ISSR با موفقیت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گروه‌های مختلف گیاهی استفاده شده است (Eghlima *et al*., 2021; Navabpour *et al*., 2021). مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط

بین‌گونه‌ای برخی از گونه‌های *Allium* که از مناطق مختلف استان کردستان جمع‌آوری شده است و ارزیابی پتانسیل نشانگر ISSR در تشخیص تنوع ژنتیکی بین آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: تعداد ۳۲ اکوتیپ از ۱۰ گونه مختلف جنس *Allium* که هشت گونه از آن‌ها متعلق به زیر جنس *Melanocrommyum* و دو گونه دیگر (*A. iranicum* و *A. tripedale*) به‌ترتیب متعلق به زیر جنس‌های *Allium* و *Nectaroscordum* هستند، از مناطق مختلف استان کردستان جمع‌آوری شدند. اطلاعات نمونه‌های موردمطالعه در جدول ۱ آمده است. تعداد اکوتیپ‌های هر گونه بر اساس میزان پراکنش جغرافیایی آن‌ها در حداقل دو و حداکثر هفت اکوتیپ جمع‌آوری شدند.

ارزیابی ژنتیکی ISSR: DNA ژنومی از برگ‌هایی که در فریزر ۲۰- قرار داده شده بود با استفاده از کیت استخراج DNA (Sinnaclon plant extraction kit) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸درصد تعیین شد (شکل ۱). سپس DNAی استخراج شده تا غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر رقیق و در PCR مورد استفاده قرار گرفت.

تعداد ۹ آغازگر برای تشخیص ناحیه ISSR بر اساس آغازگرهای پیشنهادی در مقاله اخوان و همکاران (Akhavan *et al.*, 2015) انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول ۲ آمده است. تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر PCR master mix (amaR 2X PCR Mix) یک میکرولیتر آغازگر (با غلظت ٤ میکرومول) و یک میکرولیتر DNA ژنومی (با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) همراه با هشت میکرولیتر آب مقطر انجام شد. برنامه تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Biorad-C1000™ Thermal Cycler) به شرح زیر بود: واسرشته‌سازی اولیه، به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۷ چرخه، شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بین ۵۹ – ٤٦ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) به‌مدت یک دقیقه، مرحله بسط به‌مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

پس از اتمام مراحل PCR به‌منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. محصولات PCR با ولتاژ ثابت (۷۰ ولت) در بافر TBE 1x به‌مدت تقریبی ۹۰ تا ۱۲۰ دقیقه جدا شدند. ژل‌ها با Gelstain-Green™ رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۲) و اندازه قطعات تولید شده در مقایسه با نشانگر با نوارهای استاندارد ۵۰ bp تعیین شد. به‌منظور عکس‌برداری از ژل‌ها از دستگاه ژل‌داک زیر نور UV استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های ژنتیکی: در نرم‌افزار Excel ماتریس داده‌ها از طریق نوارهای حاصل از تکثیر به‌صورت صفر و ۱ امتیازدهی شدند. از این فایل به‌عنوان فایل ورودی استفاده گردید. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهایGenAlex نسخه ٦/٥١ (Peakall and Smouse, 2006, 2012) و NTSYS نسخه ۲/۰۲ (Rohlf, 2000) انجام شد. شاخص‌هایی مانند تنوع ژنتیکی (هتروزیگوتی مورد انتظار) ($He = 2pq$)، شاخص اطلاعات چندشکلی ($PIC= He - 2p^2q^2$)، (p و q به‌ترتیب وجود و عدم وجود نوار را نشان می‌دهند) (Gorji *et al.*, 2011)، شاخص RP (قدرت تفکیک آغازگر، $Rp = \Sigma I_b$) نیز که بیانگر احتمال شناسایی اکوتیپ‌ها توسط یک نشانگر می‌باشد از مجموع شاخص اطلاع‌دهندگی باندها (I_b)،$I_b= 1- (2\times| 0.5- P_i|)$ به‌دست آمد که در آن P_i فراوانی iامین آلل در یک جایگاه معین می‌باشد. همچنین شاخص شانون نیز، $I= -\Sigma_i P_i \mathrm{Ln}(P_i)$ (Shannon, 1948) محاسبه گردید.

برای محاسبه و تشکیل ماتریس تشابه از رویه SimQual و ضرایب تشابه (Dice، جاکارد و تطابق ساده) استفاده شد و از آن برای رسم دندروگرام و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) استفاده گردید. مقایسه ماتریس تشابه و ماتریس کوفنتیک حاصل از خوشه‌بندی با استفاده از آزمون مانتل انجام شد. داده‌های ISSR با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc نسخه 2.02 تجزیه و تحلیل شد و رسم دندروگرام بر اساس روش گروه‌های غیروزنی جفت‌شده (UPGMA) با همین نرم‌افزار انجام شد. برای محاسبه درصد واریانس بین و درون اکوتیپ‌های حاصل از دندروگرام، از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) استفاده شد که با نرم‌افزار GenAlEx نسخه 6.51 محاسبه گردید.

جدول ۱- اطلاعات هرباریومی و مناطق جمع‌آوری اکوتیپ‌های مختلف نمونه‌های موردمطالعه از جنس *Allium*

Table 1. Information on herbarium and collection areas of different ecotypes of *Allium* specimens studied

شماره No.	بخش Sect.	گونه Species	محل جمع‌آوری، جمع‌آوری کننده Locality, collectors	شماره هرباریومی Herb. voucher number	فرد آنالیز شده Individuals analyzed
1	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Procerallium*	*A. stipitatum*	Kurdistan, Saral Area, Kapak Village, Sh. hosseini	UOK-510	Asti1
2	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Procerallium*	*A. stipitatum*	Kurdistan, Saral Area, doozakhdare Village, Sh. hosseini	UOK-511	Asti2
3	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Procerallium*	*A. stipitatum*	Kurdistan, Saral Area, zardavan, Sh. hosseini	UOK-512	Asti3
4	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Procerallium*	*A. stipitatum*	Kurdistan, Saral Area, hezarkanian Village, Sh. hosseini	UOK-513	Asti4
5	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Melanocrommyum*	*A. shatakiense*	Kurdistan, Saral Area, Chatan Village, Sh. hosseini	UOK-521	Ashatak1
6	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Melanocrommyum*	*A. shatakiense*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan, Sh. hosseini	UOK-522	Ashatak2
7	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	Kurdistan, Saral Area, golcheiar Village, Sh. hosseini	UOK-501	Ahosh1
8	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	East Azerbaijan, Bookan road, , Sh. hosseini	UOK-502	Ahosh2
9	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	Kurdistan, Marivan road, kalatarzan, Ali abad Village, Sh. hosseini	UOK-503	Ahosh3
10	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	Kurdistan, Marivan road, kalatarzan, sooraban, Sh. hosseini	UOK-504	Ahosh4
11	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	Kurdistan, Saral Area, Kapak Village, Sh. hosseini	UOK-505	Ahosh5
12	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan, Sh. hosseini	UOK-506	Ahosh6
13	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Pseudoprason*	*A. hooshidaryae*	Kurdistan, Marivan road, Kosalan Area, Sh. hosseini	UOK-507	Ahosh7
14	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Melanocrommyum*	*A. saralicum*	Kurdistan, Saral Area, zardavan, Sh. hosseini	UOK-512	Asara1
15	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Melanocrommyum*	*A. saralicum*	Kurdistan, Saral Area, Chatan Village, Sh. hosseini	UOK-513	Asara2
16	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Melanocrommyum*	*A. saralicum*	Kurdistan, Saral Area, janvare Village, Sh. hosseini	UOK-514	Asara3
17	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Melanocrommyum*	*A. saralicum*	Kurdistan, Saral Area, hezarkanian Village, Sh. hosseini	UOK-515	Asara4
18	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. haemanthoides*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan, Sh. hosseini	UOK-531	Ahaem1
19	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. haemanthoides*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan, Sh. hosseini	UOK-533	Ahaem2
20	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. ubipetrense*	Kurdistan, Marivan road, kalatarzan, jannat boo village, Sh. hosseini	UOK-516	Aubip1
21	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. ubipetrense*	Kurdistan, Marivan road, kalatarzan, jannat boo village, Sh. hosseini	UOK-517	Aubip2
22	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Procerallium*	*A. jesdianum*	Kurdistan, Marivan road, Kosalan Area, Sh. hosseini	UOK-537	Ajesdi1
23	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Procerallium*	*A. jesdianum*	Kurdistan, Marivan road, Kosalan Area, Sh. hosseini	UOK-538	Ajesdi2
24	Subg. *Allium* Sect. *Allium*	*A. iranicum*	Kurdistan, Saral Area, Chatan Village, Sh. hosseini	UOK-525	Ai1
25	Subg. *Allium* Sect. *Allium*	*A. iranicum*	Kurdistan, Saral Area, Chatan Village, Sh. hosseini	UOK-526	Ai2
26	Subg. *Nectaroscordum* Sect. *Nectaroscordum*	*A. tripedale*	Kurdistan, Marivan road, Kosalan Area, Sh. hosseini	UOK-541	Atripe1
27	Subg. *Nectaroscordum* Sect. *Nectaroscordum*	*A. tripedale*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan area, Sh. hosseini	UOK-542	Atripe2
28	Subg. *Nectaroscordum* Sect. Nectaroscordum	*A. tripedale*	Kurdistan, Saral Area, doozakhdare Village, Sh. hosseini	UOK-543	Atripe3
29	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. kurdestanicum*	Kurdistan, kamiaran road, rural district javaro, tavrivar village, Sh. hosseini	UOK-545	A. sp1
30	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. kurdestanicum*	Kurdistan, Marivan road, kalatarzan, jannat boo village, Sh. hosseini	UOK-546	A. sp2
31	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. kurdestanicum*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan area, Sh. hosseini	UOK-547	A. sp3
32	Subg. *Melanocrommyum* sect. *Acanthoprason*	*A. kurdestanicum*	Kurdistan, Saral Area, Zardavan area, Sh. hosseini	UOK-548	A. sp4

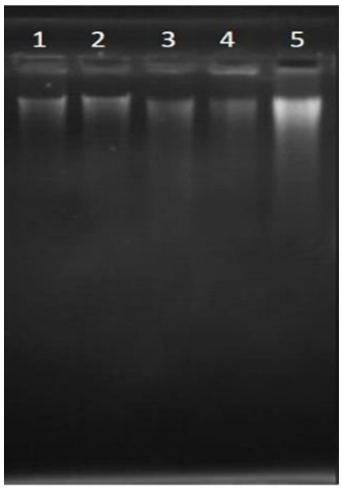
جدول ۲- اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده و شاخص‌های اندازه‌گیری شده در آنالیز داده‌های نشانگر ISSR

Table 2. Information of primers used and indicators measured in the analysis of ISSR data

نشانگر Marker	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)	BS	PB	PP%	UB	BF	I	He	RP	PIC
ISSR 1	(CAG)5	54.1	500-1700	13	100	1	0.11	0.21	0.107	10.1	0.37
ISSR 2	(AG)8G	50.1	150-1200	18100		4	0.07	0.15	0.072	15.35	0.24
ISSR 3	(AGC)6C	58.5	150-1600	19100		4	0.08	0.17	0.08	15.7	0.19
ISSR 4	(CT)8GG	52.7	800-1000	2100		1	0.03	0.09	0.03	1.85	0.04
ISSR807	(AG)8T	46.1	350-1800	23100		0	0.32	0.41	0.26	8.2	0.40
ISSR811	(GA)8C	46.1	350-1600	23100		8	0.10	0.18	0.09	18.1	0.42
UBC 808	(AG)8C	46.1	400-2000	23100		1	0.31	0.41	0.26	8.4	0.41
UBC 873	(GACA)4	52.2	200-1900	27100		1	0.36	0.43	0.28	7.45	0.40
ISSR807+UBC808	(AG)8T; (AG)8C	46.1	400-1700	18100		0	0.35	0.44	0.28	5.15	0.43

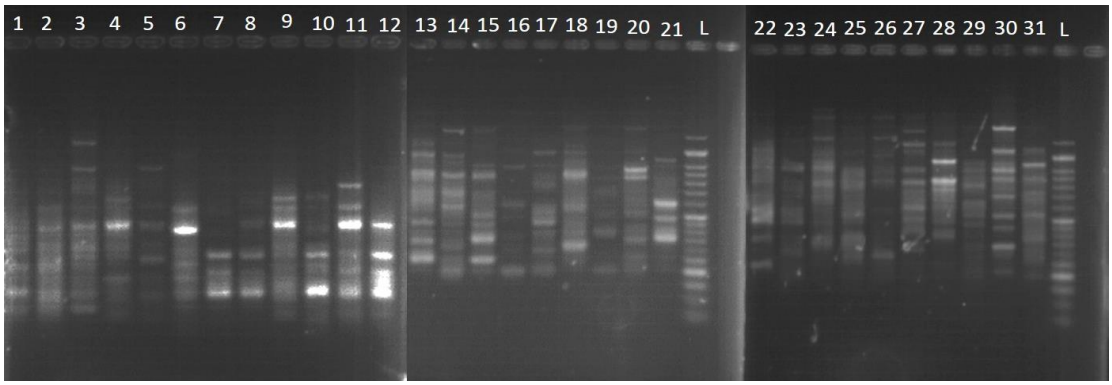
BS: اندازه نوار؛ PB: تعداد نوارهای چندشکل در هر نشانگر؛ PP%: درصد چندشکلی؛ UB: تعداد نوارهای بی‌همتا؛ BF: فراوانی نوارها؛ I: شاخص شانون؛ He: شاخص هتروزیگوت؛ Rp: تشخیص نشانگر؛ PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی

BS: band size; PB: number of polymorphic bands per marker; PP%: percentage of polymorphism; UB: number of unique bands; BF: frequency of bands; I: Shannon index; He: heterozygous index; Rp: marker detection; PIC: content Polymorphic information



شکل ۱- DNA ژنومی استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مربوط به ۵ گونه متفاوت از جنس *Allium*

Figure 1. Genomic DNA extracted on 0.8% agarose gel related to 5 different species of *Allium*



شکل ۲- بخشی از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد که تنوع گونه‌ای درون و بین گونه‌ای را با استفاده از آغازگر UBC873 نشان می‌دهد. L: DNA Ladder (۵۰bp)

Figure 2. Part of 2% agarose gel electrophoresis shows the species diversity within and between species using UBC873 primer. L: DNA Ladder (50bp)

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده بیانگر این بود که بیشتر نشانگرها از الگوی نواری مناسبی برخوردار هستند. الگوی نواری حاصل از تکثیر به‌وسیله نشانگر ISSR873 در شکل ۲ نشان داده شده است. مجموعاً ۱٦٦ نوار واضح و مشخص امتیازدهی و بررسی شدند که تمام آن‌ها چندشکل بودند و اندازه نوارهای امتیازدهی شده در دامنه بین ۱۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت‌باز متغیر بود. تعداد نوارهای امتیازدهی شده برای هر آغازگر بین ۲ تا ۲۷ نوار متغیر بود. متوسط تعداد کل نوارها ۱۸/٤ برآورد شد و نشانگرهای ISSR873 و ISSR4 به‌ترتیب دارای بیشترین (۲۷) و کمترین (۲) تعداد نوار تکثیر شده چندشکل بودند. درصد چندشکلی برای تمام آغازگرها ۱۰۰ درصد بود که می‌تواند تنوع ژنتیکی بالای بین اکوتیپ‌ها را نشان دهد (جدول ۲). در بین گونه‌های مورد مطالعه، نشانگر ISSR1 با ۱۳ نوار چندشکل داری یک نوار بی‌همتا (bp٦۵۰) و نشانگرهای ISSR2 و ISSR811 به‌ترتیب با ۱۸ و ۲۳ نوار، هر کدام دارای هشت نوار بی‌همتا بودند که به‌ترتیب کمترین و بیشترین تعداد نوار بی‌همتا را به خود اختصاص دادند. وجود نوار بی‌همتا در یک اکوتیپ نشان از تنوع و پلی‌مورفیسم اختصاصی آن دارد. در بین گونه‌ها، اکوتیپ‌های مختلف از گونه *A. hooshidaryae* بیشترین تعداد نوار بی‌همتا را داشت.

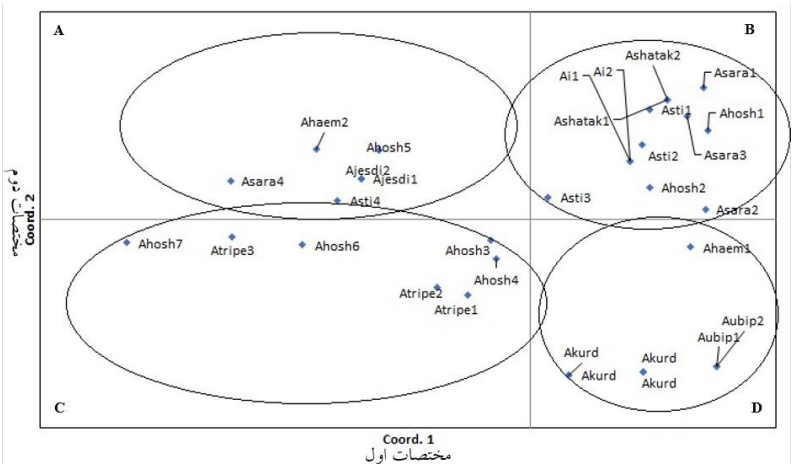
برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر نشانگر محاسبه شد. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌ها به‌شمار می‌رود (Santhosh *et al*., 2009). مقدار PIC بر اساس تعداد آلل شناسایی شده و نحوه پراکنش آن‌ها در جمعیت محاسبه می‌شود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Ren and Timko, 2001). نتایج محاسبه این شاخص نشان داد که توزیع مقادیر PIC بین ۰/۰٤ تا ۰/٤۳ متغیر بود که به‌ترتیب مربوط به نشانگرهای ISSR4 با کمترین و ISSR 807+808 با بیشترین مقدار بود.

به‌منظور تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های موردمطالعه بر اساس ماتریس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR، ابتدا آزمون مانتل برای ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده انجام شد (Mantel, 1967). بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه ضریب تشابه دایس دارای بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۸٤) بود که نشان دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی می‌باشد. بر اساس تشابه ژنتیکی اکوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR و بر اساس ضریب دایس، بیشترین درصد تشابه بین اکوتیپ‌های Asti4 و Asara 4 (۷۲ درصد) و کمترین شباهت بین اکوتیپ‌های مربوط به گونه‌های *A. trippedale* و *A. iranicum* (۱۲ درصد) برآورد شد.

نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۳) نشان داد که سه مؤلفه ابتدایی توانستند در مجموع ٦۹/۵۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. اولین مؤلفه ۱۲/۷۱، مؤلفه دوم ۲٤/۲۲ و مؤلفه سوم که بزرگ‌ترین مؤلفه به‌شمار می‌رود ۳۲/٦۲ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند.

دندروگرام حاصل از آنالیز داده‌های ISSR بر اساس موقعیت جغرافیایی و مورفولوژی نمونه‌ها به ٤ خوشه اصلی تقسیم شد. که در آن، موقعیت بیشتر گونه‌ها با تاکسونومی کلاسیک که عمدتاً بر پایه صفات مورفولوژیک بوده است (Fritsch and Abbasi, 2013) انطباق داشت. اکوتیپ‌های استثناء در این مورد شامل: Ahosh1 بود که ارتباط نزدیکی را با Asara1 نشان داد و همچنین اکوتیپ Asara4 که با Asti4 در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ٤). خوشه اول خود دارای دو زیرخوشه است که زیر خوشه‌ی نخست، اکوتیپ‌هایی از گونه‌های *A. shatakiense* و *A. saralicum* را شامل می‌شود که در زیرجنس و بخش *Melanocrommyum* قرار دارند. البته یکی از اکوتیپ‌های *A. hooshidaryae* نیز ارتباط نزدیکی را با اکوتیپ *A. saralicum* نشان داده است. در زیرخوشه دوم اکوتیپ‌های گونه *A. stipitatum*از زیرجنس *Melanocrommyum* و *A. iranicum* از زیرجنس *Allium* قرار دارند. خوشه دوم گونه‌های دو بخش *Pseudoprason* و *Acanthoprason* را در بر می‌گیرد و ارتباط نزدیک این دو بخش در این خوشه تأیید شده است. خوشه‌ی سوم مربوط به اکوتیپ‌هایی از زیرجنس و بخش *Nectaroscordum* است. آخرین خوشه ارتباط نزدیک بخش‌های *Melanocrommyum* و *Procerallium* در زیرجنس

Melanocrommyum را نشان می‌دهد. نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بسیار مطابقت داشت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این دسته‌بندی، در این مطالعه ۷۱ درصد از تغییرات ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها و ۲۹ درصد درون آن‌ها بود. این آزمون در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود.

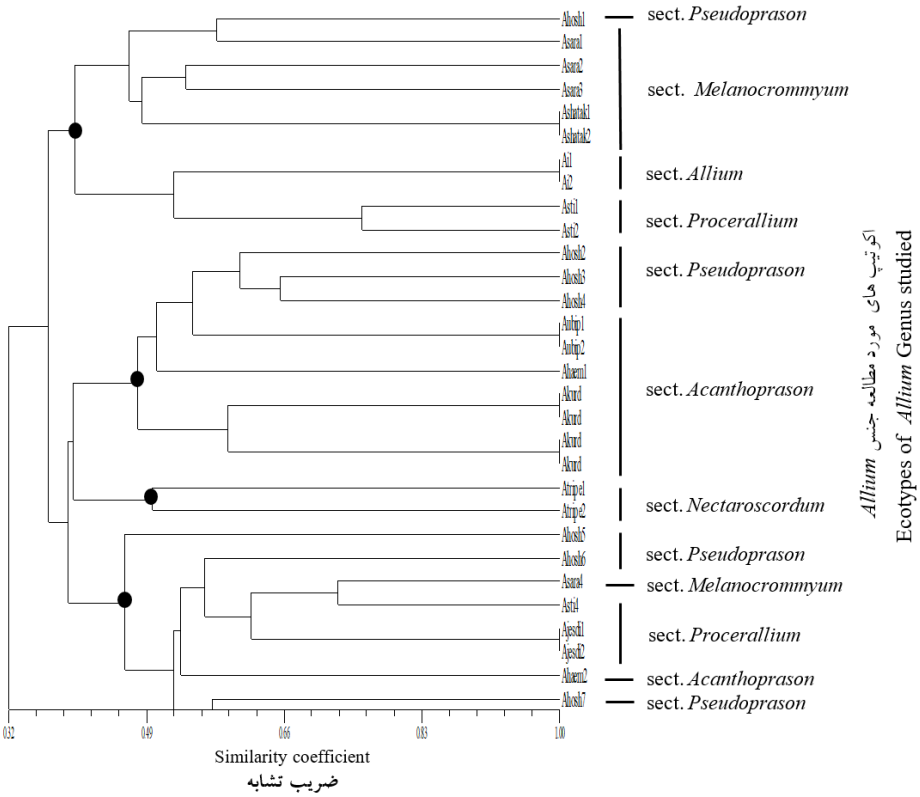


شکل ۳- تجزیه به مختصات اصلی اکوتیپ‌های جنس *Allium* بر اساس داده‌های ژنتیکی ISSR

Figure 3. Principal coordinate analysis of *Allium* ecotypes based on ISSR genetic data

A: گونه‌های بخش *Pseudoprason*، *P* و *Acanthoprason*؛ B: گونه‌های بخش *Melanocrommyum*، *Pseudoprason* و *Allium*؛ C: گونه‌های بخش *Pseudoprason* و *Nectaroscordum*؛ D: گونه‌های بخش *Acanthoprason*

A: Species of *Pseudoprason*, *Procerallium* and *Acanthoprason* sections; B: Species of *Melanocrommyum*, *Pseudoprason* and *Allium* sections; C: Species of *Pseudoprason* and *Nectaroscordum* sections; D: Species of *Acanthoprason* section



شکل ٤- خوشه‌بندی اکوتیپ‌های موردمطالعه از جنس *Allium* بر اساس روش UPGMA

Figure 4. Clustering of studied ecotypes of *Allium* based on UPGMA method

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی اکوتیپ‌های *Allium*. (P < 0.01)

Table 3. Results of molecular variance analysis (AMOVA) of ISSR data from *Allium* ecotypes. (P < 0.01)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean Square	واریانس برآورد شده Estimated variance	درصد از واریانس Percentage of variance
درون اکوتیپ‌ها Among Ecotypes	9	326.156	36.240	6.535	29%
بین اکوتیپ‌ها Within Ecotypes	22	349.000	15.864	15.864	71%
کل Total	31	675.156		22.398	100%

تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها تحت تأثیر عوامل بیولوژیکی، پراکنش، چرخه زندگی، اندازه جمعیت، جریان ژنی، نرخ جهش، فرسایش ژنتیکی و سیستم گرده‌افشانی است (Petrova *et al.*, 2017). گونه‌های جنس *Allium* گیاهانی چندساله هستند که در انواع اقلیم‌های متنوع از آن‌ها گزارش شده است. بنابراین با وسعت پراکنش نسبتاً خوب این گیاهان، بالا بودن تنوع ژنتیکی در بین آن‌ها قابل‌انتظار است.

در آنالیز داده‌های مولکولی ISSR مطالعه حاضر اکوتیپ‌های بخش‌های *Melanocrommyum* و *Acanthoprason* بیشترین تعداد از گونه‌های هم نوع را در خود جای داده‌اند که خصوصیات مشترک ریختی آن‌ها نیز مؤید این مسئله است. گونه *A. hooshidaryae* با داشتن برگ‌هایی پهن، گل‌آذین به نسبت شل با دم‌گل‌های نسبتاً نابرابر، گلبرگ‌های نسبتاً پهن و کمی به عقب برگشته و تخمدان‌های بسیار بزرگی که دارای برآمدگی‌های زگیل مانند با جهت شعاعی در رأس هستند و همچنین میوه‌های کپسولی که به‌طور گسترده باز می‌شوند، شناخته می‌شود. بر اساس نتایج رده‌بندی فریچ و عباسی (Fritsch and Abbasi, 2013) که بر مبنای داده‌های مورفولوژیک و مولکولی (Iinternal transcribed spacer, ITS) است، این گونه در زیر جنس *Pseudoprason* قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر اکوتیپی از این گونه(Ahosh1) دارای ارتباط نزدیکی با *A. saralicum* از بخش *Melanocrommyum* است. اگرچه ریخت‌شناسی دو گونه اشتراکات اندکی را نشان می‌دهند ولی موقعیت جغرافیایی یکسان هر دو اکوتیپ می‌تواند دلیلی برای قرابت ژنتیکی آن‌ها باشد. سایر اکوتیپ‌های بخش *Pseudoprason* نیز ارتباط خویشاوندی نزدیکی را با اکوتیپ‌های بخش *Acanthoprason* نشان داده است. آنالیز توالی‌های کلروپلاستی *trn*L*trn*F توسط گوروشیدزه و همکاران (Gurushidze *et al.*, 2010) نیز گونه‌های این دو بخش را در دودمان مشترکی نشان داده‌اند. هرچند حضور و مقایسه گونه‌های بیشتر از هر دو بخش برای صحت خویشاوندی و نزدیکی آن‌ها الزامی است.

اکوتیپ‌های نماینده بخش *Melanocrommyum* شامل گونه‌های *A. shatakiense* و *A. saralicum* بودند. این گونه‌ها دارای خصوصیات ریخت‌شناختی مشترکی از جمله وجود برگ‌های ٤-٧تایی خطی با رأس مثلثی که کمی به عقب برمی‌گردد، اسپات کاغذی که به‌طور کامل به چندین قسمت مثلثی شکل تقسیم شده، قهوه‌ای کم‌رنگ با رگه‌های قهوه‌ای، گل‌آذین نیمه‌کروی، بسیار متراکم و پرگل تا ٤/٥ سانتی‌متر طول و ٨ سانتی‌متر قطر، دم‌گل‌های استوانه‌ای، با طول ٢-٣ سانتی‌متر، زرد تا سبز، نیمه‌براق و غیره می‌باشند. وجود این خصوصیات مشترک همراه با دودمان مشترک کلروپلاستی گزارش شده توسط گوروشیدزه و همکاران (Gurushidze *et al.*, 2010) کاملاً در تأیید قرابت خویشاوندی اکوتیپ‌های مطالعه شده است. اگرچه اکوتیپ (*A. saralicum*) Asara4 تنها اکوتیپی بود که ارتباط نزدیکی را با *A. stipitatum* (Asti4) نشان داد. جالب اینکه هر دو اکوتیپ از یک منطقه جغرافیایی جمع‌آوری شده‌اند. اکوتیپ‌های بخش *Proceallium* که در این مطالعه شامل گونه‌های *A. jesdianum* و *A. stipitatum* است، خویشاوندی نزدیکی را نشان دادند. شباهت‌های ریخت‌شناختی و تشابه در توالی‌های ITS و *trnLtrnF* نیز قرابت این دو را تأیید کرده است. صفات مشترکی از جمله اندازه پیاز ٢-٤ سانتی‌متر، غشاء پوشاننده کاغذی که در نزدیک قاعده از هم جدا می‌شوند، اسپات کاغذی، گل‌آذین پرگل و

متراکم با قطر ۳– ۸ سانتی‌متر و دم‌گل‌های نیمه‌براق از معدود صفاتی هستند که در هر دو گونه *A. stipitatum* و *A. saralicum* مشترک هستند. اشتراک در این صفات و همچنین موقعیت جغرافیایی نزدیک آن‌ها می‌تواند دلیل نزدیکی اکوتیپ‌هایی از دو بخش متفاوت باشد.

در شاخه دوم از درخت نتایج، گونه‌های *A. ubipetrense* و *A. kurdestanicum* و *A. haemanthoides* با ارتباط نزدیک قرار دارند که مطابق با یافته‌های حاصل از توالی‌های ITS، داده‌های مورفولوژیک (Fritsch and Abbasi, 2013) و داده‌های ژنتیکی ISSR حاصل از مطالعه اخوان و همکاران (Akhavan *et al.*, 2015) است. *Allium ubipetrense* در ایران از مناطق شرقی استان‌های مرکزی و اصفهان به سمت غرب تا استان‌های زنجان و کردستان پراکنش دارد. این گونه شامل مورفوتیپ‌های مختلفی است که گاهی ممکن است منجر به شناسایی اشتباه آن‌ها شود. در این مطالعه، دو فرد از این گونه از منطقه کلاترزان کردستان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هر دو نمونه با درصد تشابه ژنتیکی بالا (۹۱ درصد) در کنار هم قرار گرفتند که در مجموع می‌تواند نشان دهنده تشابه ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های مختلف این گونه باشد. البته با بررسی مجدد نمونه‌های کاشته شده در گلخانه می‌توان فاصله ژنتیکی را مجدداً ارزیابی کرد. زیرا احتمال اینکه تنوع مورفولوژیکی آن‌ها ناشی از تأثیر شرایط محیطی باشد، بسیار بالا است.

شباهت ژنتیکی نسبتاً بالای (۵۱ درصد) *A. ubipetrense* با *A. kurdestanicum* و *A. haemanthoides* بر اساس داده‌های ISSR مشاهده شد. اکوتیپ‌های *A. kurdestanicum* از مناطق کلاترزان و سارال بودند که اشتراکات جغرافیایی با اکوتیپ‌های گونه‌های *A. ubipetrense* و *A. haemanthoides* داشتند. این گونه‌ها در مطالعه درخت فیلوژنی ITS نیز ارتباط نزدیکی را نشان داده‌اند (Fritsch and Abbasi, 2013). در مطالعه حاضر این گونه‌ها در خوشه دوم قرار گرفته‌اند جایی‌که اکوتیپ‌هایی از گونه *A. hooshidaryae* نیز قرار دارد. لازم به ذکر است که در مطالعه اخوان و همکاران (Akhavan *et al.*, 2015)، *A. haemanthoides* کاملاً از دو گونه دیگر جدا شده و در خوشه‌ای متفاوت قرار دارد. بنابراین با توجه به شباهت مولکولی بالا و توزیع جغرافیایی مشترک، لازم است روابط خویشاوندی این گونه‌ها با تعداد جمعیت‌های بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

خوشه سوم از درخت ISSR به اکوتیپ‌هایی از گونه *A. tripedale* اختصاص یافته است. این گونه در تاکسونومی گذشته در جنس دومی به نام *Nectaroscordum* و جدای از *Allium* در نظر گرفته می‌شد. البته در حال حاضر این گونه در زیر جنس و بخش *Nectaroscordum* قرار دارد و گونه‌ای از جنس *Allium* محسوب می‌شود. در این پژوهش سه اکوتیپ از گونه *A. tripedale* ارزیابی شد که بر اساس نتیجه خوشه‌بندی دو اکوتیپ از آن‌ها در بین سایر گونه‌های جنس *Allium* قرار داشت. اکوتیپ سوم از این گونه در تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی نشده است. هرچند این اکوتیپ در گروه‌بندی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی همراه با سایر اکوتیپ‌های این گونه و در کنار اکوتیپ‌های گونه *A. hooshidaryae* در یک گروه قرار دارند. برای پی‌بردن به منشأ اجدادی یکسان این اکوتیپ‌ها با گونه‌های زیرجنس *Melanocrommyum*، لازم است نمونه‌های بیشتری از بخش *Nectaroscordum* مورد بررسی قرار گیرد. گونه *A. iranicum* نیز با درصد تشابه ژنتیکی بیشتر نسبت به *A. tripedale*، با سایر اکوتیپ‌های زیرجنس *Melanocrommyum* به‌ویژه با *A. stipitatum* (۵۱ درصد)، می‌تواند شاهدی برای وجود نیای مشترک این گونه با سایر اکوتیپ‌های زیرجنس *Melanocrommyum* باشد.

بالا بودن نسبی میزان PIC در بعضی از آغازگرهای مورد استفاده نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز اکوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد که نشان دهنده سودمندی این آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های *Allium* است. لیانگ و همکاران (Liang *et al.*, 2008) گزارش دادند که آغازگرهای که PIC بزرگ‌تر از ۰/۵ داشته باشند، دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند. آغازگرهای که مقادیرPIC آن‌ها بین ۰/۲۵ و ۰/۵ باشد سودمند هستند و آن‌هایی که کمتر از ۰/۲۵ باشد، حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند. در مطالعه شارما و همکاران (Sharma *et al.*, 2016) در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *A. sativum*

L. این مقدار برای ٤ آغازگر مورد استفاده بین ۰/۰٤ تا ۰/۹ متغیر بود. در مطالعه سودها و همکاران (Sudha *at al*., 2019) مقدار این شاخص برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *A. cepa* L. با شش آغازگر، بین ۰/۰۷ تا ۰/۵ متغیر بود. این مقدار برای اکوتیپ‌های ارزیابی شده جنس *Allium* در مطالعه حاضر بین ۰/۱۹ تا ۰/٤۳ متغیر بود. با توجه به اینکه حداکثرPIC برای نشانگرهای غالب کمتر از ۰/۵ ذکر شده است، می‌تواند بیانگر محتوای اطلاعات مفید نشانگرهای استفاده شده و پراکندگی مناسب آن‌ها در ژنوم اکوتیپ‌های مورد بررسی باشد.

اکوتیپ‌های *Allium* از نظر ژنتیکی بسیار متنوع هستند و نشانگر ISSR توانست به‌عنوان ابزار مناسبی برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تخمین درجه شباهت ژنتیکی در این گونه مورد استفاده واقع شود و نشانگرهای ISSR780، ISSR811، UBC808 و UBC873 مورد استفاده در این مطالعه از کارایی بالایی در این زمینه برخوردار بودند. نتیجه تحقیق حاضر درک روشنی از روابط گونه‌های منتخب *Allium* را نشان داد و آنالیزهای آماری انجام گرفته درصد تنوع قابل‌توجه بین اکوتیپ‌ها را نشان داد. بیشتر اکوتیپ‌هایی که از نظر خصوصیات مورفولوژیکی شبیه هستند یا دودمان مشترکی دارند در خوشه‌ها و گروه‌های نزدیک به‌هم بودند و نتایج تا حدود زیادی مطابق با رده‌بندی کلاسیک بوده است. تجزیه و تحلیل مولکولی انجام شده در این مطالعه اطلاعات ارزشمندی را به محققان برای مطالعات حفاظتی و همچنین به‌نژادی در جهت تولید گونه‌های زراعی از گونه‌هایی که بیشترین درصد تشابه را داشته‌اند، ارائه می‌دهد. از آنجا که تجزیه و تحلیل داده‌های ISSR مجموعه داده‌های بزرگ‌تری را در مقایسه با داده‌های مورفولوژیکی تولید می‌کند، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بر روی گونه‌های بیشتری از بخش‌های *Pseudoprason*، *Proceallium*، *Acanthoprason* و *Melanocrommyum* انجام شود. البته جهت تأیید صحت گروه‌بندی‌ها، استفاده از ترکیب داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی به‌صورت یکپارچه ضروری است و البته نیل به این هدف، جمع‌آوری و دسترسی به مجموعه‌های زنده بیشتری را می‌طلبد تا پایگاه دقیق و مطمئنی از داده‌ها در اختیار قرار گیرد.

References

Akhavan, A., Saeidi, H., Rahiminejad, M.R., Zarre, S. and Blattner, F.R. (2015). Interspecific relationships in *Allium* subgenus Melanocrommyum sections *Acanthoprason* and *Asteroprason* (Amaryllidaceae) revealed using ISSR markers. *Systematic Botany*, **40:** 706-715.

Eghlima, G., Kheiry, A., Sanikhani, M., Hadian, J. and Aelaie, M. (2021). study of genetic diversity of glycyrrizha glabra l. populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **8:** 81-94 (In Persian).

Friesen, N., Fritsch, R.M. and Blattner, F.R. (2006). Phylogeny and new intrageneric classification of Allium (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, **22:** 372-395.

Fritsch, M.R. and Gurushidze, M. (2009). Phylogenetic relationships of ornamental species in *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb et Berthel.) Rouy (Alliaceae). *Israel Journal of Plant Sciences*, **57:** 287-295.

Fritsch, R. and Abbasi, M. (2013). *A Taxonomic Review of Allium subg. Melanocrommyum in Iran.* IPK, Gatersleben, DE.

Fritsch, R. and Amini Rad, M. (2013). *Allium pseudostrictum* (Amaryllidaceae), a new record from Iran. *Rostaniha*, **14:** 81-84.

Fritsch, R.M. (2012). Illustrated key to the sections and subsections and brief general circumscription of *Allium* subg. *Melanocrommyum*. *Phyton (Horn)*, **52**: 1-37.

Fritsch, R.M. and Maroofi, H. (2010). New species and new records of *Allium* L. (Alliaceae) from Iran. *Phyton (Horn)*, **50**: 1-26.

Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J. (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, **88:** 226-237.

Gurushidze, M. (2009). Phylogenetic relationships and diversification processes in *Allium* subgenus *Melanocrommyum*. Ph.D. Thesis, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, German State of Saxony-Anhalt, Germany.

Gurushidze, M., Fritsch, R.M. and Blattner, F.R. (2008). Phylogenetic analysis of *Allium* subg. *Melanocrommyum* infers cryptic species and demands a new sectional classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49:** 997-1007.

Gurushidze, M., Fritsch, R.M. and Blattner, F.R. (2010). Species-level phylogeny of *Allium* subgenus *Melanocrommyum*: Incomplete lineage sorting, hybridization and trnF gene duplication. *Taxon*, **59:** 829-840.

Hosseini, S. (2018). Karyological studies of some *Allium* L.(Amaryllidaceae) species in Iran. *The Iranian Journal of Botany*, **24:** 65-71.

Hosseini, S. and Go, R. (2010). Cytogenetic study of some *Allium* species (subgenus *Allium* and *Melanocrommyum*) in Iran. *Cytologia*, **75:** 99-108.

Li, Q.Q., Zhou, S.D., He, X.J., Yu, Y., Zhang, Y C. and Wei, X. Q. (2010). Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. *Annals of Botany*, **106:** 709-733.

Liang, J.X., Qi, J.M., Fang, P.P., Wang, T., Chen, S.H., Zhou, D.X., Tao, A.F., Liang, K.J. and Wu, W.R. (2008). Genetic diversity and genetic relatives analysis of tobacco germplasm based on inter-simple sequence repeat (ISSR). *Scientia Agricultura Sinica*, **32(3):** 373-378.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27:** 209-220.

Memariani, F., Joharchi, M.R. and Arjmandi, A.A. (2012). *Allium aladaghense* (Amaryllidaceae, Allieae), a new species of section *Asteroprason* from northeast of Iran. *Phytotaxa*, **56:** 28-34.

Navabpour, S., Yamchi, A. and Golcheshmeh, S. (2021). Assessment of genetic diversity between different accessions of calotropis procera with ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **8**: 17-28 (In Persian).

Pawell, W., Morganet, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A. (1996). The comparision of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2:** 225-238.

Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6:** 288-295.

Peakall, R. and Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, **28:** 2537-2539.

Petrova, G., Petrova, S., Delcheva, M. and Bancheva, S. (2017). Genetic diversity and conservation of Bulgarian endemic Verbasum tzar-borisii (Scrophulariaceae). *Annales Botanici Fennici*, **54:** 307- 317.

Razyfard, H., Zarre, S., Fritsch, R.M. and Maroofi, H. (2011). Four new species of *Allium* (Alliaceae) from Iran. *Annales Botanici Fennici*, **48:** 352-360.

Ren, N. and Timko, M.P. (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. *Genome*, **44:** 559-571.

Rezaei, J., Mehrjerdi, Z.M. and Mastali, H. (2018). ISSR based analysis of genetic diversity in some endangered species of *Allium* subg. *Melanocrommyum*. *Genetika*, **50:** 59-68.

Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, USA.

Samiei, L., Kiani, M., Zarghami, H., Memariani, F. and Joharchi, M.R. (2015). Genetic diversity and interspecific relationships of some Allium species using inter simple sequence repeat markers. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, **22:** 67-75.

Santhosh, W., Shobha, D. and Melwyn, G. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120:** 411-417.

Shannon, C.E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, **27:** 379-423.

Sharma, V.R., Malik, S., Kumar, M., Sirohi, A. and Nagaraju, K. (2016). Assessment of genetic diversity in garlic (*Allium sativum* L.) genotypes based on ISSR markers. *Plant Archives*, **16:** 88-95.

Sudha, G.S., Ramesh, P., Sekhar, A.C., Krishna, T.S., Bramhachari, P. and Riazunnisa, K. (2019). Genetic diversity analysis of selected Onion (*Allium cepa* L.) germplasm using specific RAPD and ISSR polymorphism markers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **17:** 110-118.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20:** 176-183.

Study of Genetic Diversity of Some *Allium* L. Species Based on ISSR Markers in Kurdistan Province

Shahla Hosseini[1,*], Mohammad Reza Rahgozar[2] and Hedieh Badakhshan[3]

1- Assistant Professor, Department of Biological Science, Faculty of Basic Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2- M.Sc. Student, Department of Biological Science, Faculty of Basic Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculyure, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(Received: January 23, 2022 - Accepted: March 13, 2022)

Abstract

Genus *Allium* L. contains very taxonomically complex sections, especially the subgenus *Melanocrommyum*. The systematic position of the species in each section has been revised many times over time. In the present study, the relationship between 32 ecotypes belonging to 10 different species of *Allium* was investigated using ISSR markers. The nine primers used produced 166 polymorphic bands (average 18 bands per primer). Among the primers used, ISSR873 primer with 27 bands made the most, and ISSR4 primer with two bands had the lowest polymorphic bands. The PIC of the markers ranged from 0.04 to 0.43. Cluster analysis by UPGMA method based on molecular markers divided the studied ecotypes into four groups. The clustering and principal coordinate analysis results showed that most morphologically similar species were grouped in closed clusters. According to Dice similarity coefficient, the highest percentage of similarity was shown between *Allium stipitatum* and *Allium saralicum* ecotypes (72 percent) from the *Melanocrommyum* subgenus, and the lowest similarity was obtained between *Allium tripedale* and *Allium iranicum* ecotypes (12 percent). The ecotypes with the lowest similarity percentage belong to the subgenus *Allium* and *Nectaroscordum*, which are placed in separate clusters. Based on the results, the ecotypes of *Pseudoprason*, *Melanocrommyum*, and *Procerallium* sections showed the highest affinity. In general, it can be concluded that ISSR markers are useful for classifying *Allium* species and have sufficient potential for phylogenetic studies of species. In addition, due to significant genetic diversity among the studied ecotypes of wild *Allium* species, this diversity can be used in future breeding programs of crop.

Keywords: Cluster analysis, Genetic diversity, *Melanocrommyum*

* **Corresponding Author, E-mail: sh.hosseini@uok.ac.ir**