

ارزیابی تنوع ژنتیکی و پراکندگی جغرافیایی برخی اکوتیپ‌های سیر (*Allium sativum* L.) موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و M13

مسعود فخرفشانی^{۱*} و فرج‌اله شهریاری^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۱۶

چکیده

سیر (*Allium sativum* L.) یکی از ارزشمندترین گیاهان صنعتی- دارویی می‌باشد که به دلیل اهمیت بالای آن از ابعاد مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است، اما اطلاعات بسیار اندک و ناقصی راجع به پراکندگی، تنوع و طبقه‌بندی آن در سراسر جهان وجود دارد بطوریکه تنها گروه‌بندی‌های موجود، بر اساس عناوین تجاری، محلی، منطقه جغرافیایی رویش و برخی ویژگی‌های فنوتیپی می‌باشند. عمده ترین دلیل آن نیز عقیم بودن و عدم تولید گل در سیر است که طبقه بندی مورفولوژیکی آن را مشکل ساخته است. به همین دلیل پژوهش حاضر به عنوان اولین مطالعه کاربرد نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – نواحی بین توالی‌های ساده تکراری) روی توده‌های بومی ایران و با اهداف مطالعات تاکسونومی در سطوح زیر گونه‌ای، تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی بین اکوتیپ‌های بومی ایران با فنوتیپ‌های متفاوت و همچنین بررسی وجود اختلاط فیزیکی بین اکوتیپ‌های سیر ایرانی و برخی از سیرهای وارداتی و شناسایی توده‌های تکراری در مجموعه‌های ژرمپلاسم ایران صورت پذیرفت. بر اساس نتایج این پژوهش ۲۶ توده جغرافیایی (اکوتیپ) مورد مطالعه، در ۲۴ شاخه متفاوت قرار گرفتند و با گروه‌بندی آنها در سطح شباهت ۰/۶۹ نمونه‌ها در چهار گروه مختلف قرار گرفتند که با محدوده پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها انطباق داشت. گروه اول شامل توده‌های جمع‌آوری شده از شمال و شمال غرب استان همدان؛ گروه دوم شامل اکوتیپ‌های پراکنده در غرب و جنوب غرب استان همدان، مناطق مرکزی، شرق و جنوب شرق ایران؛ گروه سوم توده جمع‌آوری شده از اهواز و گروه چهارم شامل نمونه‌هایی از شمال و شمال شرقی کشور بود.

واژه‌های کلیدی: تنوع درون گونه‌ای، چندشکلی ژنتیکی، فیلوژنی، گروه‌بندی مولکولی

مقدمه

شکل هندسی، رنگ، میزان ماده مؤثره، تحمل به سرما و بسیاری صفات مورفولوژیکی دیگر از شرق آسیا تا آمریکای جنوبی گسترش یافته است هرچند عمده‌ترین کشورهای تولیدکننده سیر در دنیا به ترتیب چین، هند، کره جنوبی، مصر و روسیه هستند (FAO STATS. 2012). با وجود آنکه بیشتر گیاهان وحشی این جنس در مناطق باستانی ایرانی- تورانی با زمستان‌های نسبتاً سرد و تابستان‌های خشک دیده می‌شوند (Kamenetsky, 2007)، ولی در قرن‌های ۱۸ و ۱۹ میلادی سیر به عنوان گیاهی مدیترانه‌ای شناخته می‌شد، اما واویلوف^۳ (۱۹۲۶) و کازاکوا^۴ (۱۹۷۱) بر اساس یافتن نمونه‌هایی از سیر وحشی در کوه‌های تین-شان^۵، مرکز تنوع آن را آسیای مرکزی اعلام کردند (Jabbes et al., 2011) و در حال حاضر نیز مناطق مدیترانه‌ای به عنوان دومین مرکز پراکنش سیر در نظر گرفته می‌شود (Lampasona et al., 2003). بر اساس گزارش‌های

جنس *Allium* با بیش از ۶۰۰ گونه مختلف، یکی از بزرگترین جنس‌ها در سلسله گیاهان می‌باشد که بیشتر آنها را گیاهان مهم دارویی، ادویه‌ای و زینتی تشکیل داده‌اند (Kamenetsky, 2007). سیر زراعی (*Allium sativum* L.) نیز یکی از مهمترین گیاهان صنعتی- دارویی این جنس می‌باشد که به دلیل اهمیت بالای آن از ابعاد مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. بعد از پیاز (*A. cepa* L.)، سیر پر مصرف‌ترین گیاه جنس *Allium* با تولید جهانی ۲۲ میلیون تن در سال می‌باشد که میزان تولید و مصرف آن روندی به شدت افزایشی داشته است؛ به طوریکه طی ۲۰ سال اخیر (۲۰۱۰-۱۹۹۰) میزان تولید آن به چهار برابر افزایش یافته است (FAO STATS, 2012). در حال حاضر کشت و تولید سیر با تنوع بسیار زیاد از نظر

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌تازگی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(Email: Fakhfeshani.m@gmail.com)

*-نویسنده مسئول:

3- Vavilov
4- Kazakova
5- Tein-Shan Mountains

جغرافیایی رویش و برخی ویژگی‌های فنوتیپی می‌باشد (Kamenetsky, 2007; Camargo et al., 2010; Son et al., 2010). برای مثال، بر اساس ساقه گل‌دهنده^۵، دو دسته طبقه‌بندی در سیر وجود دارد، در دسته اول سیر به سه واریته تقسیم می‌شود؛ *A. sativum* var. *sativum* (بدون ساقه گل‌دهنده)، *A. sativum* var. *ophioscorodon* (با ساقه گل‌دهنده خمیده) و *A. sativum* var. *scordoprasum* (با ساقه گل‌دهنده ایستاده) و در دسته دوم که توسط گیاه‌شناس روسی، کراسنوف^۶ ارائه شده است سیرهای دارای ساقه گل‌دهنده به عنوان واریته *A. sativum* var. *sagittatum* Kuz. و سیرهای فاقد آن به عنوان واریته *A. sativum* var. *vulgarae* Kuz. معرفی می‌شوند. هرچند که طبقه‌بندی مرسوم آن از نظر زراعی به دو صورت نرم ساقه^۷ و سخت ساقه^۸ است، اما با توجه به اینکه فنوتیپ سیر، حتی بوجود آمدن ساقه گل‌دهنده در آن از شرایط محیطی تأثیر پذیر است، تعیین اینکه تفاوت‌های مشاهده شده بین نمونه‌ها تفاوت‌های ژنتیکی است یا محیطی و یا برهم‌کنش بین آن دو، قابل تشخیص نبوده و قابلیت اعتماد اینگونه طبقه‌بندی‌ها را کاهش می‌دهد (Kamenetsky, 2007).

استفاده از نشانگرهای مولکولی و مفهوم چندشکلی در مطالعات سیستماتیک به منظور تعیین روابط بین موجودات، پراکندگی جغرافیایی، مطالعات گونه‌زایی، رانش ژنتیکی، تنوع ژنتیکی و تفسیر ساختار جمعیت‌ها در دهه‌های اخیر در بسیاری از علوم زیستی همچون ژنتیک، اکولوژی، جانورشناسی و میکروبیولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Witono & Kondo, 2006; Nagy et al., 2012). زیرا صحت و دقت اطلاعات شجره‌ای می‌تواند نقش بسزایی در پیشبرد موفق پژوهش‌های بوم‌شناختی، تهیه، حفاظت و نگهداری از بانک‌های ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی داشته باشد؛ به طوریکه تخمین زده می‌شود ۱۰ درصد خطا در طبقه‌بندی شجره‌ای می‌تواند پیشرفت ژنتیکی یک برنامه اصلاحی را سه تا چهار درصد کاهش دهد (Hashemi et al., 2012). گروه مهمی از نشانگرهای تشخیصی که قادر به تفکیک گونه‌های هم‌نیا از یکدیگر هستند را می‌توان در میان توالی‌های تکراری ژنوم‌ها که به ریز ماهواره^۹ و ماهوارک‌ها^{۱۰} موسوم هستند پیدا کرد (Guenauoui et al., 2012).

از بین نشانگرهای مرسوم، RAPD^{۱۱} و ISSR به دلیل پراکندگی یکنواخت در کل ژنوم و عمومیت داشتن بین موجودات مختلف پر کاربردترین نشانگرها می‌باشند (Witono & Kondo,

FAO، آسیا با تولید بیش از ۸۸ درصد از سیر جهان در این زمینه پیشتاز می‌باشد و ایران نیز به عنوان یکی از قطب‌های تولید سیر در غرب آسیا با سطح زیر کشت ۷۲۰۰ هکتار و تولید ۶۶۰۰۰ تن در سال، ۳۷ درصد از تولیدات این منطقه را پوشش می‌دهد (FAO, 2012). به دلیل اهمیت تجاری-اقتصادی و دارویی-صنعتی سیر، علاقه به افزایش تولید، عملکرد و توسعه واریته‌های جدید به سرعت در حال افزایش است (Cunha et al., 2012)، اما اطلاعات بسیار اندک و ناقصی راجع به پراکندگی، تنوع و طبقه‌بندی آن وجود دارد و این نقص نه تنها راجع به ایران بلکه در گزارش‌هایی از سراسر جهان به آن اشاراتی شده است (Lampasona et al., 2003; Kamenetsky, 2007; Son et al., 2010; Jabbes et al., 2012). یکی از عمده‌ترین دلایل آن را می‌توان ساختار گیاهشناسی سیر دانست؛ زیرا پایه طبقه‌بندی‌های جزئی (زیر گونه و...) بر اساس ویژگی ریخت‌شناسی^۱ گل و اندام زایشی گیاهان صورت می‌گیرد (Lampasona et al., 2003; Kamenetsky, 2007). در حالیکه سیر زراعی (*Allium sativum*) گیاهی کاملاً عقیم می‌باشد (Lampasona et al., 2003; Kamenetsky, 2007; Jabbes et al., 2011; Son et al., 2012). به طوریکه یا اصولاً ساقه گل‌دهنده‌ای تولید نمی‌کند و یا اینکه در صورت بوجود آمدن ساقه، گل‌آذین انتهایی آن با حالتی غیر عادی، فاقد اندام‌های زایشی همچون مادگی، پرچم، خامه و... بوده و تنها شامل سیرچه‌هایی هوایی^۲ می‌باشد و این امر نه تنها طبقه‌بندی مورفولوژیکی سیر را مشکل ساخته است (Lampasona et al., 2003; Kamenetsky, 2007)، بلکه تنها راه تکثیر آن را نیز به روش رویشی و تنها راه رخداد تنوع در آن را به جهش‌های تصادفی، القایی و تنوع سوماکلونال محدود کرده بطوریکه ارقام زراعی^۳ جدید آن نیز تنها از طریق انتخاب از بین تنوع موجود و انتقال آنها به مناطق جدید معرفی می‌شوند (Lampasona et al., 2012). تاکنون بررسی‌های متعددی برای یافتن دلایل عقیمی سیر صورت گرفته است که همگی بر وجود نقص‌های ژنتیکی-فیزیولوژیکی و حضور دائمی گروهی از فاکتورهای جابجاشونده^۴ در ژنوم سیر زراعی اتفاق نظر دارند (Son et al., 2010). در برخی ارقام وحشی سیر، نمونه‌های بارور مشاهده شده است (Kamenetsky, 2007)، اما نظر به اینکه محصول تجاری ارقام عقیم بسیار بیشتر از نمونه‌های بارور است، این ارقام توسط کشاورزان انتخاب شده و توسعه یافته‌اند؛ به طوریکه در حال حاضر گزارشی مبنی بر وجود سیر زراعی بارور وجود ندارد. به همین دلایل تنها گروه‌بندی‌های موجود بر اساس عناوین تجاری، محلی، منطقه

5- Scape

6- Nikolai Ivanovich Kuznetsov, 1864-1932

7- Softneck

8- Hardneck

9- Microsatellites

10- Minisatellites

11- Random Amplification of Polymorphic DNA

1- Morphology

2- Bulbils

3- Cultivar

4- Transposon Elements

کاربرد این نشانگر بر روی توده‌های بومی ایران و با اهداف بررسی قابلیت استفاده از نشانگر ISSR برای مطالعات تاکسونومی در سطوح زیر گونه‌ای، تشخیص تفاوت‌ها و پراکندگی‌های ژنتیکی بین اکوتیپ‌های بومی ایران با فنوتیپ‌های متفاوت از نظر رنگ پوست خارجی، تعداد لایه سیرچه‌های تشکیل‌دهنده هر سیر و شکل مقاطع طولی و عرضی آنها و همچنین بررسی وجود اختلاط فیزیکی بین اکوتیپ‌های سیر ایرانی و برخی از سیرهای وارداتی و نیز شناسایی توده‌های تکراری در مجموعه‌های ژرم‌پلاسما ایران صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

توده سیرهای جمع‌آوری شده جهت مطالعه، مشتمل بر ۴۰ توده بومی بودند که از سراسر کشور جمع‌آوری شدند. بنا به اظهارات فراهم‌کنندگان، تمامی نمونه‌ها فاقد قابلیت تولید ساقه گل‌دهنده و یا به عبارتی جزو سیرهای نرم ساقه بودند. پس از جمع‌آوری، با توجه به سنتی بودن زراعت سیر و وجود احتمال کشت یک توده محلی در چندین موقعیت جغرافیایی، به منظور به حداقل رساندن وجود توده‌های تکراری، نمونه‌های مورد استفاده جهت ادامه مراحل آزمایشی از بین توده‌های جمع‌آوری شده از مراکز اصلی و با سابقه کشت طولانی مدت سیر گزینش شدند. در نهایت، ۲۶ توده محلی انتخاب (جدول ۱) و از هر توده پنج نمونه مختلف در گلخانه‌های تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد کشت شدند.

استخراج DNA

از بین هر یک از توده‌های موجود (جدول ۱)، سه نمونه مختلف به تصادف انتخاب و DNA آنها با استفاده از کیت Invitek^۴ (آلمان) استخراج شد. به منظور تعیین کیفیت DNAها، غلظت ۷۸ نمونه DNA استخراج شده (۳×۲۶) با استفاده از دستگاه نانودراپ^۵ تعیین و همه نمونه‌ها بر اساس رقیق‌ترین نمونه، هم غلظت و روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردیدند.

تکثیر قطعات DNA

برای این منظور ۲۰ آغازگر ISSR که بر اساس گزارش‌های منتشر شده بیشترین تعداد باند را در نمونه‌های بررسی شده در خانواده Alliaceae یا جنس *Allium* تولید کرده بودند و همچنین آغازگر توالی‌های M13، به منظور بررسی روی توده سیرهای ایرانی انتخاب و توسط شرکت متابیون^۶ (آلمان) تولید شدند که مشخصات آنها در جدول ۲ آمده است.

(2006). نشانگر ISSR در واقع قطعات تکثیر شده DNA هستند که بین دو قطعه متوالی و معکوس از توالی‌های تکراری قرار گرفته‌اند. این نشانگر پس از شناسایی توالی‌های ریز ماهواره‌ای در ژنوم یوکاریوت‌ها توسعه یافت و تاکنون در مطالعات فراوانی به منظور بررسی روابط ژنتیکی بین و درون گونه‌ای مانند شناسایی واریته‌ها، ارقام زراعی و توده‌ها استفاده شده است (Liu & Wendel, 2001; Reddy et al., 2002; Khadari et al., 2003). اولین گزارش‌ها از کاربرد نشانگر ISSR در سال ۱۹۹۴ منتشر شد (Zietkiewicz et al., 1994; Gupta et al., 1994). گوپتا و همکاران (Gupta et al., 1994) با آزمون آغازگرهای مبتنی بر ISSR روی جمعیت‌ها و شجره‌هایی از انگور (*Vitis sp.*)، کاهو (*Lactuca sativa L.*)، گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum L.*)، کاج (*Pinus sp.*)، ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*)، ماکیان، گاو هلشتاین و انسان، قابلیت آن در شناسایی و تفکیک افراد جمعیت‌هایی با قرابت ژنتیکی زیاد را مورد تأیید قرار دادند. زیتکوویچ و همکاران (Zietkiewicz et al., 1994) نیز در بررسی اولیه این نشانگر ضمن دستیابی به الگوهای اختصاصی برای گونه‌های متعدد یوکاریوتی آن را به عنوان یک ابزار نقشه یابی با تفرق مندی معرفی کردند. هرچند که اساس محبوبیت نشانگر ISSR پراکندگی یکنواخت ریزماهواره‌ها در سطح ژنوم بوده است، اما جبران نقص نشانگرهای قبلی همچون تکرارپذیری پایین RAPD، زمانبری و هزینه بالای AFLP و نیاز به اطلاعات قبلی به منظور تهیه آغازگر در SSR نیز در توسعه کاربرد آن موثر بوده است (Reddy et al., 2002).

اولین گزارش‌های مربوط به استفاده از فاز M13 به عنوان یک نشانگر نیز به ۲۰ سال قبل بازمی‌گردد (Guenauoui et al., 2012) و نشانگرهای حاصل از آن در واقع یک توالی ۱۵ نوکلئوتیدی ریز ماهواره‌ای از میان ژن پروتئین III آن فاز^۱ است (Ryskov et al., 1988) که مکمل بسیاری از توالی‌های تکراری پراکنده در ژنوم یوکاریوت‌های پیشرفته است (Ryskov et al., 1988; Upcroft et al., 1990) که ابتدا به صورت کاوشگر در نشانگر RFLP^۲ استفاده شد (Ryskov et al., 1988; Westneat, 1990)، اما به دلیل اثبات قابلیت آن در شناسایی تنوع در ژنوم‌های مختلف یوکاریوتی در حال حاضر نیز در نشانگرهای مبتنی بر PCR^۳ به عنوان یک آغازگر عمومی برای شناسایی و توصیف گونه‌ها استفاده می‌شود (Guenauoui et al., 2012) که در پژوهش حاضر نیز به عنوان یکی از آغازگرهای محتمل برای شناسایی روابط ژنتیکی سیر زراعی انتخاب و مورد مطالعه قرار گرفته است.

با توجه به عدم وجود گزارشی مبنی بر کاربرد و آزمون نشانگر ISSR روی سیرهای ایرانی، پژوهش حاضر به عنوان اولین مطالعه

4- Invitek- Germany Cat #1037100200
5- Nano drop- ThermoScientific (USA)
6- Metabion- Germany

1- Protein III Gene of the Bacteriophage M13
2- Restriction Fragment Length Polymorphism
3- Polymerase Chain Reaction

جدول ۱- مشخصات مبداء جمع‌آوری توده‌های سیر استفاده شده در مطالعه مبتنی بر نشانگر مولکولی ISSR

Table 1- Origin specification of garlic clones studied by ISSR molecular marker

کشور Country	استان Province	شهر / منطقه City / region	مختصات جغرافیایی Coordinate	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)
ایران Iran	همدان Hamadan	علی‌آباد Ali-abad	34°27'15"N 48°11'46"E	1492
ایران Iran	همدان Hamadan	چنار Chenar	34° 9' 5N 48° 15' 23E	1723
ایران Iran	همدان Hamadan	گراچنالی Grachnali	34°56'50"N 48°17'50"E	1712
ایران Iran	همدان Hamadan	گنج‌تپه Ganjtapeh	34°55'54"N 48°27'52"E	1715
ایران Iran	همدان Hamadan	حسام‌آباد Hessam-abad	34°57'25N 48°26'24E	1716
ایران Iran	همدان Hamadan	لالجین Lalejin	34°58'29"N 48°28'33"E	1731
ایران Iran	همدان Hamadan	مریانج Marianaj	34°49'52"N 48°27'33"E	1778
ایران Iran	همدان Hamadan	تویسرکان Tuyserkān	34°32'53N 48°26'49E	1890
ایران Iran	همدان Hamadan	همدان Hamadan	34° 47' 46N 48° 30' 57E	1876
ایران Iran	خوزستان Khuzestan	اهواز Ahvaz	31° 21' 19N 48° 45' 2E	30
ایران Iran	کرمان Kerman	زرند Zarand	30°48'46"N 56°33'50"E	1650
ایران Iran	یزد Yazd	یزد Yazd	31°53'50"N 54°22'04"E	1216
ایران Iran	یزد Yazd	طبس Tabas	33°35'45"N 56°55'28"E	667
ایران Iran	اصفهان Isfahan	اصفهان Isfahan	32° 39' 35N 51° 40' 17E	1590
ایران Iran	گیلان Gilan	رودسر - سرمستان Rudsar-Sarmastān	37° 7' 29N 50° 17' 12E	-2
ایران Iran	مازندران Mazandaran	ساری Sari	36° 34' 4N 53° 3' 31E	54
ایران Iran	خراسان رضوی Khorasan Razavi	سبزوار Sabzevar	36°12'45"N 57°40'55"E	977
ایران Iran	خراسان شمالی Northern Khorasan	بجنورد Bojnourd	37°28'30"N 57°20'00"E	1086
ایران Iran	خراسان رضوی Khorasan Razavi	خواف Khvaf	34°34'35N 60°8' 27E	969
ایران Iran	خراسان رضوی Khorasan Razavi	تربت حیدریه-بایگ Torbat Heydarieh-Bayg	35°22'33"N 59°02'16"E	1522
ایران Iran	خراسان جنوبی Southern Khorasan	قائنات- زیرکوه Ghaenat- Zirkooh	33°22'44"N 60°00'20"E	1167
ایران Iran	گیلان Gilan	لاهیجان Lahijan	37°12'26"N 50°00'14"E	4
ایران Iran	گلستان Golestan	علی‌آباد کتول Aliabad-e Katul	36°54'30"N 54°52'08"E	178
پاکستان Pakistan	توده تجاری Traditional Colony	توده تجاری Traditional Colony	--	--
چین China	توده تجاری Traditional Colony	توده تجاری Traditional Colony	--	--

جدول ۲- جزئیات آغازگرهای ISSR و M13 مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سیر

نام آغازگر Primer name	توالی (۳' → ۵') Sequence (5' to 3')	دمای اتصال بهینه شده (درجه سانتی‌گراد) Optimized annealing temperature (°C)
Tn-1	GAACAAACAAACAAACA	47
Tn-2	TVATCTCTCTCTCTCTC	47
Tn-3	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	39
Tn-4	ACACACACACACACACYG	43
Tn-5	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	43
Tn-6	CACACACACACACACARG	45
U07	AGAGAGAGAGAGAGAGT	45
U08	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48
U09	AGAGAGAGAGAGAGAGG	47
U10	GAGAGAGAGAGAGAGAC	44
U11	GAGAGAGAGAGAGAGAT	44
U17	CACACACACACACAAA	42
U25	ACACACACACACACT	44
U61	ACCACCACCACCACCACC	47
U91	TGTGTGTGTGTGTGTG	41
SPAR	GTGGTGGTGGTGGTG	45
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	45
Eg2.2	CGT CGT CGT CGT CT	40
Eg4.3	CACACACACACACG	39
Eg6.3	GAG GAG GAG GC	38
Eg10.6	CTC CTC CTC GC	38

شبهات ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYSpc^{v2.02}، روش SIMQUAL و ضریب تشابه Jaccard محاسبه گردید و رسم دندروگرام با استفاده از روش تجزیه کلاستر UPGMA و الگوریتم SAHN صورت پذیرفت (شکل ۲). با توجه به اینکه ISSR جزو نشانگرهای غالب محسوب می‌شود، میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) هر یک از آغازگرها نیز با استفاده از معادله $PIC = 1 - p^2 - q^2$ محاسبه گردید که در آن p برابر فراوانی باند و q فراوانی فقدان باند برای هر آغازگر می‌باشد (Haouari & Ferchichi, 2008; Mousavi et al., 2012). در بخش دوم این پژوهش نیز آغازگرهایی را که بیشترین قدرت تفکیک بین توده‌های مختلف ایجاد کرده بودند؛ به منظور تخمین تنوع ژنتیکی درون توده‌ای، روی نمونه‌های هر یک از توده‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

با استفاده از ۲۱ آغازگر بررسی شده (ISSR و M13) روی ۲۶ توده مورد مطالعه در کل بیش از ۵۰۰۰ باند با وضوح مناسب در محدوده ۲۰۰bp تا ۱۵۰۰bp تولید شد یعنی به طور متوسط ۹/۱۶ آلل به ازاء هر آغازگر (باند به ازاء هر آغازگر برای هر اکوتیپ) که بسته به نوع آغازگر، در هر نمونه، بین صفر تا ۱۰ باند چند شکل مشاهده گردید. آغازگر M13 هیچ باند چندشکلی بین ۲۶ نمونه مورد مطالعه تولید نکرد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰µL شامل ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی و ۲mM نمک MgCl₂ و مابقی نسبت‌ها بر اساس استانداردهای مرسوم صورت پذیرفت. برنامه دمایی مورد استفاده به صورت ۱۰ دقیقه ۹۵ درجه ابتدایی و در ادامه ۳۵ چرخه با تکرار ۴۵ ثانیه ۹۵ درجه واسرشت سازی، ۴۵ ثانیه اتصال آغازگر (از ۳۸ تا ۴۸ درجه سانتی‌گراد بسته به نوع آغازگر) و ۹۰ ثانیه ۷۲ درجه به منظور بسط رشته‌ها و در نهایت یک مرحله ۱۰ دقیقه‌ای ۷۲ درجه به منظور تکمیل بسط رشته‌ها استفاده گردید. سپس ۱۰µL از محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی TBE 0.5x و رنگ GreenViwer^{®1} (با غلظت ۱۰ میکرولیتر به ازاء هر ۱۰۰ میلی لیتر ژل) بارگذاری^۲ و با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت (معادل هشت ولت به ازاء هر سانتی‌متر طول ژل) الکتروفورز و سپس از ژل‌ها عکس برداری شد. پس از این مرحله، نتایج حاصل از آغازگرهایی که از توانایی تولید باند با وضوح مناسب و یا باندهای چند شکل برخوردار نبودند، از ادامه روند آزمایش حذف شدند.

جمع‌آوری داده‌ها

تصویر ژل‌های الکتروفورز حاصل از آغازگرهایی که باندهای چند شکل با وضوح مناسب تولید کرده بودند (جدول ۳) با استفاده از نرم افزار TotalLab TL120 version 2006 تحلیل و بر اساس حضور و یا عدم حضور یک باند در هر نمونه به داده‌های ۰ و ۱ و سپس با استفاده از نرم افزار NTedit v1.07c به ماتریس تبدیل شدند.

3- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System

4- Polymorphism Information Content

۱- به عنوان جایگزین اتیدیوم برماید

2- Load

جدول ۳- دامنه اندازه مولکولی آلل‌ها، تعداد آلل‌های تولید شده، درصد و محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرهای منتخب

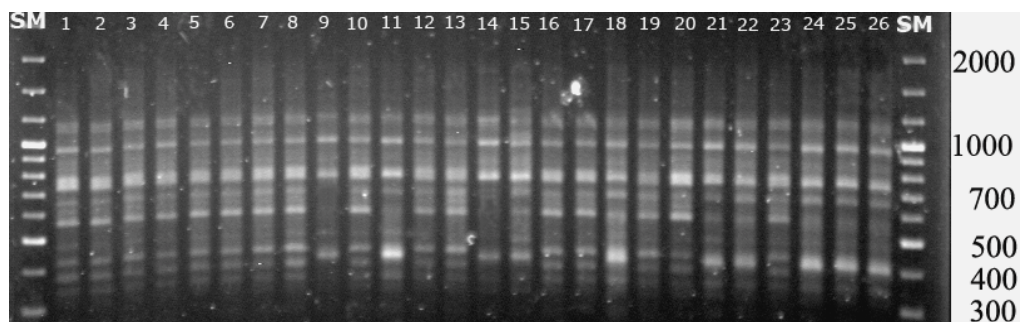
Table 3- Length range, no and percentage of produced and polymorphic alleles and PIC of the selected Primers

نام آغازگر Primer name	توالی (۵' → ۳') Sequence (5' to 3')	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)	تعداد آلل‌ها Number of Allele	تعداد و فراوانی باندهای چند شکل Number and frequency of polymorphic Allele	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic Information Content	دامنه اندازه آلل‌های مشاهده شده (جفت نوکلئوتید) Size range of the Alleles (bp)
Tn-3	GAGAGAGAGAGAGAYT	39	10	8 (80%)	0.46	400 - 1500
Tn-6	CACACACACACACARG	45	6	4 (67%)	0.36	200 - 1000
U07	AGAGAGAGAGAGAGAGT	45	9	4 (44%)	0.36	300 - 1000
U08	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48	7	5 (71%)	0.46	400 - 1000
U09	AGAGAGAGAGAGAGAGG	47	7	6 (60%)	0.48	300 - 900
U10	GAGAGAGAGAGAGAGAC	44	11	9 (81%)	0.48	400 - 1100
U11	GAGAGAGAGAGAGAGAT	44	7	5 (71%)	0.44	300 - 800
U17	CACACACACACACAAA	42	6	4 (66%)	0.39	400 - 800
U25	ACACACACACACACT	44	7	4 (57%)	0.38	300 - 700
U61	ACCACCACCACCACCACC	47	11	10 (91%)	0.48	400 - 1100
SPAR	GTGGTGGTGGTGGTG	45	6	2 (34%)	0.41	400 - 900
Eg10.6	CTC CTC CTC GC	38	7	4 (57%)	0.28	700 - 1200
بازه تغییرات Intervals			6 - 11	44% - 91%	0.28 - 0.48	200 - 1500
میانگین Mean			7.8	65%	0.42	---

تکراری مکمل با توالی آغازگر در ژنوم سیر باشد. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر آغازگرهای U10 و U61 و Tn-3 بیشترین تعداد آلل را تولید کردند (جدول ۳) و بر اساس اینکه تعداد آلل‌های هر مکان ژنی، مناسب بودن آن را برای تخمین تنوع و پراکندگی ژنتیکی یک جمعیت نشان می‌دهد (Haji Karam et al., 2011) می‌توان مناسبترین آغازگرهای ISSR برای مطالعه سیرهای بومی را نمونه‌های دارای توالی‌های تکراری شامل G+A و C+C و در سطحی پایین‌تر A+C پیشنهاد کرد. با وجود آنکه تعداد آلل‌های چند شکل به دست آمده در پژوهش حاضر نسبت به مطالعات مبتنی بر SSR (Jo et al., 2012) و RAPD (Paredes et al., 2008) از فراوانی مناسبی برخوردار بودند، اما تعداد آلل‌های دیده شده کمتر بود که می‌توان دلایل آن را ماهیت کمتر بودن تعداد آلل‌های شناسایی شده در نشانگر غالب ISSR نسبت به SSR که نشانگری هم‌پارز است و همچنین به دلیل طول‌تر بودن آغازگرها و بالاتر بودن سختی شرایط اتصال آنها در آزمایش^۲ نسبت به RAPD و حذف و در نظر نگرفتن اختیاری باندهای با وضوح کمتر دانست. استفاده از ژل اکریل‌امید بجای ژل آگارز و استفاده از ترکیبی از آغازگرها بجای آغازگرهای منفرد، با افزایش تعداد آلل‌ها و قدرت تفکیک آنها می‌تواند در بهره‌برداری بیشتر از نشانگر ISSR که با وجود غالب بودن از وراثت پذیری بسیار بالایی برخوردار است (Liu & Wendel, 2001) موثر باشد.

با وجود آنکه در برخی آغازگرها در محدوده ۱۰۰bp تا ۲۰۰۰ bp نیز باندهای چند شکل دیگری وجود داشت (داده‌ها نشان داده نشده است)، اما به دلیل وضوح پایین آنها و به منظور افزایش دقت، تکرارپذیری آزمون و قابلیت اعتماد به داده‌ها، با کاهش حساسیت و محدوده شناسایی باند در نرم‌افزار TotalLab، از انتخاب این داده‌ها خودداری شد. همانطور که قبلاً نیز اشاره شد، با ارزیابی اولیه الکتروفورزها نیز نتایج حاصل از آغازگرهای فاقد باند چند شکل با وضوح کافی از ادامه بررسی‌ها حذف شدند (Tn-1, Tn-2, Tn-4, Tn-5, U91, M13, Eg2.2, Eg4.3, Eg6.3). بدین ترتیب، تنها نتایج حاصل از ۱۲ آغازگر که جزئیات آنها در جدول ۳ آمده است نمره‌دهی^۱ و وارد محاسبات شدند. از این ۱۲ آغازگر چند شکل در مجموع ۹۴ آلل به دست آمد. تعداد آلل‌ها برای هر آغازگر بین ۶ تا ۱۱ با میانگین ۷/۸ متغیر بود (جدول ۳). آغازگرهای U61 و U10 با ۱۱ آلل و آغازگرهای U17 و SPAR با شش آلل به ترتیب بیشترین و کمترین آلل را تولید کردند. در شکل ۱ الگوی باندهای حاصل از آغازگر U10 به عنوان نمونه آورده شده است.

آغازگرهای مورد استفاده در نهایت، ۶۵ آلل چند شکل در جمعیت مورد مطالعه نشان دادند که میزان چندشکلی آنها بین ۳۴ تا ۹۱ درصد نوسان داشت. آغازگر U61 با ۹۱ درصد بیشترین و آغازگر U07 با ۴۴ درصد کمترین چندشکلی را نشان دادند. تفاوت در فراوانی آلل‌های شناسایی شده می‌تواند به دلیل تفاوت در فراوانی قطعات



شکل ۱- الگوی الکتروفوروزی حاصل از آغازگر U10 روی ۲۶ اکوتیپ سیر جمع آوری شده از ایران مورد مطالعه با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد (SM = شاخص طولی)

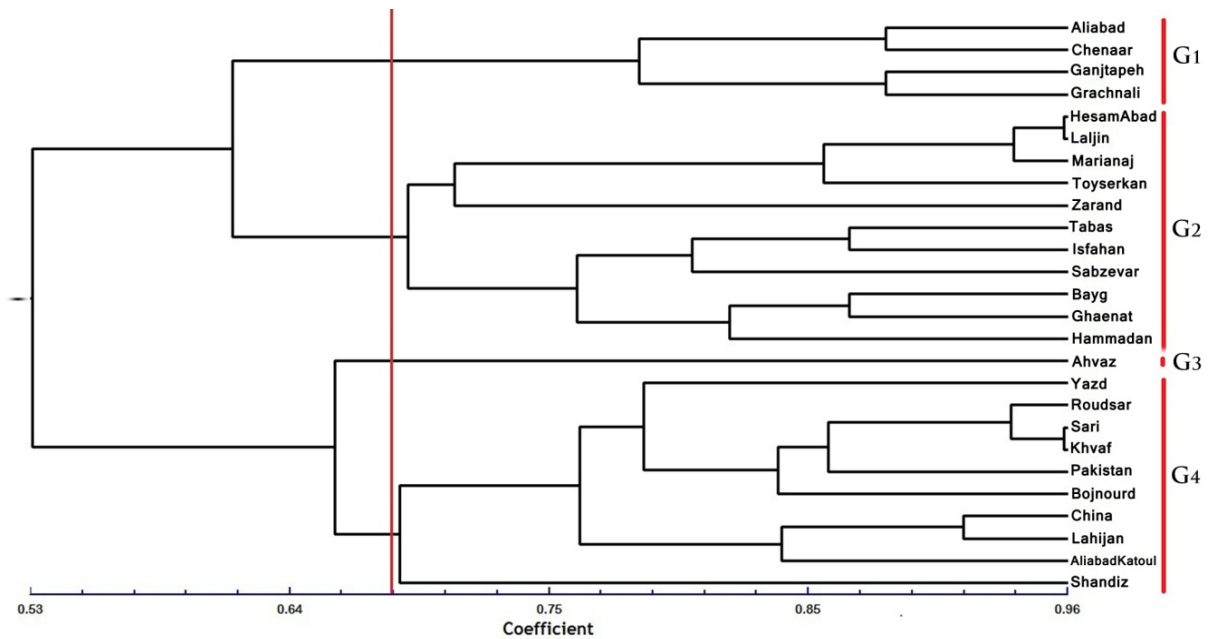
Fig.1 - 1.5% agarose gel electrophoretic pattern of U10 ISSR Primer in 26 garlic ecotypes from Iran (SM= Size Marker)

مورد مطالعه در پژوهش حاضر، در ۲۴ گروه مختلف طبقه‌بندی شدند (توده‌های حسام‌آباد و ساری به ترتیب با توده‌های لالچین و خواف در یک گروه قرار گرفتند)، بطوریکه می‌توان مدعی شد که نشانگر ISSR و آغازگرهای انتخاب و طراحی شده برای این بررسی، توانسته‌اند اکوتیپ‌های مختلف، حتی توده‌هایی با منشاء جغرافیایی بسیار نزدیک به هم را از هم تفکیک نماید، نتیجه‌ای که در پژوهش‌های مشابه اشاره‌ای به آن نشده است (Ipek et al., 2007; Paredes et al., 2008; Jo et al., 2012).

با وجود آنکه همانند بسیاری از مطالعات مشابه نمی‌توان با اطمینان زیاد، الگوی بانندی مشخصی را به عنوان شناسه هر اکوتیپ در نظر گرفت، اما همانطور که در دندروگرام (شکل ۲) مشاهده می‌شود، توده‌های جمع‌آوری شده از مناطق بوم شناختی مجاور در فاصله کمتری از هم نیز قرار گرفته‌اند. تمامی توده‌های جمع‌آوری شده از استان همدان در خوشه‌های مجاور قرار گرفتند و تنها توده متمایز از آنها نمونه جمع‌آوری شده از شهر همدان است که در خوشه‌ی مجاور نمونه‌های جنوب خراسان رضوی (ترتیب حیدریه-بایگ) و خراسان جنوبی (قائنات- زیرکوه) قرار گرفت. در مقابل پراکنده‌ترین نمونه‌ها مربوط به توده‌های جمع‌آوری شده از خراسان رضوی (شاندیز، خواف، بایگ) بودند، به طوری‌که توده شاندیز آن با تفاوت زیاد از بقیه نمونه‌ها در شاخه‌ای مجزا قرار گرفت. نمونه زرنند کرمان نیز به خوشه نمونه‌های غرب و جنوب غرب همدان نزدیکتر بود. متفاوت‌ترین توده از بین نمونه‌های مورد بررسی سیرهای جمع‌آوری شده از اهواز بودند که در یک شاخه مجزا قرار گرفتند و بر اساس فنوتیپ بسیار متفاوت آن (از نظر مقطع طولی و رنگ پوست خارجی- داده‌ها نشان داده نشده است) نیز قابل انتظار بود. در صورت در نظر گرفتن خط مرجعی در سطح تشابه ۰/۶۹ دندروگرام، چهار خوشه متفاوت به دست می‌آید بطوریکه پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها را در چهار گروه قرار می‌دهد (شکل‌های ۲ و ۳).

علاوه بر تعداد آل‌های شناسایی شده و درصد آل‌های چند شکل، میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) هر آغازگر نیز محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۳ آمده است. PIC که در واقع بیانگر ارزش یک نشانگر برای تشخیص چندشکلی در یک جمعیت می‌باشد، بر اساس تعداد آل‌های شناسایی شده و نحوه پراکنش آنها در جمعیت محاسبه می‌گردد و در حال حاضر به عنوان پرکاربردترین آماره ارزشیابی نشانگرها شناخته می‌شود (Nagy et al., 2012). میانگین PIC آغازگرهای مورد آزمون در این پژوهش ۰/۴۲ بود که با توجه به اینکه حداکثر PIC در نشانگرهای غالب ۰/۵ است (Nagy et al., 2012) نشانه‌ای بر این است که مجموعه آغازگرهای انتخاب شده پراکندگی مناسبی در ژنوم جمعیت مورد بررسی داشته‌اند. با توجه به PIC هر یک از آغازگرها که در جدول ۳ نیز آمده است، بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای U9، U10 و U61 (۰/۴۸) و کمترین آن (۰/۲۸) مربوط به آغازگر Eg10.6 بود بدین مفهوم که آغازگرهای U9، U10 و U61 با دارا بودن حداکثر پراکندگی آلی بین نمونه‌ها بهتر از سایر آغازگرها فاصله ژنتیکی را معلوم کرده و می‌توانند در مطالعات بعدی به عنوان آغازگرهایی با توان بالای تعیین تنوع مورد بهره‌برداری قرار گیرند.

شباهت ژنتیکی بین توده‌های جغرافیایی (اکوتیپ‌ها) نیز با استفاده از ضریب تشابه Jaccard محاسبه گردید که بر اساس آن بیشترین فاصله ژنتیکی تعیین شده بین توده‌های جمع‌آوری شده از لالچین (همدان) و علی‌آباد کتول (گلستان) با ضریب تشابه ۰/۴۳ و بیشترین تشابه ژنتیکی نیز بین توده‌های ساری (مازندران) و خواف (خراسان رضوی) و همچنین بین توده‌های حسام‌آباد و لالچین (همدان) با ضریب تشابه ۰/۹۵۸ مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده است). گروه‌بندی نمونه‌ها نیز بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده و روش UPGMA صورت پذیرفت که دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای آن در شکل ۲ آمده است. بر اساس آن ۲۶ توده جغرافیایی (اکوتیپ)



شکل ۲- دندروگرام و گروه‌گرام و گروه‌های حاصل از روابط ژنتیکی ۲۶ اکوتیپ سیر جمع‌آوری شده در ایران با استفاده از نرم افزار NTSYSpc v2.02 بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard در سطح ۰/۶۹ روی داده‌های حاصل از نشانگر ISSR
Fig. 2 - Dendrogram of genetic relationships among 26 garlic ecotype from Iran according to ISSR marker generated by NTSYSpc v2.02 according to UPGMA cluster analysis and Jaccard's coefficient similarity of 0.69

سیرهای ایران، با گزارش‌های حاصل از مطالعات جاپس و همکاران (Jabbes et al., 2011) در مورد سیرهای تونسی و توده‌های متنوع سیر در شیلی (Paredes et al., 2007) انطباق کامل دارد. همانطور که اشاره شد جهت توسعه زمینه مطالعه حاضر، دو توده تجاری وارداتی (چینی و پاکستانی) نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه چینی و توده لاهیجان با تشابه ۹۱/۶ درصد و نمونه پاکستانی و توده‌های جمع‌آوری شده از شمال و شرق ایران (رودسر، ساری و خواف) با ضرایب تشابه بین ۸۴ تا ۸۸ درصد در یک گروه قرار گرفتند. این همگروهی می‌تواند به دلیل یکسان بودن منشأ این توده‌ها و شناخته شدن آنها با اسامی مختلف در مقصدهای متفاوت بخاطر عدم وجود طبقه‌بندی رسمی بین توده‌های سیر باشد.

همانطور که اشاره شد نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش از مناطق عمده تولید سیر جمع‌آوری شده بودند که نتایج، وجود تفاوت ژنتیکی معنا داری را در کنار تفاوت‌های فنوتیپی مرسوم در طبقه‌بندی همانند رنگ پوست خارجی (بنفش، سفید، قرمز، کرم-بنفش و سفید-بنفش)، تعداد سیرچه‌ها تشکیل‌دهنده هر سیر و شکل مقاطع طولی و عرضی آنها، اثبات می‌کند. با وجود آنکه نشانگر و آغازگرهای مورد استفاده توده‌های مختلف از هم تفکیک شدند، اما به دلیل فقدان یک طبقه‌بندی معتبر گزارش شده بر اساس صفات مهم فیزیولوژیک، مورفولوژیک یا زراعی، قابلیت تفسیر و بررسی ارتباط بین تفاوت‌های ژنتیکی و فنوتیپی وجود نداشت، اما از طرفی، با توجه به تأیید این مطلب که شرایط محیطی به شدت بر صفات فنوتیپی سیر تأثیرگذار

گروه اول شامل توده‌های جمع‌آوری شده از شمال و شمال غرب همدان (G₁ شکل‌های ۲ و ۳)؛ گروه دوم شامل اکوتیپ‌های پراکنده در غرب و جنوب غرب استان همدان، مناطق مرکزی، شرق و جنوب شرق ایران (G₂ شکل‌های ۲ و ۳)؛ گروه سوم توده جمع‌آوری شده از اهواز (G₃ شکل‌های ۲ و ۳) و گروه چهارم از شمال و شمال شرقی کشور (G₄ شکل‌های ۲ و ۳).

قرارگرفتن نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف در خوشه‌های یکسان می‌تواند نشانه‌ای از تبادلات فیزیکی بین مناطق جغرافیایی مختلف یا تشابه ژنتیکی بین نمونه‌ها باشد. نمونه قابل توجه آن قرارگیری توده جمع‌آوری شده از شهر یزد و شهر همدان به ترتیب در گروه چهارم (G₄) و گروه دوم (G₂) است که به دلیل زراعت سنتی تفسیر آن بر اساس تبادلات فیزیکی نسبت به تشابه ژنتیکی توجیه‌پذیری بیشتری دارد.

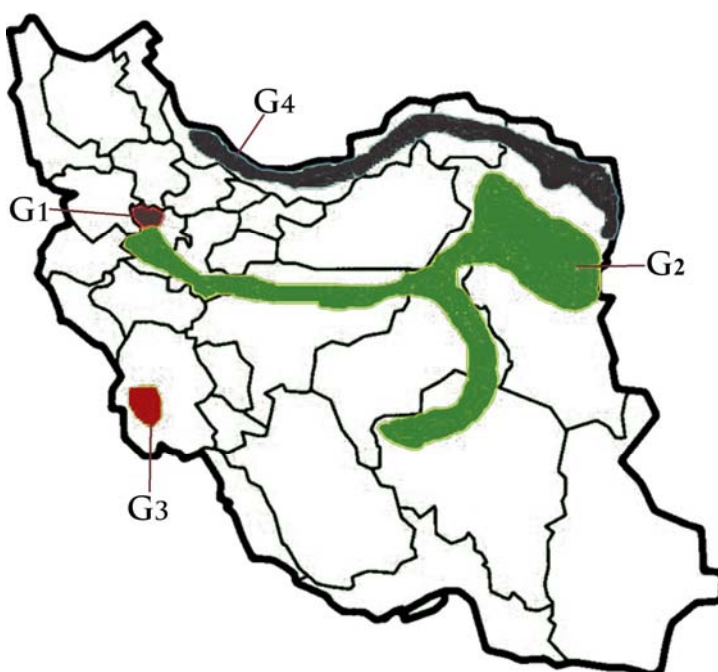
بر اساس نتایج بخش دوم این پژوهش نشان داده شد که تنوع ژنتیکی درون توده‌های مورد مطالعه بسیار کمتر از تنوع بین توده‌ای بود. بطوریکه تنها یک نمونه از بین توده شاندیز به وسیله آغازگر Tun-3 یک باند متفاوت نشان داد. این مشاهده علاوه بر اثبات نبود اختلاط فیزیکی درون توده‌ها به دلیل تکثیر کاملاً غیرجنسی سیر قابل انتصاب به جهش‌های تصادفی و حفظ آنها به دلیل بی‌اثر بودن بر صفات فنوتیپی مدنظر کشاورزان و یا پایین بودن فشار انتخاب آنها دانست. به همین دلیل توده‌های مورد مطالعه، خالص فرض شده و در ادامه مراحل تفسیری در نظر گرفته نشدند. این نتیجه‌گیری راجع به

ارتباطات ژنتیکی روی اکوتیپ‌های موجود در ایران است می‌توان با امتداد بررسی‌ها روی جمعیتی بزرگتر، با استفاده از آغازگرهای بیشتر با توالی‌های جدید یا متشکل از قطعات تکراری انتخاب شده بر اساس نتایج این بررسی و یا با ترکیب آغازگرهای انتخاب شده به الگوی نشانگری اشباع‌تری دست پیدا کرد و با استفاده از آنها به منظور شناسایی توده‌های تکراری در کلکسیون‌های موجود و با توجه به اهمیت سیر در صنعت، طب سنتی و نوین، اهمیت شناسایی و حفظ تنوع در پژوهش‌های به‌نژادی و توسعه به‌زراعی، وجود ایران در مرکز تنوع سیر و جنس *Allium*، خطر جایگزینی سیرهای وارداتی با توده‌های بومی و در نتیجه لزوم تأسیس یک مرکز ملی و بانک ژنتیکی به منظور جمع‌آوری و حفظ توده‌های سیر اقدام نمود.

است؛ به طوریکه تغییر موقعیت جغرافیایی می‌تواند بر باروری، عملکرد و کیفیت محصول آن نیز تأثیر بگذارد (Kamenetsky, 2007)، می‌توان از این تنوع ژنتیکی اثبات شده در کنار تنوع اقلیمی کم نظیر موجود در کشور استفاده کرد و با آزمون‌های منطقه‌ای پاسخ‌های فنوتیپی توده‌های بومی در اقلیم‌های مختلف، علاوه بر یافتن بهترین محیط برای هر توده به یافتن صفات خاص از جمله قابلیت باروری و تولید بذر نیز خوش بین بود.

نتیجه‌گیری

در نهایت، با توجه به اینکه پژوهش حاضر اولین گزارش از کاربرد نشانگر ISSR و توالی‌های M13 در بررسی تنوع، پراکندگی و



شکل ۳- نحوه پراکندگی اکوتیپ‌های سیر موجود در ایران در چهار گروه حاصل از تقسیم بندی دندروگرام به دست آمده در سطح تشابه ۰/۶۹
 Fig. 3- Distribution of 4 groups of garlic ecotypes from Iran according to dividing dendrogram 2 by a reference line at 0.69 similarity coefficient

منابع

- 1- Camargo, A.B., Resnizky, R., Marchevsky, E.J., and Luco, J.M. 2010. Use of the Argentinean garlic (*Allium sativum* L.) germplasm mineral profile for determining geographic origin. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 586-591.
- 2- Cunha, C.P., Hoogerheide, E.S.S., Zucchi, M.I., Monteiro, M., and Pinheiro, B. 2012. New Microsatellite Markers for Garlic, *Allium sativum* L. (Alliaceae). *American Journal of Botany* 99 (1): e17-e19.
- 3- Guenaoui, C., Mang, S., Figliuolo, G., and Neffati, M. 2012. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Published on line 24, March 2012.
- 4- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., and Owen, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89(8,9): 998-1006.
- 5- Haji, K., Naghavi, M.R., Taleii, A.R., and Aghaii, M.J. 2011. Evaluation of genetic diversity of *Aegilops tauschii* from Northern area of Iran using SSR markers. *Iranian Journal of Biology* 24(3): 390-399.

- 6- Haouari, M., and Ferchichi, A. 2008. Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7(1): 44-50.
- 7- Hashemi, M., Amirinia, S., Harki Nejad, M.T., and Banabazi, M.H. 2012. Evaluation of ancestor of some Holstein cows using florsent Taged microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Science Research* 4(2): 154-158 (In Persian).
- 8- Ipek, M., Ipek, A., and Simon, P.W. 2008. Molecular characterization of kastamonu garlic: an economically important garlic clone in Turkey. *Scientia Horticulturae* 115(2): 203-208.
- 9- Jabbes, N., Geoffriau, E., Clerc, V., Dridi, B., and Hannechi, C. 2011. Inter Simple Sequence Repeat Fingerprints for Assess Genetic Diversity of Tunisian Garlic Populations. *Journal of Agricultural Science* 3(4): 77-85.
- 10- Jo, M.H., Ham, I.K., Moe, K.T., Kwon, S.W., Lu, F.H., Park, Y.J., Kim, W.S., Won, M.K., Kim, T.I., and Lee, E.M. 2012. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) using SSR markers. *Australian Journal of Crop Science* 6(4): 625-631.
- 11- Kamenetsky, R. 2007. Garlic: botany and horticulture. *Horticultural Reviews* 33: 123-172.
- 12- Khadari, B., Hochu, I., Santoni, S., Oukabli, A., Ater, M., Roger J.P., and Kjellberg, F. 2003. Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. *Acta Horticulturae* 605: 69-75.
- 13- Lampasona, S.G., Asprelli, P., and Burba, J.L. 2012. Genetic analysis of a garlic (*Allium sativum* L.) germplasm collection from Argentina. *Scientia Horticulturae* 138: 183-189.
- 14- Lampasona, S.G., Martinez, L., and Burba, J.L. 2003. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Euphytica* 132: 115-119.
- 15- Liu, B., and Wendel, J.F. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1: 205-208.
- 16- Mousavi, S.R., Ahmadi, J., and Sefidcon, F. 2012. Genetic diversity analysis in Iranian St. John's wort accessions (*Hypericum perforatum* L.) using inter simple sequence repeats markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 20(1): 14-24. (In Persian with English Summary)
- 17- Nagy, S., Poczai, P., Cernak, I., Mousapour Gorji, A., Hegedus, G., Taller, J. 2012. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics* 50: 670-672.
- 18- Paredes, M.C., Viviana B.V., Maria, I., and González, A. 2008. Low genetic diversity among garlic (*Allium sativum* L.) accessions detected using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Chilean Journal of Agricultural Research* 68(1):3-12.
- 19- Reddy, M.P., Sarla, N., and Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- 20- Ryskov, A.P., Jincharadze, A.G., Prosnjak, M.I., Ivanov, P.L., and Limborska, S.A. 1988. M₁₃ phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Letters* 233(2): 388-392.
- 21- Son, J.H., Park, K.C., Kim, T.W., Park, Y.J., Kang, J.H., and Kim, N.S. 2010. Sequence diversification of 45S rRNA ITS, trnH-psbA spacer, and *matK* genic regions in several *Allium* species. *Genes and Genomics* 32: 165-172.
- 22- Upcroft P., Mitchell, R., and Boreham, P.F.L. 1990. DNA fingerprinting of the intestinal parasite giardia duodenalis with the M13 phage genome. *International Journal of Parasitology* 20(3): 319-323.
- 23- Westneat, D.F. 1990. Genetic parentage in the indigo bunting: a study using DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 27: 67-76.
- 24- Witono, J.R., and Kondo, K. 2006. Genetic analysis of some species of pinanga (Palmae) by using ISSR markers. *Berita Biologi* 8: 19- 26.
- 25- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20(2):176-83