University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Genetic Analysis of Chemical Components Related to Oxalate Accumulation in Spinach Through Diallel Cross

Seyed Fazel Mirahmadi [1], Mohammadreza Hassandokht[2]✉, Mohammad Reza Fattahi Moghaddam[3], Mohammad Reza Naghavi[4], Karamatollah Rezaee[5]

1. Department of Horticulture and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran, Department of Agriculture and Natural Resources, Velayat University, Iranshahr, Iran. E-mail: f.mirahmadi@velayat.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Horticulture and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mrhassan@ut.ac.ir
3. Department of Horticultural Sciences and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: fattahi@ut.ac.ir
4. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mnaghavi@ut.ac.ir
5. Department of Food Science, Engineering and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: krezaee@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 20 June 2018

Received: 14 April 2019

Accepted: 10 June 2019

Published online: 22 June 2023

Keywords:

GCA and SCA,

narrow and broad sense heritability,

reciprocal effects..

ABSTRACT

Spinach is one of the most important vegetables consumed in the world. Despite spinach high nutritional value, the accumulation of non-nutritive compound oxalate is considered one of the main challenges in the production of this plant. Moving towards the production of cultivars of this plant that have less oxalate accumulation, or a neuter form of oxalate accumulation in terms of nutritional hygiene, is considered one of the modern breeding goals. The present study was conducted with the aim of introducing and explaining the action of genes involved in creating the total oxalate accumulation trait in the form of a 7x7 complete diallel cross. Heritability of total, soluble and insoluble oxalate, and ascorbic acid as the main components in oxalate accumulation were evaluated using the first method of model I of Griffing's. In addition to confirming the possibility of successful interspecific crosses in spinach, the obtained results showed that total oxalate was controlled by genetic factors by more than 50%, and the possibility of its improvement in the next first generations after applying breeding methods is certain. Ultimately, based on the obtained Baker's coefficient results (0.43), both of the gene actions, additional and dominance, are almost equally effective in creating this trait, although the tendency towards dominance is more. Hence, it can be concluded that the approach towards modification through hybridization, in order to produce new cultivars, is preferred to modification by selection methods.

Cite this article: Mirahmadi, S. F., Hassandokht, M. R., Fattahi Moghaddam, M. R., Naghavi, M. R., & Rezaee, K., A. (2023). Genetic Analysis of Chemical Components Related to Oxalate Accumulation in Spinach through Diallel Cross. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 54 (2), 321-339. DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.355310.2090

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.355310.2090

Extended Abstract

Introduction

Spinach, one of the most popular leafy vegetables in the world, belongs to the Chenopodiaceae family, and in spite of having high economic value and many nutritional benefits, is classified as one of the high oxalate accumulating agricultural crops. Oxalate is a non-nutritive chemical compound that has harmful effects related to kidney stone diseases. Most of these adverse effects are the result of consuming the soluble form of oxalate. On the other hand, this chemical composition has an undeniable biological role on the biological functions of spinach. Therefore, considering these issues and the approach of improving agricultural products to increase nutritional value, it is inevitable to produce new varieties of spinach that have less oxalate accumulation or a non-harmful accumulation of this compound. The presence of both domesticated populations and wide species of spinach in Iran, the most significant source of this plant, make it possible to modify traits related to oxalate

accumulation. Therefore, finding the mechanism of action of the genes involved in the accumulation of oxalate in spinach plants was considered the first step in the implementation of future breeding projects for this trait.

Material and Methods

In order to achieve the objectives of this research, a complete seven by seven diallel cross experiment was conducted using selected cultivars and wild related species (*Spinacia tukestanica* and *S. tetrandra*) that possessed different patterns of oxalate accumulation. These patterns were divided into three groups: low oxalate, high insoluble oxalate, and high soluble oxalate. High-performance liquid chromatography was used to measure total and soluble oxalate, while ascorbic acid was measured through a colorimetric method by a spectrophotometer device. The genetic variance components of four chemical compounds including total, soluble and insoluble oxalate, as well as ascorbic acid as the most important components in creating oxalate accumulation were estimated in 49 progenies, obtained from the crossing of spinach plants. The estimations were based on the variances of general and specific combinability using the first method of the Griffing's model one. The narrow and broad sense heritability and also Baker's coefficient, were calculated. Baker's index was known as an indicator to estimate the action mechanism of the genes. The values of this index are between zero and one. The numerical valued that are close to one indicate additive action, while values that are close to zero indicate non-additive action or dominance and epistasis actions.

Results

As a general rule, the possibility of interspecies crosses in spinach was confirmed due to the same chromosomal level (2n=12) in all three species. The results of analysis of variance of the diallel cross showed the existence of significant differences for all four evaluated chemical compounds. This meant that the diallel crossings confirmed the possibility of genetic analysis based on this method. Also, the effects of GCA, SCA, the reciprocal crosses and type of maternal on mean values of all evaluated chemical compounds were significant. The highest variance of general and specific combinability and Baker's coefficient value (0.43) were achieved for the total oxalate trait. The greatest narrow and broad sense heritability was obtained with values of 0.46 and 0.57, respectively, for this trait.

Discussion

Due to the greater contribution of genetic variance in the creation of total oxalate, it can be comprehended that it is possible to modify the total oxalate trait in the early breeding generations. Also considering the mentioned Baker's coefficient, both the additive and dominance/epistasis genes actions play a role in creating this trait, although the trend is more towards the effect of relative dominance. Therefore, modification of new spinach varieties based on hybridization methods and then selection in the first generations after hybridization is recommended. The second trait with the highest probability of occurrence in the generations after breeding was the insoluble oxalate followed by soluble oxalate. However, due to the very low narrow sense heritability (0.33), soluble oxalate is not recommended as a proper breeding trait for improving oxalate accumulation in spinach. Finally, the lowest narrow-sense heritability (0.32) was estimated for the ascorbic acid trait as one of the precursors of oxalate production, especially its insoluble form. So, it can be said that the role of ascorbic acid in improving oxalate accumulation in spinach plants is practically ruled out.

Conclusion

In this research, the gene action mechanisms involved in the formation of four essential compounds during the oxalate accumulation process in spinach were determined. Therefore, the modification of new varieties of this plant in terms of not having oxalic acid anti-nutrient problems by hybridization methods and then selection in the first generations is recommended.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

تجزیه ژنتیکی اجزای شیمیایی مرتبط با انباشت اکسالات در اسفناج از طریق تلاقی دای‌آلل

سید فاضل میراحمدی[۱] | محمدرضا حسندخت[۲] ✉ | محمدرضا فتاحی مقدم[۳] | محمدرضا نقوی[۴] | کرامت اله رضایی[۵]

۱. گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران؛ گروه کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ولایت، ایرانشهر، ایران. رایانامه: f.mirahmadi@velayat.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mrhassan@ut.ac.ir

۳. گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: fattahi@ut.ac.ir

۴. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mnaghavi@ut.ac.ir

۵. گروه علوم و مهندسی صنایع غذائی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: krezaee@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

کلیدواژه‌ها:
اثرات برگشتی، ترکیب‌پذیری عمومی و خصوصی، وراثت‌پذیری عمومی و خصوصی.

چکیده

اسفناج سبزی برگی فصل خنک و یکی از مهمترین سبزی‌های مورد مصرف در دنیاست. علی رغم ارزش غذایی بالایی که این گیاه دارد انباشت ترکیب غیرمغذی اکسالات به عنوان یکی از چالش‌های اساسی در تولید این گیاه به حساب می آید. حرکت به سوی تولید ارقامی از این گیاه که انباشت اکسالات کمتر و یا الگوی تجمعی اکسالات غیر مضر دارند به عنوان یکی از اهداف به‌نژادی نوین مورد توجه می باشد. پژوهش حاضر با هدف معرفی و توضیح عمل ژن‌های دخیل در ایجاد صفت انباشت اکسالات کل در قالب آزمایش دای‌آلل کامل ۷×۷ انجام گردید. وراثت پذیری اکسالات کل، محلول و غیر محلول، و اسکوربیک اسید به عنوان اجزای اصلی در انباشت اکسالات با استفاده از روش اول مدل نخست گریفینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده، علاوه بر تأیید امکان تلاقی‌های بین گونه‌ای موفق در گیاه اسفناج نشان دادند که اکسالات کل به مقدار بیش از ۵۰ درصد توسط عوامل وراثتی کنترل شده، و به‌نژادی آن در طی نسل‌های آتی پس از اعمال روش‌های اصلاحی قطعی است. در نهایت بر اساس ضریب بیکر به دست آمده (۰/۴۳) برای این صفت، هر دو عمل افزایش و غالبیت در ایجاد این صفت تقریباً به یک میزان موثر هستند، هرچند تمایل به سمت غالبیت بیشتر می باشد. بدین ترتیب، می توان نتیجه گرفت که رویکرد به سمت به‌نژادی از طریق دورگ‌گیری به منظور تولید ارقام جدید بر به‌نژادی مبتنی بر گزینش ارجح می‌باشد.

استناد: میراحمدی، سیدفاضل؛ حسندخت، محمدرضا؛ فتاحی مقدم، محمدرضا؛ نقوی، محمدرضا؛ و رضایی، کرامت‌اله (۱۴۰۲). تجزیه ژنتیکی اجزای شیمیایی مرتبط با انباشت اکسالات در اسفناج از طریق تلاقی دای‌آلل. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۴ (۲)، ۳۳۹-۳۲۱. DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.355310.2090

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJHS.2023.355310.2090

مقدمه

گیاه اسفناج متعلق به تیره Chenopodiaceae ، دارای یک گونه اهلی به نام *Spinacia oleracea* L. و دو گونه وحشی شناخته شده به نام‌های *S. turkestanica* Iljin و *S. tetrandra* Steven ex M. Bieb. در دنیا می‌باشد. گونه‌های وحشی این گیاه عموماً در نواحی آسیای میانه و غرب آسیا پراکنش دارند. گونه *S. turkestanica* در ترکمنستان، ازبکستان، قزاقستان، افغانستان، نواحی شمال شرق ایران و گونه *S. tetrandra* در ناحیه قفقاز، ارمنستان، ایران، عراق و ترکیه یافت می‌شود (Astley & Ford-Lloyd, 1981). لازم به توضیح می‌باشد که بنابر مطالعات مختلف خاستگاه اصلی اسفناج اهلی امروزی آسیای مرکزی و ایران معرفی شده است به طوری که وقتی این گیاه برای اولین بار ۶۰۰ سال بعد از میلاد از ایران به چین انتقال یافت آنرا گیاه سرزمین پرشیا می نامیدند (Decoteau, 2000; Nonnecke, 1989; Ryder, 1979; Swiader *et al*., 1992).

تا به امروز مهمترین اهداف به‌نژادی در اسفناج، عملکرد بالا، کیفیت مطلوب برگ، برگ های سبز و یکنواخت و مقاومت به بیماری های مهم مانند سفیدک دروغین و بیماری های ویروسی، زودرسی و دیرگلدهی معرفی شده است. علاوه بر این، ایجاد لاین‌هایی با برگ‌های ایستاده که این ویژگی خود تابعی از تولید دمبرگ‌های کوتاه می‌باشد، جهت برداشت ماشینی است، ارقامی با تجمع کمتری از نیترات و مقاوم به یخ زدگی از دیگر اهدافی اصلاح اسفناج می باشند (Kalloo & Bergh, 2012). اما اخیراً با گرایشی که پژوهش‌ها در زمینه به‌نژادی گیاهان در جهت بهبود ارزش تغذیه‌ای محصولات باغبانی داشته است تولید ارقام اسفناج با تجمع اکسالات کم بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Andersen & Torp, 2011).

در همین راستا یکی از نخستین گام‌ها در جهت به‌نژادی صفات مورد نظر در گیاهان، بررسی نحوه عمل ژن‌های دخیل در آن صفت و در نتیجه اتخاذ روش به‌نژادی مناسب می‌باشد. اثر ژن‌ها در کنترل یک صفت می‌تواند به شکل‌های مختلف خود را نشان دهد. عمدتاً عمل ژن‌ها به دو صورت افزایشی و غیر افزایشی (غالبیت، فوق غالبیت و اپیستازی) بروز می کند که اثر افزایشی بیشترین نقش را در وراثت‌پذیری یک صفت دارد و دو عمل دیگر در بروز پدیده هتروزیس دخالت دارند (Sharma *et al*., 2003). بر این اساس هرچه عمل افزایشی ژن بیشتر باشد بازدهی آن صفت در پاسخ به گزینش بیشتر است. از دگرسو اثر غالبیت و فوق غالبیت را نیز می‌توان در تولید ارقام دورگ به منظور استفاده از هتروزیس به‌کار برد (Cornelius & Dudley, 1976).

اکسالات موجود در اسفناج با فرمول شیمیایی $(COO)_2^{-2}$ به شکل نمک‌ها یا استرهای اسید اکسالیک و به دو فرم محلول و غیر محلول دیده می‌شود. از این میان بیشترین اثرات سوء تغذیه‌ای اکسالات توسط فرم محلول این ماده ایجاد می‌شود که عمدتاً به صورت نمک های سدیم و پتاسیم وجود دارند و به آسانی از طریق روده جذب و وارد جریان خون می‌گردند. اکسالات محلول جذب شده، در سیستم دفع اداری تجمع یافته و آزادانه با کلسیم موجود در کلیه ترکیب شده و به فرم نامحلول تبدیل می‌شود که در صورت رسوب در این عضو، منجر به عارضه سنگ کلیه خواهد شد. بنابراین مصرف زیاد غذاهای حاوی مقادیر بالای اکسالات ریسک ابتلا به بیماری‌های کلیوی و نیز بیماری‌های گوارشی مرتبط را در انسان و به خصوص در افراد دارای زمینه ژنتیکی حساسیت به مصرف خارجی اکسالات افزایش خواهد داد (Bsc & Bsc, 1999; Elder & Wyngaarden, 1960; Hatch & Freel, 2005; Holmes *et al*., 2001; Holmes & Kennedy, 2000; Svedružić *et al*., 2005). اما علیرغم خواص ضد تغذیه‌ای بیان شده، اسید اکسالیک دارای عملکردهای بیولوژیک مهمی در گیاهان نیز می‌باشد که در این بین تنظیم کلسیم در سلول گیاه (Borchert, 1985; Borchert, 1986; Franceschi, 1989; Zindler-Frank, 1975)، حفاظت گیاه در برابر علف‌خوارها (Korth *et al*., 2006; Ruiz *et al*., 2002; Saltz & Ward, 2000)، محافظت و پاسخ دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها، استحکام بافت گیاهی، جمع‌کنندگی طیف نوری، حفظ تعادل یونی سلول (Franceschi & Nakata, 2005; Nakata, 2012; *Zhang et al*., 2013)، محافظت از سلول در برابر تجمع فلزات سنگین از طریق غیر سمی کردن آنها به وسیله ایجاد کمپلکس‌های متال‌اکسالات مانند اکسالات آلومینیوم (Franceschi & Nakata, 2005; Klug & Horst, 2010; Kochian, 1995; Ma

et al., 2001) و حمایت فتوسنتزی از طریق انعکاس داخلی یا خارجی (Kuo-Huang *et al.*, 2007) طیف نوری از جمله نقش‌های بیولوژیک اسید اکسالیک در گیاهان می‌باشد.

بنابراین، حفظ اثرات بیولوژیک اکسالات در گیاه اسفناج و رفع یا کاهش اثر مشکلات سوء تغذیه‌ای آن با تولید ارقامی از اسفناج که دارای تجمع پایین‌تری از این ترکیب یا دارای تعادل تولید اکسالات کل به سمت اکسالات نامحلول باشد به عنوان یک نیاز به‌نژادی غیرقابل انکار در این گیاه مطرح است. جهت نیل به این هدف، اطلاع از عمل ژن‌ها در تولید و تجمع اکسالات کل و فرم‌های محلول و غیر محلول آن و نیز آسکوربیک اسید به عنوان یکی از پیش‌ماده‌های اساسی تولید اکسالات، نخستین گام موثر در برنامه‌ریزی به منظور انتخاب بهترین روش‌های به‌نژادی این گیاه جهت تولید ارقام جدید آن با رویکرد توضیح داده شده می‌باشد. تاکنون گزارشی از انجام تلاقی دای‌آلل به منظور تخمین پارامترهای واریانس ژنتیکی مرتبط با صفت تجمع اکسالات در گیاه اسفناج یا هر گیاه دیگری گزارش نشده است بر این اساس نویسندگان این مقاله در پژوهشی اصلاحی از طریق تلاقی‌های کنترل شده دای آلل در بین جمعیت‌های منتخب اسفناج، به دنبال پاسخ به سوالات بالا برآمدند.

پیشینه پژوهش

از تلاقی دای‌آلل به‌عنوان بهترین رویکرد موجود جهت برآورد ترکیب‌پذیری عمومی و خصوصی بین والدین احتمالی طی برنامه‌های به‌نژادی نام برده شده است. از آنجا که این دو کمیت امکان شناخت عمل ژن‌ها (انحراف غالبیت از مدل افزایشی) و تاثیر آن بر به وجود آمدن صفات مختلف را برای به‌نژادگران فراهم می‌آورد، بنابراین استفاده از روشی که بتواند امکان تخمین این دو کمیت را با دقت و سرعت بالاتری برای اصلاحگران فراهم نماید در اولویت استفاده است (Chukwu *et al*., 2016).

هرچند تاکنون گزارشی از انجام تلاقی دای‌آلل به منظور تخمین پارامترهای واریانس ژنتیکی مرتبط با صفت تجمع اکسالات در گیاه اسفناج یا هر گیاه دیگری گزارش نشده است، اما نمونه‌های خوبی وجود دارد که استفاده از این روش را جهت تخمین پارامترهای ژنتیکی مرتبط با صفت تجمع ترکیبات بیوشیمیایی در گیاهان گزارش نموده‌اند.

بررسی تلاقی دی الل ناقص ۷×۷ در لوبیا چشم بلبلی نشان داده است که درکنترل ژنتیکی پلی‌فنل‌ها، فیتات‌ها و تانن‌ها اثر غالبیت بیش از اثر افزایشی ژن‌ها است. بنابراین می‌توان جهت بهبود این صفات از انتخاب در نسل‌های اولیه بعد از تلاقی کنترل شده استفاده نمود. همچنین ژن‌های کنترل کننده این صفات میزان تولید آنها را در دانه لوبیا چشم بلبلی از طریق اثر غالبیت در نتاج هیبرید کاهش می‌دهد (Maina *et al*., 2015).

تخمین نحوه‌ی وراثت بتاکاروتن و عملکرد غده در سیب‌زمینی شیرین، با استفاده از یک تلاقی دای‌آلل ۵×۵، نشان داده است که محتوای بتاکارتن در غده گیاه متأثر از اثر افزایشی و غیر افزایشی ژن‌های تعیین کننده آن است. تخمین ترکیب پذیری‌های عمومی و خصوصی با استفاده از روش دوم مدل اول گریفینگ نیز حاکی از آن بود که عملکرد غده به شدت تحت تاثیر محیط قرار داشت. علاوه بر این در بین تلاقی‌های انجام شده هیبریدی با محتوای بالای بتا کارتن و عملکرد بالا بدست آمد (Mbusa Héritier *et al*., 2019).

تجزیه دای‌آلل دای‌آلل کامل ۵×۵ برای شناخت عمل ژن‌ها در وراثت ترکیب آلکالوئیدی کاپسایسینوئید در فلفل باکاتوم، بر اثر افزایشی ژن در کنترل مقدار این ترکیب دلالت داشت (Gomes *et al*., 2021). به طور مشابهی این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Naresh *et al*.(2016) در مورد ترکیبات مغذی و طعم دهنده کاپسایسین و دی هیدرو کاپسایسین در فلفل چیلی تطابق داشت. در مطالعه اخیر نیز که با استفاده از آنالیز دای‌آلل انجام شده بود اثر افزایشی ژن ها در توارث این صفت گزارش گردید.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی و طراحی آزمایش

به منظور برآورد پارامترهای واریانس ژنتیکی و نحوه عمل ژن‌های کنترل کننده صفات کمی انباشت اکسالات کل، اکسالات محلول، اکسالات غیرمحلول و اسید اسکوربیک، آزمایش دای‌آللی با استفاده از هفت جمعیت منتخب، که بهترین نماینده از تیپ‌های مختلف بیوسنتزی اکسالات مشاهده شده در این پژوهش بودند طراحی گردید (جدول ۱). این آزمایش در پاییز و زمستان سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج انجام گرفت. در سال نخست تلاقی‌های دای‌آلل انجام شد و در سال بعد دورگ‌های بدست آمده به منظور ارزیابی صفات اشاره شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار کشت شدند.

جدول ۱. والدین مورد استفاده در تلاقی‌های دای‌آلل اسفناج و ویژگی متمایز کننده آنها

علامت اختصاری	نام جمعیت	گونه والد	ویژگی متمایز کننده
P1	کرج	***Spinacia oleracea***	تیپ ۱: اکسالات پایین
P2	کنگرلو	***S. tetrandra***	تیپ ۱: اکسالات پایین
P3	بجنورد	***S. turkestanica***	تیپ ۱: اکسالات پایین
P4	گرگان	***S. oleracea***	تیپ ۲: اکسالات بالا–محلول
P5	اردبیل	***S. tetrandra***	تیپ ۲: اکسالات بالا–محلول
P6	ایرانشهر ۳	***S. oleracea***	تیپ ۳: اکسالات بالا–نامحلول
P7	بزنگان	***S. turkestanica***	تیپ ۳: اکسالات بالا–نامحلول

دورگ‌گیری

به منظور اجرای گرده افشانی در مرحله گلدهی به محض مشاهده پایه ماده، گیاه مورد نظر با استفاده از پاکت ساخته شده از کاغذ آشپزی یا کاغذ روغنی کالک ایزوله گردید (شکل ۱). بازدید از گلخانه به صورت روزانه و حداقل در دو مرحله انجام شد تا از تلاقی ناخواسته جلوگیری شود. به منظور انجام تلاقی هر پایه ماده در چند مرحله مطابق با نقشه موجود برای تلاقی دای‌آلل با استفاده از گرده تازه خوشه گل گیاهان نر و پس از آن با روش پاشش دانه گرده از طریق ضربه به کاغذ حاوی دانه گرده، گرده افشانی شد. در پایان تعداد ۴۹ ترکیب (۲۱ نتاج F1، ۲۱ نتاج تلاقی معکوس به همراه هفت والد) بدست آمده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بررسی شدند. در هر بلوک مانند آزمایش اول هشت بوته برای هر ترکیب والدینی کاشته شد.

شکل ۱. مراحل گرده افشانی در *S. oleracea* . الف) تصویری از گل‌آذین نر ب) پایه ماده پاکت‌گذاری شده ج) گلهای ماده بعد از گرده افشانی (تورم تخمدان قابل مشاهده است) د) گلهای ماده قبل از گرده افشانی.

اندازه‌گیری اکسالات کل و اکسالات محلول به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

جهت استخراج اکسالات کل و اکسالات محلول از روشHönow & Hesse (2002) استفاده شد، ابتدا ۰/۳ گرم نمونه برگ تازه در سه میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک نرمال همگن شده و به لوله سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در این مدت چندین بار نمونه ها تکان داده شدند تا عمل هضم تا حد امکان یکنواخت و با کارایی بیشتر انجام شود. سپس پنج میلی‌لیتر آب دیونیزه به محتویات لوله‌ها بعد از سرد شدن اضافه گردید. در ادامه حدود یک میلی‌لیتر از این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس یک میلی‌لیتر از محلول رو شناور از کاغذ صافی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. بدین ترتیب محلول نهایی جهت تزریق به دستگاه HPLC آماده گردید. به منظور استخراج اکسالات محلول نیز تمامی شرایط گفته شده در بالا برای این ترکیب مشابه بود، با این تفاوت که جهت بدست آوردن عصاره مورد نظر از نمونه گیاهی عمل هضم بجای اسید در آب دیونیزه انجام گردید و به جای سه میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک نرمال از سه میلی‌لیتر آب دیونیزه استفاده شد.

جداسازی اکسالات در طول موج ۲۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه HPLC مدل PLATINblue v6900a ساخت شرکت آلمانیKnauer ، که به شناساگر یو–وی متصل بود، انجام شد. ستون ۱۸ کربنه (قطر منفذ پنج میکرومتر، طول ستون ۲۵۰ میلی‌متر و ضخامت ستون ۵/۶ میلی‌متر) به عنوان فاز ثابت استفاده شد. فاز متحرک حاوی محلول ۰/۵ درصد مونوپتاسیم فسفات و ۰/۵ میلی‌مولار بافر TBA با pH دو(تنظیم شده با ارتوفسفریک اسید) بود. در نهایت سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری اسید اَسکوربیک

اندازه‌گیری اسید اَسکوربیک توسط روش توصیه شده Kevers *et al.* (2007) انجام شد. ابتدا نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع و هاون آسیاب و یکنواخت گردیدند و برای آزمایش نهایی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت اندازه‌گیری مقدار اسید اَسکوربیک موجود در نمونه‌های اسفناج ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه‌های منجمد در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر متافسفریک اسید پنج درصد کاملاً همگن شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با شرایط دمایی چهار درجه سلسیوس و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. محلول روشناور که متشکل از عصاره گیاهی حاوی اسید آسکوربیک بود به لوله جدید انتقال یافت. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده با ۵۰۰ میکرولیتر بافرمتافسفریک اسید ۱۰ درصد، ۳۰۰ میکرولیتر بافر سیترات با پی اچ ۴/۲ و ۱۰۰ میکرولیتر ترکیب ۲و ۶- دی کلرو ایندوفنول (۰/۰۳ درصد) ترکیب گردید. مکانیزم واکنش بدین صورت است که محلول DCIP ارغوانی رنگ توسط اسید اسکوربیک موجود در عصاره گیاهی احیاء شده و به $DCIPH_2$ بی رنگ تبدیل می‌شود. بنابراین هر چه شدت جذب کمتر باشد میزان اسید اسکوربیک موجود در نمونه بیشتر است. مخلوط حاضر بعد از این مرحله به مدت ۴۵ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد و پس از آن مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Lambda EZ 201 شرکت Perkin-elmer (ماساچوست- ایالات متحده آمریکا) ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

ابتدا داده‌های بدست آمده به منظور بررسی نرمال بودن و همگنی واریانس‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ بررسی گردید. در ادامه تجزیه واریانس اثرات مادری، ترکیب پذیری عمومی و خصوصی با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ و بر اساس برنامه DIALLEL-SAS05 Zhang *et al.* (2005) که مطابق با تجزیه واریانس دای‌آلل به روش اول مدل ثابت Griffing (1956) نوشته شده بود، اجرا شد. براساس واریانس ترکیب پذیری عمومی (σ^2g)، واریانس ترکیب‌پذیری خصوصی (σ^2s) و واریانس اثرهای معکوس (σ^2r) بدست آمده از آنالیز قبلی، برآورد وراثت‌پذیری عمومی (h^2b) و وراثت‌پذیری خصوصی (h^2n) با استفاده از روابط ۱ و ۲ انجام گرفت (Teklewold & Becker, 2005).

رابطه ۱)

$$h^2\, b = \frac{2\,\sigma^2\, g + \sigma^2\, s}{2\,\sigma^2\, g + \sigma^2\, s + \sigma^2\, e}$$

رابطه ۲)

$$h^2\, n = \frac{2\sigma^2\, g}{2\,\sigma^2\, g + \sigma^2\, s + \sigma^2\, e}$$

همچنین به منظور مقایسه نسبی واریانس ترکیب پذیری عمومی و خصوصی در کنترل ژنتیکی صفات ضریب بیکر (GCA:SCA) از رابطه $\frac{2\sigma^2\, g}{(2\,\sigma^2\, g + \sigma^2\, s)}$ بدست آمد. در این فرمول $\sigma^2\, g$ واریانس ترکیب پذیری عمومی و $\sigma^2\, s$ واریانس ترکیب پذیری خصوصی است. این رابطه نشان می‌دهد که چه میزان از واریانس مشاهده شده با اثرات افزایشی و چه میزان با اثرات غالبیت کنترل می‌شود. مقادیر نزدیک به یک نشانگر حاکم بودن اثرات افزایشی و مقادیر نزدیک به صفر نشانگر وجود اثرات غالبیت و اپیستازی می‌باشد (Baker, 1978).

یافته‌های پژوهش

از آنجا که عدد کروموزومی و سطح پلوئیدی گونه‌های مختلف اسفناج مورد مطالعه مشابه بودند (Kalloo & Bergh, 2012; Nasrabadi *et al*., 2021) ، همانگونه که انتظار می رفت تمام تلاقی‌های بین گونه‌ای تولید نتاج بارور نمودند. شکل‌های ۲ و ۳ به عنوان نمونه ارائه شده است.

شکل ۲. تصاویر بذور تعدادی از تلاقی‌های بین گونه ای مرتبط با جمعیت‌های منتخب اسفناج در آزمایش دای‌آلل. (منبع: یافته های تحقیق)

شکل ۳. تصویر برگ گیاه حاصل از تلاقی (نتاج: وسط) دو جمعیت اسفناج متعلق به دو گونه *S. oleracea* (چپ) و *S. turkestanica* (راست). (منبع: یافته های تحقیق)

تجزیه واریانس دای‌آلل

نتایج تجزیه واریانس آزمایش دای‌آلل مطالعه حاضر در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به میانگین مربعات ژنوتیپ، هر چهار ترکیب ارزیابی شده دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد در بین مواد ژنتیکی بدست آمده بودند. این نتایج نشانگر تنوع کافی مقادیر ترکیبات ارزیابی شده جهت بررسی‌های ژنتیکی بود. به بیان بهتر معنی‌داری یک صفت در بین اعضای جامعه حاصل از تلاقی‌های دای‌آلل امکان تجزیه ژنتیکی بر اساس طرح تلاقی دای‌آلل را تأیید می‌نماید.

همچنین، قابلیت ترکیب پذیری عمومی و خصوصی و نیز اثرات برگشتی برای تمام صفات معنی‌دار بود. بنابراین، بررسی مقایسات مقادیر حاصل از ترکیب پذیری های عمومی و خصوصی و نیز اثرات مادری بر اساس طرح مورد استفاده نیز تأیید گردید.

جدول۲. نتایج تجزیه واریانس آزمایش دای‌آلل بر صفات مورد ارزیابی در اسفناج بر اساس روش اول مدل نخست گریفینگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		اکسالات کل	اکسالات محلول	اکسالات غیر محلول	اسید آسکوربیک
بلوک	۲	۱۹۸۸۳/۹۷ ns	۱۵۴۳۴/۷۴ ns	۴۷۰۹۶/۰۸ ns	۹/۰۲ ns
ژنوتیپ (جمعیت)	۴۸	۱۲۰۴۷۸۱/۹۰**	۵۱۰۱۷۸/۷۱ **	۶۰۶۷۳۱/۰۸ **	۲۹۱۸/۳۶ **
GCA	۶	۸۴۸۸۶۴۶/۷۲ **	۳۲۲۰۲۹۲/۹۳ **	۴۰۵۸۷۴۲/۰۱ **	۱۹۳۲۶/۸۸ **
SCA	۲۱	۷۳۵۴۰/۱۰ **	۹۵۵۶۵/۲۱ **	۴۴۰۲۰/۶۲ **	۲۹۷/۸۲ **
اثر برگشتی	۲۱	۲۵۴۹۱۹/۴۵ **	۱۵۰۴۷۳/۸۶ **	۱۸۳۱۵۲/۷۰**	۸۶۸/۷۴ **
اثر مادری	۶	۸۴۶۶۲۵ **	۴۶۷۲۷۱/۰۹ **	۵۵۸۳۰۴/۸۸ **	۲۱۰۹/۲۴ **
اثر غیر مادری	۱۵	۱۸۲۳۷/۲۵ ns	۲۳۷۵۴/۹۸ ns	۳۳۰۹۱/۸۳ ns	۳۷۲/۵۴ ns
خطا	۹۶	۲۸۲۰۵/۷۶	۱۶۳۴۳/۶۶	۱۵۰۹۲/۴۸	۵۶/۷۹
ضریب تغییرات (درصد)	–	۸/۴۸	۱۰/۳۶	۱۶/۴۷	۱۴/۵۳

**، *، و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و نبود تفاوت معنی دار؛ GCA: ترکیب پذیری عمومی؛ SCA: ترکیب پذیری خصوصی. (منبع: یافته های‌تحقیق)

وراثت پذیری و عمل ژن

وراثت‌پذیری عمومی و خصوصی و عمل ژن (ضریب بیکر) با توجه به مقادیر واریانس‌های بدست آمده در جدول ۳، مطابق با روش اول مدل نخست گریفینگ برای صفات مورد مطالعه مشخص گردید. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین مقادیر وراثت پذیری عمومی و خصوصی در صفت اکسالات کل وکمترین مقدار وراثت پذیری خصوصی نیز به ترتیب در دو صفت اسید آسکوربیک و اکسالات محلول مشاهده شد. همچنین بالاترین ضریب بیکر در صفت اسید آسکوربیک و پایین‌ترین مقدار این ضریب نیز در صفت اکسالات محلول مشاهده گردید. برای دو صفت بسیار مهم اکسالات کل و محلول نیز مقادیر این ضریب در حد متوسط و کمی بیش از ۰/۴ بدست آمد.

جدول ۳. پارامترهای ژنتیکی اندازه گیری شده برای صفات بیوشیمیایی کلیدی متابولیسم اکسالات در جمعیت‌های اسفناج مورد مطالعه بر اساس تجزیه دای‌آلل مدل اول، روش نخست گریفینگ

پارامتر ژنتیکی	صفت ارزیابی شده			
	اکسالات کل	اکسالات محلول	اکسالات غیر محلول	اسید آسکوربیک
σ^2g	۱۳۴۳/۱۳	۳۳۳/۵۴	۷۱۶/۶۹	۲/۷
σ^2s	۳۵۴۹/۷	۲۰۵۶/۸۶	۱۷۹۹/۳۹	۲/۳۲
σ^2r	۴۷۰۰/۹۶	۲۷۲۳/۹۴	۵۰۳۰/۸۳	۹/۴۶
ضریب بیکر	۰/۴۳	۰/۲۴	۰/۴۴	۰/۶۹
h^2b	۰/۶۴	۰/۵۰	۰/۴۳	۰/۵۳
h^2n	۰/۵۷	۰/۳۳	۰/۳۹	۰/۳۲

σ^2g: واریانس ناشی از ترکیب‌پذیری عمومی؛ σ^2s: واریانس ناشی از ترکیب پذیری خصوصی؛ σ^2r: واریانس ناشی از اثرات تلاقی‌های متقابل؛ h^2b: وراثت پذیری عمومی و h^2n: وراثت‌پذیری خصوصی. (منبع: یافته‌های تحقیق)

ترکیب پذیری عمومی

تفاوت معنی‌دار ترکیب‌پذیری عمومی در سمت کاهش یا افزایش مقدار یک صفت، به مفهوم توانایی نسبی یک لاین در ترکیب با تعدادی از ژنوتیپ‌ها و انتقال آن صفت به نتاج است. این توانایی مهمترین عامل در انتخاب لاین‌ها جهت تلاقی‌های کنترل شده به حساب می‌آید. حال آنکه در ترکیب‌پذیری خصوصی وضعیت دولاین در یک تلاقی بخصوص مد نظر می‌باشد (Kearsey & Pooni, 2020). بر این اساس والد P3 (جمعیت وحشی بجنورد تیپ اکسالات پایین متعلق به گونه *S. turkestanica*) بالاترین ترکیب پذیری منفی و معنی دار را برای صفت اکسالات کل نشان داد. به عبارت دیگر این والد در ترکیب با تمام ژنوتیپ‌ها بیشترین اثر منفی معنی‌دار را در کاهش مقدار اکسالات کل در نتاج نشان داد. در همین راستا والد P4 (جمعیت اردبیل دارای تیپ اکسالات بالا–محلول متعلق به گونه *S. tetrandra*) به دلیل دارا بودن بالاترین مقادیر مثبت و معنی‌دار از اکسالات کل در ترکیب با سایر ژنوتیپ‌ها، نامناسب ترین جمعیت در جهت به نژادی صفت اکسالات کل ارزیابی شد. همچنین والد P6 (رقم محلی ایرانشهر ۳ متعلق به گونه *S. oleracea*) بالاترین اثر را در افزایش مقادیر اسید اسکوربیک در ترکیب با سایر والدین نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴. مقادیر ترکیب پذیری عمومی برای صفات بیوشیمیایی ارزیابی شده در جمعیت‌های اسفناج مورد مطالعه

والد	صفت ارزیابی شده			
	اکسالات کل	اکسالات محلول	اکسالات غیر محلول	اسید آسکوربیک
P1	−۴۶۳/۹**	−۱۵۵/۱۲۱**	−۳۰۸/۷۸**	-۱۲/۲**
P2	−۴۰۳/۰۶**	−۱۲۹/۸۹**	−۲۷۳/۱۷**	-۵/۰۳**
P3	−۵۶۰/۵۲**	−۳۰۴/۸۶**	−۲۵۵/۶۶**	-۱۸/۷۱**
P4	۴۴۲/۲۷**	۴۳۶/۳۸**	۵/۸۹^{ns}	-۱۵/۷۴**
P5	۳۴۵/۳**	۳۴۲/۸۶**	۲/۳۳^{ns}	-۷/۲۶**
P6	۲۹۴/۹۹**	−۱۰۳/۷۶**	۳۹۸/۷۵**	۳۹/۴۵ **
P7	۳۴۴/۹۲**	−۸۵/۷۲**	۴۳۰/۶۴**	۱۹/۵ **

**، * و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و نبود تفاوت معنی دار. (منبع: یافته‌های تحقیق)

ترکیب پذیری خصوصی

نتایج نشان داد که بهترین ترکیب پذیری خصوصی به منظور کاهش اکسالات کل به طور معنی‌داری در سطح یک درصد در تلاقی برگشتی والد P3 (پدر) با والد P4 (مادر) به مقدار ۳۸۹/۵− بدست آمد. به طور مشابه، یکی از بالاترین اثرات کاهشی و معنی دار بر مقدار اکسالات محلول در ترکیب تلاقی برگشتی والد P3 (پدر) با والد P4 (مادر) مشاهده شد. همچنین اثر کاهشی و معنی دار برای اکسالات غیر محلول در این ترکیب والدینی مقدار پایینی بود.

جدول ۵. نتایج مقادیر اثر ترکیب پذیری خصوصی در تلاقی‌های مستقیم و برگشتی ژنوتیپ‌های منتخب اسفناج برای چهار ترکیب کلیدی ارزیابی شده

اکسالات کل

♀ \ ♂	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
P1		-92.6	-148.6*	-14.6	178.1**	91.5	-184.9**
P2	140.5*		12.9	-82.9	65.2	29.8	-6.7
P3	76.1	112.0		-45.6	-121.4*	158.7**	99.0
P4	-282.5**	-275.1**	-384.5**		-23.0	-60.5	54.7
P5	-265.7**	-293.0**	-196.8**	115.2		-40.4	-20.0
P6	-131.2	-209.5**	-290.1**	110.6	76.7		26.8
P7	-154.1*	-182.9**	-329.5**	105.0	-46.9	-7.1	

اکسالات محلول

♀ \ ♂	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
P1		-172.2**	-192.0**	-78.0	263.9**	196.5**	-71.8
P2	156.2**		12.7	-64.8	3.1	57.9	29.9
P3	97.4	106.1*		34.6	-68.8	17.8	108.5*
P4	-131.9**	-288.2**	-233.3**		54.3	-2.2	-89.5
P5	-134.4**	-193.5**	-279.3**	90.3		40.8	-70.1
P6	62.8	129.2*	10.7	252.6**	176.5		63.4
P7	119.4*	64.0	28.8	216.0**	55.7	-16.1	

اکسالات نامحلول

♀ \ ♂	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
P1		79.6	43.4	63.5	-85.8*	-104.9*	-113.1*
P2	-15.8		0.2	-18.2	62.1	-28.1	-36.6
P3	-21.3	5.9		-80.2	-52.6	140.9**	-9.6
P4	-150.6**	13.1	-151.2**		-77.4	-58.3	144.2**
P5	-131.2*	-99.5	82.4	24.9		-81.2	50.0
P6	-193.9**	-338.8**	-300.8**	-142.0**	-99.7*		-36.6
P7	-273.5**	-247.0**	-358.2**	-111.1*	-102.6*	9.0	

اسکوربیک اسید

♀ \ ♂	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
P1		-6.51	3.05	-3.76	-7.28**	-5.21	9.05**
P2	-7.67*		-2.12	-0.87	0.38	-0.77	5.32*
P3	-0.83	6.68*		2.51	-3.11	5.66	-3.49*
P4	-1.39	7.65*	-1.72		-0.41	-2.82	5.68**
P5	-3.83	5.35	-1.87	-2.07		-3.01	-1.86
P6	-25.28**	-31.03**	-5.04	-4.64	-9.29**		3.78
P7	-23.99**	-4.41	-12.57	-4.65	-4.44	17.10**	

****، *، و ns:** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد و نبود تفاوت معنی دار، رنگ سبز کمترین و رنگ قرمز بیشترین مقادیر را نشان می‌دهد.

(منبع: یافته‌های تحقیق)

اثرات برگشتی

نتایج تجزیه واریانس اثرات برگشتی نشان دادکه تنها جزء مادری اثرات برگشتی برای تمام صفات مورد مطالعه معنی‌دار گردید (جدول ۲). اثر مادری در کنترل صفت اکسالات کل به طور مشابهی با نتایج ترکیب‌پذیری عمومی والد P3 (جمعیت وحشی بجنورد تیپ اکسالات پایین متعلق به گونه *S. turkestanica*) بالاترین مقدار منفی و معنی‌دار را در مقایسه با سایر جمعیت‌ها برای این صفت نشان داد.

جدول ۶. مقادیر اثرات مادری برای صفات بیوشیمیایی ارزیابی شده در والدین منتخب اسفناج

والد	صفات ارزیابی شده			
	اکسالات کل	اکسالات محلول	اکسالات غیر محلول	اسید آسکوربیک
P1	−۸۸/۱۳**	۲۴/۲۱ns	−۱۱۲/۳۴**	−۸/۹۹**
P2	−۱۴۱/۳**	−۴۸/۳۶**	−۹۲/۹۳**	−۱/۱۶ns
P3	−۱۹۸/۴۲**	−۹۶/۶۵**	−۱۰۱/۷۶**	−۳/۸۶**
P4	۱۸۱/۸۳**	۱۷۳/۲**	۸/۶۳ns	−۲/۲۷*
P5	۹۵/۷۴**	۱۰۷/۰۲**	−۱۱/۲۷ns	−۱/۶۱ns
P6	۶۲/۳۴*	−۹۲/۵۷**	۱۵۴/۹**	۱۳/۲**
P7	۸۷/۹۳**	−۸۵/۷۲**	۴۳۰/۶۴**	۴/۷۱**

**، *، و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد و نبود تفاوت معنی دار؛ + و − : شدت اثرات مادری و جهت آن (مقدار مثبت افزایشی و مقدار منفی کاهشی). (منبع: یافته‌های تحقیق)

بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس آزمایش دای آلل، تنوع کافی از مقادیر ترکیبات ارزیابی شده جهت بررسی‌های ژنتیکی در این آزمایش مشاهده گردید. به بیان بهتر معنی‌داری اختلاف مشاهده شده در مقادیر یک صفت در بین اعضای جامعه حاصل از تلاقی‌های دای‌آلل امکان تجزیه ژنتیکی بر اساس طرح تلاقی دای‌آلل را تأیید می‌نماید. همچنین همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، قابلیت ترکیب پذیری عمومی و خصوصی و نیز اثرات برگشتی برای تمام صفات معنی‌دار شد. بنابراین بررسی مقایسات مقادیر حاصل از ترکیب پذیری های عمومی و خصوصی و نیز اثرات مادری بر اساس طرح مورد استفاده نیز تأیید گردید. بر همین اساس تمام صفات مورد ارزیابی به‌طور معنی داری متاثر از جهت تلاقی بودند. بدین معنی که مقادیر بدست آمده از تلاقی‌های مستقیم و برگشتی به طور معنی‌داری با هم تفاوت داشتند. چنانچه اثرات برگشتی برای یک صفت معنی‌دار شود، بررسی اثرات غیر هسته‌ای امکان پذیر است. لازم به توضیح است که در کنار عوامل مربوط به هسته به عنوان اصلی‌ترین جزء ژنتیکی کنترل کننده وراثت صفات در گیاه، عوامل غیر هسته‌ای که در ایجاد اثرات برگشتی دخیل هستند نیز می‌توانند نقش داشته باشند. اثرات برگشتی ناشی از عوامل غیر هسته‌ای خود به دو بخش عوامل مادری (سیتوپلاسمی) و عوامل غیر مادری تجزیه می‌شوند (Sadeghzadeh-Ahari *et al.*, 2018). بنابراین، با توجه به اینکه در این مطالعه تمامی صفات مورد بررسی اثر معکوس و مادری معنی‌دار را نشان دادند، می‌توان نتیجه گرفت که عوامل غیر هسته‌ای از نوع مادری یا سیتوپلاسمی می‌توانند نقش مهمی در کنار عوامل هسته‌ای در کنترل صفات بیوشیمیایی مربوط به تجمع اکسالات در گیاه اسفناج ایفا نمایند.

تحلیل وراثت پذیری و عمل ژن در صفات مورد بررسی نشان دهنده بیشترین مقادیر بدست آمده برای وراثت پذیری عمومی و خصوصی در صفت اکسالات کل بود. وراثت پذیری عمومی بیانگر تاثیر نسبی ویژگی‌های ارثی و محیطی در بروز تفاوت ژنتیکی افراد یک جمعیت است و احتمال تفاوت نتاج والدین برگزیده را بیان می‌کند، اما قابلیت و امکان انتقال آن صفت به نسل بعد را مشخص نمی‌نماید. از طرف دیگر وراثت پذیری‌خصوصی به عنوان متغیر تکمیلی نشان دهنده این است که چه مقدار از این تنوع ژنتیکی به نسل بعد قابل انتقال خواهد بود (Nyquist & Baker, 1991). بنابراین می‌توان گفت بروز صفت

اکسالات کل در جامعه گیاهی اسفناج در مطالعه حاضر بیش از ۵۰ درصد توسط عوامل ارثی و ژنتیکی کنترل می شود. این نتایج بیانگر امکان اصلاح این گیاه بر مبنای اکسالات کل و نیز احتمال مشاهده کاهش مقدار آن در نسل‌های بعد از اعمال روش‌های به‌نژادی می‌باشد. با توجه به ضریب بیکر بدست آمده برای اکسالات کل (۰/۴۳) نیز می‌توان نتیجه گرفت که هر دو عمل افزایشی و غالبیت/اپیستازی ژن‌ها در ایجاد این صفت نقش دارند هر چند گرایش بیشتری به سمت اثر غالبیت نسبی در ایجاد این صفت دیده می شود. با اینحال محدودیتی برای انتخاب روش به‌نژادی درباره این صفت وجود ندارد و می‌توان از هر دو رویکرد گزینش (دوره‌ای یا توده‌ای) و یا به‌نژادی با استفاده از دورگ‌گیری برای بهبود آن استفاده نمود هرچند با توجه به توضیحات قبل به‌نژادی به روش دورگیری در اولویت می‌باشد.

همچنین صفت اکسالات محلول که از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اکسالات کل می‌باشد وراثت پذیری عمومی حد متوسطی را نشان داد. هرچند وراثت پذیری خصوصی این صفت به صورت معنی‌داری پایین بود. این نتایج بر پایین بودن ارزش اصلاحی این صفت دلالت می‌نماید و آن را از اولویت اهداف به‌نژادی خارج می‌کند. با توجه به ضریب بیکر مشاهده شده برای این صفت نیز می‌توان عمل ژن برای آن را غیر افزایشی دانست.

دومین جزء مهم تشکیل دهنده اکسالات کل، اکسالات غیر محلول است. این جزء هر چقدر سهم بیشتری در تشکیل اکسالات کل در ارقام اسفناج داشته باشد از نظر به‌نژادی مناسب‌تر تشخیص داده می‌شود. اعداد بدست آمده برای وراثت پذیری عمومی و خصوصی این صفت تقریباً یکسان و حد متوسطی از وراثت پذیری را نشان داد. به طوریکه می‌شود نقش ژنتیک و عوامل محیطی در کنترل این صفت را تقریباً برابر در نظر گرفت. به هر حال اگر اولویت انتخاب با توجه به ارزش به‌نژادی یک صفت در نظر باشد، بعد از اکسالات کل، اولویت دوم انتخاب صفت اصلاحی در بین چهار خصوصیت مطالعه شده، با این صفت می‌باشد. ضریب بیکر در این صفت همانند صفت اکسالات کل حد میانه (۰/۴۲) بود بنابراین در این مورد هم می‌توان عنوان نمود محدودیتی به لحاظ انتخاب روش به‌نژادی برای بهبود این صفت وجود ندارد و می‌توان از هر دو رویکرد گزینش دوره‌ای و توده‌ای و یا به‌نژادی از طریق دورگ گیری با اولویت بکارگیری روش دوم برای ایجاد تغییرات دلخواه در نتاج برای این صفت استفاده نمود.

ترکیب اَسکوربیک اسید که به عنوان یک پیش‌ماده جانبی در تولید اکسالات برای اسفناج مطرح می‌باشد کمترین مقدار وراثت‌پذیری خصوصی را نشان داد. بنابراین می‌توان گفت که علیرغم سهم یکسان ژنتیک و محیط در شکل‌گیری آن، احتمال مشاهده تغییرات دلخواه برای آن در نسل‌های بعد از اعمال روش‌های به‌نژادی ، کمترین مقدار در بین سایر ترکیبات می‌باشد. به بیان دیگر اینگونه مشخص است که در میان صفات مورد مطالعه ارزش به‌نژادی این صفت به لحاظ وراثت‌پذیری خصوصی پایین‌ترین مقدار می‌باشد.

افزایش نسبت تجمع اکسالات نامحلول به اکسالات محلول همزمان با کاهش مقدار اکسالات کل به عنوان رهیافتی نوین و امیدبخش در جهت افزایش کیفیت خوراکی اسفناج معرفی شده است (Mirahmadi *et al*., 2022). در همین راستا مشاهده گردید که ترکیب پذیری والد P3 با سایر والدین این ویژگی مطلوب را در نتاج حاصل از تلاقی‌ها نشان می‌دهد، به طوریکه همزمان با داشتن بالاترین اثر کاهشی در مقدار تجمع اکسالات کل در ترکیب با سایر ژنوتیپ‌ها، کمترین اثر منفی را نیز در کاهش مقدار نسبی اکسالات غیر محلول و بالاترین اثر کاهشی در تجمع اکسالات محلول در ترکیب با سایر ژنوتیپ‌های اسفناج مورد مطالعه را نشان داد. به بیان دیگر این جمعیت بهترین مقادیر ترکیب‌پذیری عمومی را برای اصلاح ترکیبات کلیدی مرتبط با تجمع ترکیب اکسالات در اسفناج ارائه نموده است.

همچنین اگر هدف به‌نژادی متمرکز بر افزایش مقدار اَسکوربات در اسفناج باشد والد P6 (رقم محلی ایرانشهر ۳ متعلق به گونه *S. oleracea*) در این خصوص معرفی می‌گردد. هرچند نتایج تجزیه واریانس مطالعه دای‌آلل وراثت پذیری پایینی را برای این صفت نشان داده است، لذا با توجه به این مساله امکان دستیابی به ارقام مورد نظر در نتیجه استفاده از روش‌های به‌نژادی برای این صفت چندان محتمل نمی‌باشد.

براساس یافته‌های حاصل از ترکیب‌پذیری خصوصی مشخص گردید ترکیب تلاقی برگشتی والد مادری از نوع اکسالات بالا–محلول مربوط به ژنوتیپ اهلی گرگان (P4) با والد پدری از نوع اکسالات پایین ژنوتیپ وحشی بجنورد (P3) متعلق به گونه *S. turkestanica* احتمالاً می‌تواند بهترین ترکیب‌پذیری خصوصی را در جهت تغییر ویژگی‌های تجمعی اکسالات در اسفناج با توجه به رهیافت امید بخش مورد اشاره در این مطالعه برای اصلاح اسفناج های با اکسالات کل پایین و نسبت اکسالات غیر محلول بالا در بین ترکیب‌های موجود، دارا باشد.

در نهایت با توجه به مقادیر بدست آمده از جدول اثرات برگشتی (جدول ۶)، هر چند والد جمعیت وحشی بجنورد با تیپ اکسالات پایین و متعلق به گونه *S. turkestanica* به عنوان والد مادری در ترکیب با سایر والدین بیشترین اثر معنی‌دار را در کاهش مقدار اکسالات کل و کمترین اثر معنی‌دار را در کاهش نسبت اکسالات غیر محلول به اکسالات محلول به عنوان دو رویکرد اصلی معرفی شده در بهنژادی اسفناج در این مطالعه نشان داد، اما با توجه به ویژگی‌های نامطلوب زراعی این ژنوتیپ از قبیل سطح برگ کمتر، برگ‌های کوچک تر، نسبت گیاهان نر بیشتر، عملکرد پایین تر در واحد سطح که همگی ریشه در طبیعت وحشی آن دارد به‌عنوان والد مادری توصیه نمی‌شود.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مشاهدات حاصل از تلاقی دای‌آلل بین گونه‌ای نشان داد که این تلاقی‌ها کاملاً سازگار بوده و بذور بارور تولید می‌نمایند. صفت اکسالات کل به عنوان اصلی‌ترین صفت در به‌نژادی اسفناج به منظور رفع اثرات انباشت اسید اکسالات، مقدار وراثت پذیری خصوصی و عمومی بیش از ۵۰ درصدی را نشان داد که بیانگر این فرض بود که با احتمال بیشتر از ۵۰ درصد این صفت در نسل‌های پس از انجام روش های اصلاحی قابل کنترل است. همچنین با بدست آمدن ضریب بیکر معادل ۰/۴۳ برای صفت اکسالات کل اثر غالبیت نسبی در ایجاد این صفت بیش از اثر افزایشی مشاهده شد، بر این اساس می‌توان اولویت انتخاب روش به‌نژادی را بر مبنای دورگ‌گیری و انجام گزینش در نسل‌های ابتدایی پس از دورگ‌گیری قرار داد. هر چند با توجه به مقدار اندک گرایش عمل این ژن به سمت غالبیت همچنان می‌توان به تنهایی از روش گزینش توده ای و دوره‌ای برای به‌نژادی این صفت نیز بهره برد.

در پایان پیشنهاد می‌شود برنامه هدفمند بر اساس یافته‌های این مطالعه، جهت تولید رقم اصلاحی اسفناج با مقادیر پایین اکسالات و با حفظ خصوصیات بیولوژیک آن از طریق افزایش سهم فرم نامحلول به عنوان رهیافتی موثر مورد توجه متخصصین امر به‌نژادی این گیاه قرار گیرد. جهت این امر به دست آوردن مقدار بحرانی[۱]حداقل اکسالات مورد نیاز برای حفظ حد بهینه خواص بیولوژیک ارقام مورد نظر ضروری می‌باشد که می‌توان به عنوان مطالعات آتی از آن یاد نمود.

سپاسگزاری

بدینویسله نویسندگان این مقاله کمال تقدیر و تشکر را از معاونت پژوهش و فناوری دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و همچنین صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برای حمایت مالی از انجام این تحقیق در چهارچوب طرح پژوهشی شماره ۹۸۰۱۳۹۱۲ دارند.

REFERENCES

Andersen, S. B., & Torp, A. M. (2011). Spinacia. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 273-276). Springer .

Astley, D., & Ford-Lloyd, B. (1981). The evolutionary significance of multigermicity in the genus *Spinacia* (Chenopodiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 137(1-2), 57-61 .

Baker, R. (1978). Issues in diallel analysis. *Crop Science*, 18(4), 533-536 .

۱ Critical amount

Borchert, R. (1985). Calcium-induced patterns of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. and *Albizia julibrissin* Durazz. *Planta*, 165(3), 301-310 .

Borchert, R. (1986). Calcium acetate induces calcium uptake and formation of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. *Planta*, 168(4), 571-578 .

Bsc, S. N., & Bsc, G. S. (1999) .Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8(1), 64-74 .

Chukwu, S., Okporie, E., Onyishi, G., Ekwu, L., Nwogbaga, A., & Ede, N. (2016). Application of diallel analyses in crop improvement. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 7(2), 95-106 .

Cornelius, P., & Dudley, J. (1976). Genetic variance components and predicted response to selection under selfing and full-sib mating in a maize population 1. *Crop Science*, 16(3), 333-339 .

Decoteau, D. R. (2000). *Vegetable crops*. Prentice Hall .

Elder, T. D., & Wyngaarden, J. B. (1960). The biosynthesis and turnover of oxalate in normal and hyperoxaluric subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 39(8), 1337-1344 .

Franceschi, V. (1989). Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. *Protoplasma*, 148(2-3), 130-137 .

Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 41-71 .

Gomes, G. P., Zeffa, D. M., Constantino, L. V ,.Baba, V. Y., Silvar, C., Pomar, F., & Gonçalves, L. S. (2021). Diallel analysis of the morphoagronomic, phytochemical, and antioxidant traits in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 62(3), 435-446 .

Griffing ,B. (1956). A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity*, 10(1), 31 .

Hatch, M., & Freel, R. W. (2005). Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate. *Urological Research*, 33(1), 1-16 .

Holmes, R. P., Goodman, H. O., & Assimos, D. G. (2001). Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney International*, 59(1), 270-276 .

Holmes, R. P., & Kennedy, M. (2000). Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney International*, 57(4), 1662-1667 .

Hönow, R., & Hesse, A. (2002). Comparison of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor. *Food Chemistry*, *78*(4), 511-521 .

Kalloo, G., & Bergh, B. (2012). *Genetic improvement of vegetable crops*. Newnes .

Kearsey, M., & Pooni, H. (2020). *Genetical analysis of quantitative traits*. Garland Science .

Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.-O., Dommes, J., & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(21), 8596-8603 .

Klug, B., & Horst, W. J. (2010). Oxalate exudation into the root-tip water free space confers protection from aluminum toxicity and allows aluminum accumulation in the symplast in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *New Phytologist*, 187(2), 380-391 .

Kochian, L. V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1), 237-260 .

Korth, K. L., Doege, S. J., Park, S.-H., Goggin, F. L., Wang, Q., Gomez, S. K., & Nakata, P. A. (2006). *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as

an effective defense against chewing insects. *Plant Physiology* 141(1): 188-195.

Kuo-Huang, L.-L., Ku, M. S., & Franceschi, V. R. (2007). Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shadeadapted Peperomia glabella. *Botanical Studies*, 48(2), 155-164 .

Ma, J. F., Ryan, P. R., & Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 273-278 .

Maina, A. N., Tchiagam, J. N., Gonne, S., Hamadama, Y., Bell, J., & Njintang, N. (2015). Diallel analysis of polyphenols and phytates content in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Scientia*, 12(1), 46-51 .

Mbusa Héritier, K., Ngugi, K., Olubayo, F., & Musembi Kivuva, B. (2019). *Genetic analysis of sweet potato* (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *genotypes for beta carotene content and root yield in kenya* (Thesis for: Master of Science in plant breeding and biotechnology, department of plant science and crop protection, faculty of agriculture, University of Nairobi). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/331936761.

Mirahmadi, S. F., Hassandokht, M., Fatahi, R., Naghavi, M. R., & Rezaei, K. (2022). High and low oxalate content in spinach: an investigation of accumulation patterns. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(2), 836-843 .

Nakata, P. A. (2012). Engineering calcium oxalate crystal formation in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 53(7), 1275-1282 .

Naresh, P., Rao, V., Reddy, L., Reddy, A., Venkatachalapathi, V., & Reddy, M. (2016). Genetic analysis for fruit biochemical traits (capsaicinoids and carotenoids) and dry fruit yield in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Industrial Crops and Products*, 94, 920-931 .

Nasrabadi, M. D., Hassandokht, M., Mirahmadi, S. F., & Hassanpanah, D. (2021). Evaluation of diversity in spinach populations based on cytogenetical characteristics and their relation with morphological and physiological traits. *Agricultural Research*, 1-10 .

Nonnecke, I. L. (1989). *Vegetable production*. Springer Science & Business Media .

Nyquist, W. E., & Baker, R. (1991). Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(3), 235-322 .

Ruiz, N., Ward, D., & Saltz, D. (2002). Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancratium sickenbergeri*: constitutive or induced defence? *Functional Ecology*, 16(1), 99-105 .

Ryder, E. J. (1979). *Leafy salad vegetables*. Springer Science & Business Media .

Sadeghzadeh-Ahari, D., Sharifi, P., Karimizadeh, R., & Mohammadi, M. (2018). Estimation of genetic parameters of yield and yield components in rainfed durum wheat through diallel cross. *Journal of Crop Breeding*, 10*(25): 176-184.*

Saltz, D., & Ward, D. (2000). Responding to a three-pronged attack: desert lilies subject to herbivory by dorcas gazelles. *Plant Ecology*, 148(2), 127-138 .

Sharma, S., Sain, R., & Sharma, R. (2003). Genetics of spike length in durum wheat. *Euphytica*, 130(2), 155-161 .

Svedružić, D., Jónsson, S., Toyota, C. G., Reinhardt, L. A., Ricagno, S., Lindqvist, Y., & Richards, N. G. (2005). The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 443(1): 176-192.

Swiader, J. M., Ware, G. W., & McCollum, J. P. (1992). *Producing vegetable crops*. Interstate Printers and Publishers Inc.

Teklewold, A., & Becker, H. C. (2005). Heterosis and combining ability in a diallel cross of Ethiopian mustard inbred lines. *Crop Science*, 45(6), 2629-2635 .

Zhang, B., Oakes, A. D., Newhouse, A. E., Baier, K. M., Maynard, C. A., & Powell, W. A. (2013). A threshold level of oxalate oxidase transgene expression reduces Cryphonectria parasitica-

induced necrosis in a transgenic American chestnut (*Castanea dentata*) leaf bioassay. *Transgenic Research*, 22(5), 973-982 .

Zhang, Y., Kang, M. S., & Lamkey, K. R. (2005). DIALLEL-SAS05: A comprehensive program for Griffing's and Gardner–Eberhart analyses. *Agronomy Journal*, 97(4): 1097-1106.

Zindler-Frank, E. (1975). On the formation of the pattern of crystal idioblasts in *Canavalia ensiformis* DC. VII. Calcium and oxalate content of the leaves in dependence of calcium nutrition. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, *77*(1), 80-85 .