ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۳۶۲-۳۵۳

بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های لاله‌ی واژگون (*Fritillaria imperialis*) منطقه زاگرس با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

Study of genetic diversity between and within populations of *Fritillaria imperialis* in Zagrose regions using RAPD marker

معصومه کوهگرد[۱]، بهروز شیران*[۲]، ندا میرآخورلی[۳]

۲،۱و۳- کارشناس ارشد، دانشیار و استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد

Koohgard M[1], Shiran B[2*], Mirakhorli N[3]

1,2,3. MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor, Department of plant breeding and biotechnology, Shahrkord University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shiran@agr.sku.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

در این مطالعه نشانگر RAPD به عنوان ابزاری برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های لاله‌ی واژگون (*F. imperialis*) مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور ابتدا ۱۶۰ نمونه، از هشت جمعیت *F. imperialis* از مناطق مختلف زاگرس جمع‌آوری شد. شش آغازگر از ۳۵ آغازگر بکار رفته بر اساس میزان پلی‌مورفیسم آن‌ها انتخاب شدند. نتایج نشان داد که از ۸۱ باند تولید شده ۷۱ باند به صورت پلی‌مورف بودند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، و با استفاده از روش UPGMA مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌ها وجود دارد. تجزیه واریانس مولکولی نیز نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها به ترتیب برابر با ۴۵ و ۵۵ درصد می‌باشد. بر اساس تجزیه‌های تنوع ژنی میزان تنوع ژنی کل (Ht) برابر با ۰/۲۳۴ و میزان تنوع ژنی درون جمعیت‌ها (Hs) برابر با ۰/۱۳۸ و همچنین میزان تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst) برابر با ۰/۴۰۸ برآورد شد. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتا کمی درون جمعیت‌ها و نسبتا زیاد بین جمعیت‌های لاله‌ی واژگون وجود دارد. فاصله جغرافیایی زیاد عامل اصلی محدویت انتقال ژن بین جمعیت‌ها و تمایز ساختار ژنتیکی جمعیت‌های لاله‌ی واژگون منطقه زاگرس بیان شد.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی، لاله‌ی واژگون، منطقه‌ی زاگرس، PIC، RAPD.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

مقدمه

لاله‌ی واژگون با نام علمی *Fritillaria imperialis* گیاهی است ازخانواده‌ی سوسن (*Liliaceae*) و به دلیل قطرات شهد که در پایه گلبرگ‌های آن جمع می‌شود به اشک مریم معروف می‌باشد. این گیاه یکی از زیباترین گیاهان منطقه زاگرس است که در ارتفاعات ۲۰۰۰ متری از سطح دریا رشد می‌کند. لاله‌ی واژگون گیاهی چند ساله و دارای پیاز است که پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان گیاه زینتی و نیز داروئی دارا می‌باشد، و هر ساله مشتاقان بسیاری را در سراسر دنیا به سمت خود جذب می‌کند.

جنس *Fritillaria* دارای حدود ۱۰۰ گونه می‌باشد، و غالبا در نیمکره شمالی می‌روید، اما در ایران، جنوب عراق، افغانستان، پاکستان و کشمیر هم یافت شده است. چندین گونه این جنس بومی قبرس و جنوب ترکیه است و ۱۴ گونه بومی ایران می‌باشد (Tsukamoto 1989; Dehertogh and Lenard 1993). در ایران جمعیت‌های وحشی لاله‌ی واژگون به دلیل عدم وجود قوانین حفاظتی مناسب، چرای دام، و مبارزه با آفات در معرض شدید خطر نابودی و انقراض قرار گرفته است. لاله‌های واژگون حاوی آلکالوئیدهای دارویی می‌باشد، که در کاهش فشار خون و کاهش تپش قلب موثر است، و در کشور چین این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی موثر برای درمان سرفه و تب تجویز شده است (Kang et al. 2004; Kitajima et al. 1981; Perry 1980). بررسی میزان و توزیع تنوع ژنتیکی درون گونه‌های طبیعی اطلاعات با ارزشی در زمینه‌ی تاریخچه تکامل گیاه در دسترس ما قرار می‌دهد، و می‌توان از این اطلاعات در حفظ و مدیریت گیاه بهره‌برداری نمود (Zhang et al. 2010). بسیاری از جنبه‌های حفاظت زیست محیطی از قبیل از دست رفتن تنوع ژنتیکی و احیاء جمعیت‌های گیاهی در حال انقراض را با مطالعه دقیق ژنتیک و ساختار جمعیت‌های گیاهی می‌توان مورد ملاحظه قرار داد (Hamrick and Godt 1996). بنابراین یکی از اهداف اصلی حفاظت محیط زیست حفظ تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های گونه‌های گیاهی می‌باشد. از دست رفتن تنوع ژنتیکی سبب کاهش توانایی جمعیت‌های گیاهی در سازگاری با تغییرات محیطی و نهایتاً بقای گیاه می‌شود (Hogbin and Peakall 1999; Yamagishi et al. 2010). تنوع ژنتیکی برای سازگاری با تغییرات محیطی و بقاء یک گونه گیاهی بسیار حیاتی می‌باشد. از طرفی دانش ما درباره تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گیاهی به منظور سیاستگذاری در مدیریت و حفظ گونه‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است (Hamrick and Godt 1996). بنابراین مطالعه ژنتیک جمعیت *F. imperialis* به منظور حفظ این گونه با ارزش در حال انقراض، بسیار حیاتی می‌باشد. نشانگرهای مبتنی بر PCR، از قبیل RAPD ابزار معتبر و مفید در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجودات و تجزیه و تحلیل ارتباط جمعیت‌ها فراهم نموده است (Weising et al. 1995 ; Williams et al. 1990). اهمیت نشانگرهای مولکولی به این خاطر است که این نشانگرها از نظر فنوتیپی خنثی هستند، و برخلاف نشانگرهای مورفولوژیکی و ایزوزایمی تحت شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند، و چند شکلی‌های موجود را به خوبی نشان می‌دهند (Shiran et al. 2007). نشانگر مولکولی RAPD به دلیل سادگی و سریع بودن و عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA الگو مورد مطالعه قرار گرفته است. علی رغم مشکل تکرارپذیری، از این نشانگر در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی و شناسائی ژنوتیپ‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی بهره‌گیری شده است (Weising et al. 1995; Shiran et al. 2007). سودمندی نشانگرRAPD برای شناسائی ژنتیکی جمعیت‌های *Fritillaria* توسط سایر محققین مورد تائید قرار گرفته است (Yamagishi et al. 2010). در زمینه شناسایی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم لاله‌ی واژگون در ایران در سطح مولکول DNA اطلاعات بسیار اندکی در دسترس است، مطالعات بر روی گونه‌های دیگر جنس *Fritillaria* از قبیل *F. camschatcensis*، *F. cirrhosa* و *F. thunbergii* با استفاده ازنشانگرهای مولکولی RAPD (Yamagishi et al. 2010)، ISSR (Liu et al. 2010)، AFLP (Zhang et al. 2010) صورت گرفته است. در هر حال تا به امروز مطالعه ژنتیک جامعی بر روی این گونه در ایران انجام نشده است، و دانش ما در زمینه ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی *F. imperialis* بسیار اندک است. لذا هدف اصلی در این بررسی ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های لاله‌ی واژگون منطقه‌ی زاگرس ایران متعلق به هفت ناحیه جغرافیایی(استهبان، یاسوج، آستانه، گلستان‌کوه، کوهرنگ،

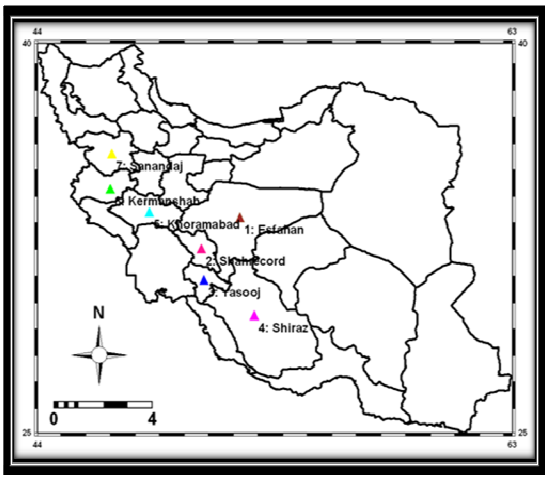
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

اشترانکوه، پرو و کردستان) با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی RAPD-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های لاله‌ی واژگون با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، در فاصله زمانی اردیبهشت ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شهرکرد انجام شد. تعداد ۱۶۰ نمونه لاله‌ی واژگون از نقاط مختلف در منطقه‌ی زاگرس جنوبی، مرکزی و شمال غرب شامل آستانه‌ی دهاقان در استان اصفهان، استهبان در استان فارس، گلستان‌کوه خوانسار در استان اصفهان، اشترانکوه دراستان لرستان، پرو در استان کرمانشاه، گردنه‌ی دولاب در استان کردستان و جمعیتی از گردنه‌ی مورپرسه در استان کهگلویه و بویر احمد (تعداد ۲۰ نمونه از هر جمعیت)، اوایل اردیبهشت ۱۳۸۷ به طور تصادفی جمع‌آوری گردید. فاصله‌ی بین نمونه‌ها ۱۰۰ تا ۵۰۰ متر و فاصله بین جمعیت‌ها ۱۵۰ کیلومتر بود. سپس برای سهولت کار، نمونه‌ها برای هر جمعیت از یک تا ۲۰ نامگذاری شدند، به صورتی‌که حرف لاتین نشان‌دهنده‌ی محل جمع‌آوری نمونه بود. نمونه‌های هرباریومی از نمونه‌های مورد بررسی تهیه، و پس از شناسایی دقیق در هرباریوم دانشگاه شهرکرد نگهداری شدند. در (جدول ۱) و (شکل ۱) موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های مورد ارزیابی، مشخص شده است.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی استان‌های جمع‌آوری نمونه‌های لاله واژگون

استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نمونه‌های برگ تازه روئیده شده به منظور استخراج DNA در آزمایشگاه و در محیط ۸۰°C- نگهداری گردیدند. لاله‌ی واژگون به علت داشتن مواد ثانویه (تانن‌ها و پلی‌ساکاریدها) نیازمند دقت کافی در طی مراحل استخراج DNA می‌باشد. DNA ژنومی از ۱/۵- ۱ گرم برگ جوان، بر اساس روش تغییر یافته CTAB استخراج شد (Murray and Thompson 1980). ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به کمک الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر اساس روش Williams et al. (1990) با تغییرات جزئی انجام شد. ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل: ×۱ بافر PCR، ۳ mM $MgCl_2$، ۲۰۰µM dNTPs، ۱۵ ng/µL آغازگر، ۰/۷۵ واحد *Taq* DNA Polymerase و ۵۰ ng از DNA الگو بود. جهت انجام واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر اپندورف استفاده شد. مناسب‌ترین چرخه حرارتی جهت PCR نمونه‌ها برای هر آغازگر به این صورت انتخاب شد: (۱) ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه (۲) ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (۳) ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (۴) ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه (۵) ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه. مراحل دو تا چهار به تعداد ۴۵ بار تکرار شد. به منظور تفکیک فرآورده‌های حاصل از تکثیر PCR، از ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE × ۰/۵ استفاده شد. الکتروفورز نهایی همه نمونه‌های مربوط به یک آغازگر خاص در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت سه ساعت انجام گرفت. یکی از نمونه‌های جمعیت کوهرنگ (K1) به عنوان کنترل مثبت جهت بررسی تکرارپذیری باندها در نظر گرفته شد. DNA لدر ۱۰۰bp ساخت شرکت فرمنتاز نیز به عنوان نشانگر استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

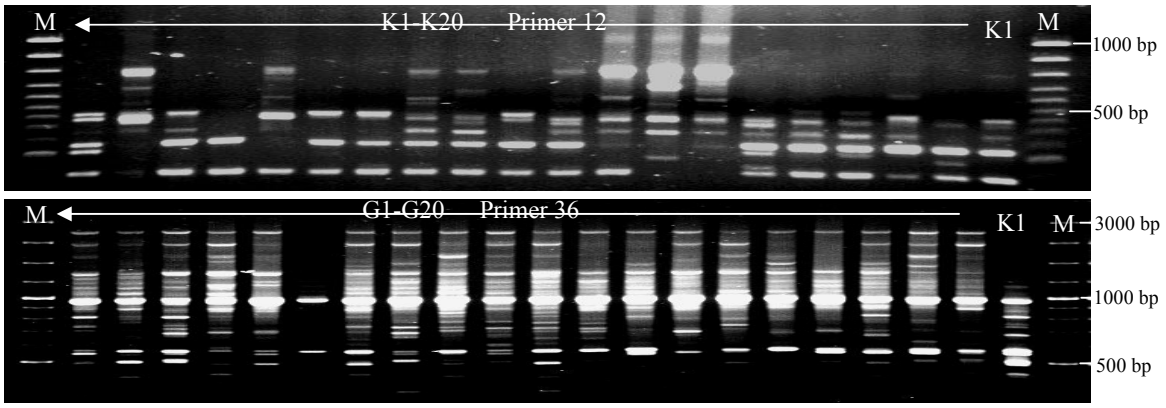
تجزیه‌های آماری

ژنوتیپ‌ها برای حضور (۱) و عدم حضور (صفر) باند امتیازبندی شدند. برای تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYS 2.21j (Rohlf 2010) بهره‌گیری شد. محتوی اطلاعات چند شکلی (Polymorphic information content, PIC) هر یک از آغازگرهای RAPD با استفاده از رابطه $PIC_i = 1 - \Sigma p_i^2$ (Powell et al. 1996) محاسبه شد، که p_i^2 برابر با فراوانی iام آلل است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

جدول ۱- مکان‌های جمع‌آوری نمونه‌های لاله‌ی واژگون

نام منطقه	نام استان	کد نمونه	تعداد نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	حداقل ارتفاع
استهبان	فارس	E1 الی E20	۲۰	۵۴°۴۱′۳۲/۴″	۲۹°۳۴′۱۲/۶″	۲۵۹۸
گردنه‌ی‌مورپرسه	کهگلویه‌وبویراحمد	Y1 الی Y20	۲۰	۵۱°۳۹′۵۷/۶″	۳۰°۳۲′۳۷/۲″	۲۶۴۸
آستانه	اصفهان	A1 الی A20	۲۰	۵۱°۵۱′۳۱/۷″	۳۱°۵۷′۲۱/۲″	۲۶۹۸
کوهرنگ	چهارمحال‌وبختیاری	K1 الی K20	۲۰	۵۰°۱۳′۴۹/۹″	۳۲°۳۴′۶/۸″	۲۵۶۳
گلستان‌کوه	اصفهان	G1 الی G20	۲۰	۵۰°۲۳′۵۷/۱″	۳۳°۹′۱۲/۴″	۲۷۶۵
اشتران‌کوه	لرستان	O1 الی O20	۲۰	۴۹°۱۲′۱/۳″	۳۳°۲۱′۴۱/۴″	۲۷۴۵
پرو	کرمانشاه	P1 الی P20	۲۰	۴۷°۲۲′۳۴/۱″	۳۴°۳۳′۴۵/۶″	۲۶۹۴
گردنه دولاب	کردستان	Kr1 الی Kr20	۲۰	۴۷°۴۴′۲۷/۳″	۳۵°۲′۲۳/۵″	۲۶۵۰



شکل۲- الگوی الکتروفورزی به‌دست آمده از نشانگر RAPD در جمعیت لاله‌ی واژگون کوهرنگ وگلستان‌کوه بر روی آگارز۱/۵ درصد. M سایز مارکر DNA لدر ۱۰۰ bp.

حداکثر PIC برای نشانگرهای غالب ۰/۵ می باشد. شاخص مارکر (Marker Index, MI)، با استفاده از معادله MI=DI×EMR محاسبه شد. در این رابطه DI شاخص تنوع (Diversity Index) و EMR ضریب موثر چندگانه (Effective Multiplex Ratio) می‌باشد، که $DI=1-\Sigma p_i^2$ و $EMR=n_p\beta_i$ است، که p_i فراوانی iام آلل، np تعداد مکان‌های چند شکل و βi نسبتی از مکان‌های چند شکل می‌باشد، و به صورت $\beta=n_{np}/(np+\beta)$ محاسبه می‌شود که n_{np} تعداد مکان‌های تک شکل است. قدرت تفکیک (Resolving Power, R_P) هر آغازگر بر اساس فرمول $R_P=\Sigma I_b$ محاسبه می‌شود که در آن $I_b=1-[2\times|0.5-p|]$ که p نسبت ژنوتیپ‌هایی است که حاوی آن قطعه می‌باشد (Prevost and Wilkinson 1999). دندروگرام روابط ژنتیکی به وسیله‌ی تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد به دست آمد.

آزمون منتل برای ارزیابی مطابقت بین ماتریس تشابه جاکارد و دندروگرام انجام شد (Mantel 1967)، و در نهایت تقسیم‌بندی سلسله مراتب واریانس مولکولی بین و درون جمعیت‌های مورد بررسی انجام شد. تجزیه و تحلیل مذبور با استفاده از نرم افزار GenAlex6.4 انجام شد، و معنی‌دار بودن واریانس ها ۱۰۰۰ بار مورد آزمون قرار گرفت (Peakall and Smouse 2010). تجزیه تنوع ژنی بین و داخل جمعیت‌های لاله‌ی واژگون با استفاده از نرم افزار POPGENE3.1 انجام شد، سلسله مراتب تنوع ژنی شامل: تعداد آلل‌های مشاهده شده (na)، تعداد آلل های مؤثر(ne) تنوع ژنی نی (h)، شاخص شانون (I)، تنوع ژنی کل (Ht) تنوع ژنی داخل جمعیت‌ها (Hs) و تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst) می‌باشد (Yeh et al. 1999). آزمون منتل برای مطابقت بین ماتریس فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیائی انجام شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

نتایج و بحث

در ابتدا چهار نمونه از جمعیت‌های مختلف لاله‌ی واژگون انتخاب و تعداد ۴۰ آغازگر الیگونوکلئوتیدی ده مری به منظور شناسائی آغازگرهای چند شکل و تکرارپذیر مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت و تعداد ۱۰ آغازگر انتخاب که چهار آغازگر به دلیل تولید الگوی نواری تک شکل حذف گردیدند. در نهایت، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های لاله‌ی واژگون *F. imperialis* با استفاده از نشانگر RAPD، از شش آغازگر با چند شکلی بالا و الگوی باندی مشخص و تکرارپذیر استفاده شد. Yamagishi et al. (2010) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های *F. camschatcensis* از شش آغازگر الیگونوکلئوتیدی تصادفی استفاده نمودند. مقادیر محتوای اطلاعات چند شکل برای هر یک از آغازگرهای مورد استفاده، به همراه نوع آغازگرها و تعداد نوارهای چند شکل در (جدول ۲) آورده شده است. شش آغازگر مورد استفاده در مجموع ۸۱ نوار ایجادکردند، که از بین آن‌ها ۷۱ نوار چند شکل بودند. اندازه نوارها بین ۲۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز متغیر بود. میانگین درصد پلی‌مورفیسم مشاهده شده برابر با ۸۳/۲ درصد و میانگین تعداد نوارهای چند شکل به ازای هر واحد سنجش برابر با ۱۲ نوار بود. در مورد نشانگرهای RAPD هر واحد سنجش معادل یک آغازگر می‌باشد. بیشترین مقدار PIC، ۰/۴ و مربوط به آغازگر OPG36 و کمترین میزان آن ۰/۱۲ و مربوط به آغازگر OPM16 می‌باشد. میانگین PIC محاسبه شده در این تحقیق ۰/۲۵ برآورد گردید که در مقایسه با مقدار حداکثر تئوریکی ۰/۵ برای نشانگرهای غالب کم بوده و می‌توان نتیجه گرفت که تعداد نوارهای ارزشی تولیدی کم می‌باشد. شاخص نشانگر بر اساس تعداد نوارهای چند شکل برای هر آغازگر محاسبه شد، که از ۰/۱۳ تا ۶/۰۸ متغیر بود. OPG36 دارای بالاترین شاخص نشانگر و برابر با ۶/۰۸ می‌باشد، که این نشان‌دهنده‌ی قدرت تفکیک بالای این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرها می‌باشد. آغازگرهای OPM16 با شاخص نشانگری ۰/۱۳ قدرت تفکیک چندانی در مقایسه با سایر آغازگرها نداشت. میزان قدرت تفکیک شش آغازگر مورد استفاده در این بررسی محاسبه شد که نشان دهنده پتانسیل بالای این آغازگرها در تفکیک هشت جمعیت لاله‌ی واژگون جمع‌آوری شده از منطقه زاگرس ایران می‌باشد. آغازگر OPG36 دارای بیشترین میزان قدرت تفکیک با مقدار ۹/۵۲ و آغازگر OPM16 دارای کمترین قدرت تفکیک و برابر با مقدار ۱/۲۷ می‌باشد. بر اساس نشانگر RAPD میزان شباهت ژنتیکی بین افراد از۰/۱۷ تا ۰/۹۵ متغییر بود. ضریب همبستگی کوفنتیکی به دست آمده بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۰/۸ و آماره t منتل ۳۷/۵ می‌باشد، که نشان دهنده‌ی برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی می‌باشد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای در شکل (۴) نشان داده شده است. بر اساس میزان شاخص F رایت (F=۱۷/۱۴) دندروگرام در فاصله‌ی ۰/۴۵ به سه گروه اصلی تقسیم می‌شود؛ گروه اصلی اول تنها شامل جمعیت کوهرنگ، گروه اصلی دوم شامل: جمعیت‌های کردستان، پرو، یاسوج و آستانه می‌باشد، و گروه اصلی سوم شامل جمعیت‌های گلستان‌کوه، اشترانکوه و استهبان فارس می‌باشد. از نکات قابل توجه در این دندروگرام، این است که ۱۶۰ لاله‌ی واژگون متعلق به هشت جمعیت به خوبی از هم جدا شده‌اند، و در گروه‌های مجزا و خاص- جمعیتی قرار گرفته‌اند، که نشان‌دهنده‌ی وجود تمایز ژنتیکی بالا بین جمعیت‌ها می‌باشد. Yamagishi et al. (2010) در مطالعه‌ای بر روی *F. camschatcensis* نیز نشان دادند که تمایز ژنتیکی بالایی بین سه جمعیت مورد مطالعه وجود دارد و افراد متعلق به هر جمعیت در گروه‌های مجزا و خاص- جمعیتی قرار گرفتند. همچنین می‌توان نتیجه گرفت به دلیل فاصله زیاد بین جمعیت‌ها و تکثیر غیرجنسی لاله واژگون جریان ژنی در جمعیت‌های مورد مطالعه عمدتاً درون جمعیت‌ها و کمتر بین جمعیت‌ها اتفاق می‌افتد. Hamrick et al. (1991) بیان نمود گونه‌هایی که میزان جریان ژنی در آنها محدودتر است تمایز بیشتری بین جمعیت‌های آنها اتفاق می‌افتد و در مقابل هر چقدر میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها بیشتر باشد باعث همگن‌تر شدن جمعیت‌ها و عدم تمایز ژنتیکی بین آنها می‌گردد (Slatkin 1987). تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی منعکس کننده برهمکنش‌های طیف وسیعی از فرآیندهای مختلف در طول زمان می‌باشد، که از آن جمله می‌توان تاریخچه تکامل گونه‌ها، جدا شدن زیستگاه‌ها، رانده شدن ژنتیکی، سیستم‌های گرده‌افشانی و موتاسیون را نام برد (Hamrick and Godt 1996; Zhang et al.

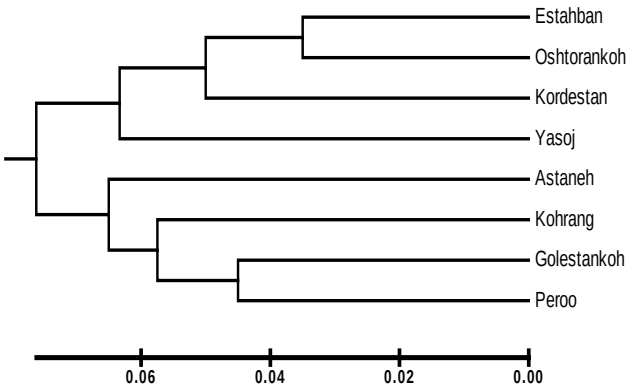
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

جدول ۲- درصد چند شکلی و محتوای اطلاعاتی شش آغازگر RAPD مورد استفاده برای ۱۶۰ژنوتیپ لاله‌ی واژگون

نام آغازگر	توالی آغازگر	N	N_{np}	N_P	POL	MI	Rp	PIC
OPG36	gAgCgTCgAA	۱۵	۰	۱۵	۱۰۰	۶/۰۸	۹/۵۲	۰/۴
OPG8	gTgACgTAgg	۱۳	۱	۱۲	۹۲/۳	۲/۱۹	۳/۵۱	۰/۱۹
OPM16	CACACTCCAg	۸	۵	۳	۳۷/۵	۰/۱۳	۱/۲۷	۰/۱۲
OPG37	CCCAgCTgTg	۱۲	۳	۹	۷۵	۱/۳۲	۳/۵۶	۰/۲۱
OPG15	TTCCgAACCC	۱۵	۰	۱۵	۱۰۰	۴/۱۳	۵/۷۳	۰/۲۷
OPG12	TCggCgATAg	۱۸	۱	۱۷	۹۴/۴	۵/۰۹	۸/۷۸	۰/۳۱
	مجموع	۸۱	۱۰	۷۱	–	–	–	–
	میانگین	۱۳/۵	۱/۷	/۸	۸۳/۲	۳/۱۶	۴/۵	۰/۲۵

N) تعداد کل باندها؛ N_{np}) تعداد باندهای تک شکل؛ N_p) تعداد باندهای چند شکل؛ POL) درصد چند شکلی؛MI) شاخص آغازگر؛ PIC) محتوای اطلاعات چند شکلی؛Rp) قدرت تفکیک.

2010). نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنی در (جدول ۳) نشان داده شده است. درصد آللهای چند شکل (PPB) بین جمعیت‌های لاله‌ی واژگون توسط نشانگر تصادفی RAPD حدود ۸۷/۶۵ برآورد گردید. با استفاده از نشانگر AFLP چنین درصد بالای چندشکلی (۹۱/۹۳ درصد) در بین نه جمعیت *F. cirrhosa* گزارش شد (Zhang et al. 2010). در مطالعه حاضر میانگین PPB درون هشت جمعیت لاله‌ی واژگون حدود ۴۴/۶۳ درصد برآورد گردید. درصد پایین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های *F. imperialis* با مطالعه Zhang et al. (2010) بر روی *F. cirrhosa* مطابقت داشت. آنها با استفاده از نشانگر AFLP تنوع ژنتیکی بالا (۷۴ درصد) بین جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی پایین (حدود ۲۵ درصد) درون جمعیت‌های مورد مطالعه برآورد نمودند. همچنین Yamagishi et al. (2010) میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های *F. camschatcensis* را ۶۴/۳ درصد برآورد نمودند. به طور کلی بالا بودن تنوع ژنتیکی باعث بالا رفتن قدرت مقابله گیاهان با تغییرات محیطی می‌شود، و برعکس کاهش تنوع ژنتیکی باعث کاهش تعداد افراد سازگار با شرایط محیطی می‌شود، و در نتیجه قدرت مقابله با شرایط نامساعد محیطی کم می‌شود (Weising et al. 1995). میزان تنوع ژنی نی (h) ۰/۲۳۴ و شاخص شانون (I) ۰/۳۶۳ برآورد گردید. تنوع ژنی کل (Ht) ۰/۲۳۴ و تنوع ژنی درون جمعیت‌ها (Hs) ۰/۱۳۸ و تنوع ژنی بین جمعیت‌ها برابر با ۰/۴۰۸ برآورد شد (جدول ۳). میزان h و I بین هشت جمعیت بیشتر از درون جمعیت‌ها برآورد شد. این نتایج نشان می‌دهد که بیشتر تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های لاله‌ی واژگون قرار گرفته است و درون جمعیت‌ها تنوع کمتری وجود دارد. این نتایج با مطالعه Naik et al. (2010) بر روی *Podophyllum hexandrum* مطابقت داشت. تنوع ژنی و جریان ژنی از شاخص‌های با اهمیت است که ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را در یک گونه مشخص می‌کند. میانگین Gst (مشابهFst) برای هشت جمعیت لاله‌ی واژگون ۰/۴۰۸ برآورد گردید که می‌توان نتیجه گرفت درصد نسبتا بالائی از واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌های لاله‌ی واژگون تقسیم بندی شده است.



شکل۴- دندروگرام جمعیت‌های لاله‌ی واژگون بر اساس فواصل ژنتیکی Fst با استفاده از روش UPGMA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

جدول ۳- تجزیه تنوع ژنی برای هشت جمعیت لاله‌ی واژگون

جمعیت	n	na	ne	h	I	PPB%	Ht	Hs	Gst	Nm
استهبان	۲۰	۱/۴۲۰	۱/۲۳۸	۰/۱۳۷	۰/۲۰۵	۴۱/۹۸				
یاسوج	۲۰	۱/۴۴۴	۱/۲۵۳	۰/۱۴۸	۰/۲۲۲	۴۴/۴۴				
کوهرنگ	۲۰	۱/۶۱۷	۱/۲۶۹	۰/۱۶۸	۰/۲۶۳	۶۱/۷۳				
استانه	۲۰	۱/۳۸۳	۱/۱۶۴	۰/۱۰۲	۰/۱۶۰	۳۸/۲۷				
گلستان کوه	۲۰	۱/۵۱۸	۱/۲۷۷	۰/۱۶۸	۰/۲۵۶	۵۱/۸۵				
اشترانکوه	۲۰	۱/۵۰۶	۱/۲۷۱	۰/۱۵۹	۰/۲۴۰	۵۰/۶۲				
پرو	۲۰	۱/۳۹۵	۱/۱۸۲	۰/۱۱۱	۰/۱۷۲	۳۹/۵۱				
کردستان	۲۰	۱/۳۵۸	۱/۱۸۹	۰/۱۱۴	۰/۱۷۳	۳۵/۸۰				
کل جمعیت‌ها	۱۶۰	۱/۸۷۶	۱/۳۸۴	۰/۲۳۴	۰/۳۶۳	۸۷/۶۵	۰/۲۳۴	۰/۱۳۸	۰/۴۰۸	۰/۷۲۵

N) تعداد نمونه‌ها؛ Ht) تنوع ژنی کل؛ Hs) تنوع ژنی درون جمعیت‌ها؛ Gst) تنوع ژنی بین جمعیت‌ها؛ h) تعداد آلل مشاهده شده؛ I) شاخص شانون؛ Na) تنوع ژنی لی؛ ne) تعدادآلل‌های مؤثر.

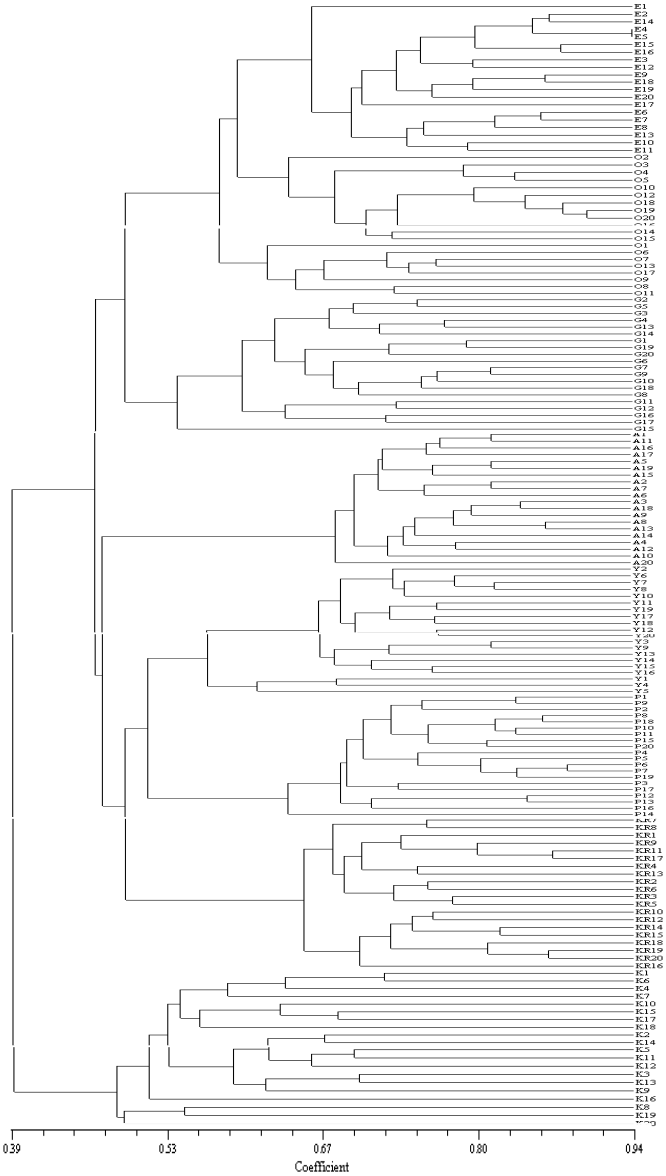
در این مطالعه ماتریس فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب فاصله Fst محاسه شد (جدول۴). فواصل ژنتیکی Fst بین جمعیت‌ها ۰/۰۷تا ۰/۱۸۴ محاسبه شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های گلستان‌کوه و یاسوج و جمعیت‌های کوهرنگ و یاسوج و جمعیت‌های کردستان و کوهرنگ به میزان ۰/۱۸۴، وکمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های اشترانکوه و استهبان به میزان ۰/۰۷ می‌باشد. ماتریس Fst (بین جمعیت‌ها) به عنوان فایل ورودی نرم افزار Mega قرار گرفت، و دندروگرام بین جمعیت‌ها محاسبه و رسم گردید. شکل ۴ دندروگرام حاصل از خوشه‌بندی هشت جمعیت لاله‌ی واژگون ماتریس فاصله ژنتیکی Fst با استفاده از الگوریتم UPGMA را نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود، هشت جمعیت مورد بررسی در فاصله ژنتیکی ۰/۰۱ به دو خوشه تقسیم شده‌اند؛ در خوشه‌ی اول استهبان، اشترانکوه، کردستان و یاسوج، در خوشه‌ی دوم گلستان‌کوه، کوهرنگ، آستانه و پرو قرار گرفته است. قرار گرفتن جمعیت ها در دو خوشه بر اساس منطقه جغرافیائی (زاگرس جنوبی، مرکزی و شمال-غرب) صورت نگرفته است. آزمون منتل بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیائی عدم ارتباط بین این دو را تایید می‌کند و همبستگی ضعیف (۰/۰۱ = P، ۰/۱۵۷ = r) ولی معنی‌داری برآورد گردید. آنالیز واریانس مولکولی بر اساس پراکندگی جغرافیائی و بدون احتساب گروه-بندی صورت گرفت. بر اساس این تجزیه و تحلیل، واریانس بین جمعیت‌ها ۴۵ درصد می‌باشد، که نشان‌دهنده‌ی وجود تنوع نسبتا بالا در بین جمعیت‌هاست و همچنین واریانس درون جمعیت‌ها ۵۵ درصد برآورد شده است که از لحاظ آماری بسیار معنی‌دار می‌باشد، و نشان‌دهنده‌ی وجود تنوع نسبتا بالا در داخل جمعیت‌ها است. Φpt (سهم واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌هاست که از طریق AMOVA محاسبه می‌شود و معادل Gst و Fst می‌باشد) ۰/۴۴۷ برآورد شد که تایید کننده تجزیه قبلی می‌باشد. بر اساس Wright (1978) چنانچه Fst بیشتر از ۰/۱۵ باشد ساختار ژنتیکی جمعیت تمایز بالائی از خود نشان می‌دهد. در این مطالعه میزان Fst نشان می‌دهد که تمایز ژنتیکی بالائی بین جمعیت‌های لاله واژگون اتفاق افتاده است و میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها بسیار پایین می‌باشد. جریان ژنی پایین به دلیل فاصله جغرافیایی زیاد بین جمعیت‌ها ناشی می‌شود که پراکندگی اسپورها، گامت‌ها یا پیازهای رویشی را بین جمعیت‌های مورد مطالعه محدود می نماید. اکولوژی، طبقه‌بندی، گیاه‌شناسی و خصوصیات زراعی لاله واژگون توسط Beck (1953) و Rix (1971) مشخص شده است. لاله‌ی واژگون در اوایل بهار از پیازهای زیرزمینی رشد می‌کند و توسط پیاز ازدیاد رویشی می‌یابد. این گیاه همچنین از طریق بذر تکثیر می‌یابد و دوره گلدهی آن حدود ۶-۸ سال طول می‌کشد (Ekim et al. 1992; Rix 1971). خودگشنی در لاله واژگون اتفاق نمی‌افتد (Burquez 1989) و به دلایل ژنتیکی درصد تشکیل بذر پایین می‌باشد. Burouez (1987). گزارش نمود که پرندگان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

کوچک در گرده افشانی این گیاه نقش دارند. بنابراین انتقال اسپرم، زیگوت و پیاز رویشی در لاله واژگون در فاصله جغرافیایی زیاد به ندرت اتفاق می‌افتد و فاصله زیاد جغرافیایی (۱۵۰ Km<) بین دو رویشگاه مانع جغرافیایی جهت جریان ژنی بین جمعیت‌های لاله‌ی واژگون محسوب می‌گردد. در این مطالعه میزان جریان ژنی (Nm) ۰/۷ برآورد گردید. در مطالعات ژنتیک جمعیتی میزان جریان ژنی Nm<1 (کمتر از یک مهاجر در هر نسل در یک جمعیت) به عنوان آستانه تمایز در نظر گرفته می‌شود و میزان برآورد کمتر از آن نشان دهنده تمایز معنی‌دار بین جمعیت‌ها می‌باشد (Slatkin 1987). بنابراین بالا بودن تنوع در درون جمعیت‌ها خود عاملی است که از انقراض جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند. حفظ تنوع ژنتیکی یکی از اهداف اصلی حفاظت گونه‌های در حال انقراض می‌باشد (Hamrick and Godt 1996). ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های گیاهی اطلاعات ضروری در رابطه با مدیریت صحیح حفاظت از منابع ژنتیکی فراهم می‌کند (Milligan et al. 1994). نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که مدیریت صحیح برای حفاظت جمعیت‌های وحشی لاله‌ی واژگون از اهمیت بالائی برخوردار می‌باشد و رعایت نکات زیر در حفظ این گونه در حال انقراض ضروری می‌باشد. اول اینکه برداشت پیازهای بالغ این گیاه در رویشگاه‌های طبیعی این گیاه ممنوع گردد. چرا که کاهش در تعداد افراد جمعیت‌ها همچنان به عنوان یک تهدید در مورد این گیاهان باقی مانده است، بنابراین حفظ بزرگی جمعیت به منظور وجود افراد بالغ کافی و در نتیجه تولید مثل رویشی و زایشی در این گونه لازم و ضروری می‌باشد. دوم اینکه همه رویشگاه‌های طبیعی و موجود این گیاه به عنوان منابع ژنتیکی مستقل در مناطق مختلف کشور حفاظت گردد. سوم اینکه جمع‌آوری ژرم‌پلاسم این گیاه به صورت بذر انجام گردد. در نهایت اهلی‌سازی و کشت این گیاه شروع شود و وزرات جهاد کشاورزی ایران برنامه‌ای جهت تشویق افراد محلی به کشت این گیاه تعریف نماید تا فشار برداشت از جمعیت‌های وحشی گیاه کاسته شود.

سپاسگزاری

نویسنده مسئول مقاله از دانشگاه شهرکرد به خاطر فراهم نمودن شرایط لازم و هزینه‌های طرح تشکر و قدردانی می‌نماید. همچنین از مراکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی و اداره حفاظت محیط زیست شهرکرد، یاسوج، خرم‌آباد، کرمانشاه، کردستان، اصفهان و شیراز به خاطر دسترسی به مواد گیاهی بی نهایت تشکر می‌شود چون بدون همکاری این عزیزان امکان انجام چنین پژوهشی امکان پذیر نبود.



شکل ۳- دندروگرام جمعیت‌های لاله‌ی واژگون بر اساس ضریب جاکارد و با استفاده از روش UPGMA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

جدول ۴- ماتریس فاصله ژنتیکی Fst بین هشت جمعیت لاله‌ی واژگون منطقه‌ی زاگرس

جمعیت	استهبان	یاسوج	کوهرنگ	آستانه	گلستانکوه	اشتران‌کوه	پرو	کردستان
استهبان	۰/۰۰							
یاسوج	۰/۱۲۹	۰/۰۰						
کوهرنگ	۰/۱۶۷	۰/۱۸۴	۰/۰۰					
آستانه	۰/۱۵۸	۰/۱۷۶	۰/۱۳۶	۰/۰۰				
گلستان‌کوه	۰/۱۰۸	۰/۱۸۴	۰/۰۹۰	۰/۱۳۳	۰/۰۰			
اشتران‌کوه	۰/۰۷۰	۰/۱۳۵	۰/۱۷۲	۰/۱۶۱	۰/۱۵۲	۰/۰۰		
پرو	۰/۱۱۴	۰/۱۱۰	۰/۱۳۸	۰/۱۲۱	۰/۰۸۹	۰/۱۶۷	۰/۰۰	
کردستان	۰/۱۰۷	۰/۱۱۲	۰/۱۸۴	۰/۱۴۵	۰/۱۴۷	۰/۰۹۱	۰/۱۱۶	۰/۰۰

منابع

Beck J (1953) Fritillaries, a gardener's introduction to the genus *Fritillaria*. Faber and Faber, London.

Burquez A (1989) Blue tits, *Parus caeruleus,* as pollinators of the crown imperial, *Fritillaria imperialis,* in Britain. Oikos, 55:335-340.

Dehertogh A and Lenard M (1993) The physiology of flower bulbs. Elsevier Sci. Pub BV USA 254.

Ekim T, Arslan N, Koyuncu M (1992) Exported flower bulbs from Turkey and measurements taken. Acta Hort 325:861-866

Hamrick JL, Godt MJW, Murawshi DA, Loveless MD (1991) Correlation between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE (Eds), Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, USA, pp 75-86

Hamrick JL, Godt MJW (1996) Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise JC, Hamrick JL (Eds), Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman and Hall, New York, USA, pp 281-304

Hogbin PM and Peakall R (1999) Evaluation of the Contribution of Genetic Research to the Management of the Endangered Plant *Zieria prostrata*. Conser Biol 13:514-522

Kang DG, Sohn EJ, Lee YM, Lee AS, Han JH, Kim TY, Lee HS (2004) Effects of bulbus *Fritillaria* water extract on blood pressure and renal functions in the LNAME-induced hypertensive rats. J Ethnopharm 91:51-56

Kitajima J, Noda N, Ida Y, Miyahara K, Kawasaki T (1981) Steroidal alkaloids of fresh bulbs of *Fritillaria thunbergi* and of crude drug 'bai-mo' prepared therefrom. Heterocycles 15:791-796

Liu XX, Chen C, Pan LL, Chen YH, Fu CX (2010) Genetic diversity of bulbus *Fritillariae thunbergii* Miq. varieties based on ISSR markers. Journal of Zhejiang University (Agric and Life Sci) 36:246-254

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

Milligan BG, Leebens-Mack J, Strand AE (1994) Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. Mol Ecol 3:423-435

Murray HC and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res 8:4321-4325.

Naik PK, Alam MF, Singh H, Goyal V, Parida S, Kalia S, Mohapatra T (2010) Assessment of genetic diversity through RAPD, ISSR and AFLP markers in *Podophyllum hexandrum*: a medicinal herb from the Northwestern Himalayan region. Physiol Mol Biol Plants 16:135-148

Peakall R, Smouse PE (2010) GenAlEx 6.4: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288-295

Perry LM (1980) Medicinal Plants of East and South East Asia. MIT Press, Cambridge, MA, pp 236-237

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey Mm Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breed 2:225-238

Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet 98:107-112

Rix EM (1971) The taxonomy of the genus *Fritillaria* L. in the eastern Mediterranean region. PhD thesis, University of Cambridge. Corpus Christy College, Cambridge.

Rohlf FJ (2010) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.21j. Exeter Software. Setauket, New York.

Shiran B, Amirbakhtiar N, Kiani S, Mohammadi S, Tabatabaei BE, Mordi H(2007) Molecular characterization and genetic relationship among Iranian Almond cultivars

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]

assessed by RAPD and SSR markers. Scientia Hort 111:280-292.
Slatkin M (1987) Gene flow and geographic structure of natural populations. Science (Washington, DC) 236:787-792
Tsukamoto Y (1989) The Grand Dictionary of Horticulture. Shogakukan, Tokyo 4:271
Weising K, Nybom H, Wolf K, Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Fla. P.322
Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18:6531-6535
Wright S (1978) Evolution and genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago.
Yamagishi M, Nishioka M, Kondo T (2010) Phenetic diversity in the *Fritillaria camschatcensis* population growen on the Sapporo campus of Hokkaido University. Landscape Ecol Eng 6:75-79
Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) Popgene version 1.31, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research
Zhang DQ, Gao LM, Yang YP (2010) Genetic diversity and structure of a traditional Chinese medicinal plant species, *Fritillaria cirrhosa* (Liliaceae) in southwest China and implications for its conservation. Biochem Sys Ecol 38:236-242

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.5.6]