

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌های جنس *Tulipa L.* (لاله) در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی CDDP

مریم حائری نسب^۱، نفیسه کریمیان^۲، نسترن جلیلیان^{۳*} و مهدی یوسفی^۴

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

۳- *نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار پژوهش، بخش تحقیقات جنگل و مرتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه. پست الکترونیک: n.jalilian@areeo.ac.ir

۴- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۴

چکیده

جنس *Tulipa* (لاله) متعلق به تیره Liliaceae می‌باشد و از مهمترین گیاهان پیازی زینتی است که به‌منظور تولید گل شاخه بریده، گیاه گلدانی و استفاده در فضای سبز در سرتاسر دنیا کاشته می‌شود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۴۶ اکسشن متعلق به ۹ گونه از جنس لاله با استفاده از ۱۹ آغازگر CDDP بررسی شد. در مجموع ۲۶۵ باند تکثیر شد که تمامی آنها چندشکل بودند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر ۱۳/۹ بود. آغازگر ۵ (ABPI-1) با داشتن بهترین پارامترهای نشانگری به‌عنوان بهترین آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در این مطالعه معرفی شد. محاسبه پارامترهای تنوع ژنتیکی، بیشترین تنوع را در بین افراد گونه *T. systola* نشان داد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون گونه‌ای (۷۷٪) در مقایسه با تنوع بین گونه‌ای (۲۳٪) بیشتر بود. در ارزیابی ماتریس فاصله بر اساس ضریب تشابه دایس گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*، بیشترین فاصله مربوط به گونه‌های *T. armena* و *T. clusiana* (۰/۶۸۴) و کمترین فاصله مربوط به گونه‌های *T. schrenkii* و *T. systola* (۰/۲۶۷) بود. به دلیل بالا بودن سهم واریانس درون گونه‌ای نسبت به بین گونه‌ای، گروه‌بندی گونه‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای با گروه‌بندی آنها به روش تجزیه به مختصات اصلی مطابقت کامل نداشت. اما به‌رحال اکسشن‌های مختلف متعلق به گونه‌های *T. micheliana*، *T. clusiana* و *T. lehmanniana* به خوبی تفکیک شدند. این مطالعه نشان داد که اظهارنظر در مورد کارآیی دقیق نشانگر CDDP در ارتباط با جنس *Tulipa* نیاز به مطالعه جامع تنوع ژنتیکی از نقاط مختلف پراکنش این جنس در ایران دارد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، تنوع ژنتیکی، لاله، نشانگر مولکولی

مقدمه

جنس *Tulipa L.* (لاله) متعلق به تیره Liliaceae، راسته Liliales و رده Liliidae می‌باشد و از مهمترین

گیاهان پیازی زینتی در سرتاسر دنیاست (Wendelbo, 1977). تعدادی از گونه‌های این جنس محدود به آسیای غربی، آسیای شرقی و هیمالیا هستند (Wendelbo,

مورفولوژیک محدود بوده و تحت تأثیر سن گیاه و محیط قرار دارند، امروزه از روش‌های مطمئن‌تری مانند نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود (Meghwal et al., 2014). گونه‌های لاله بسیار چند شکل هستند و از نظر صفت‌هایی مثل رنگ و شکل قطعات گلپوش یا وجود لکه در قاعده آنها متنوع هستند که شناسایی و تفکیک گونه‌ها تنها بر پایه صفات مورفولوژیک دشوار است (Rechinger, 1990). گزارش‌های اندکی بر روی تنوع ژنتیکی مولکولی جنس *Tulipa* در ایران وجود دارد که می‌توان به آنالیز مولکولی گونه‌های لاله با استفاده از نشانگر ISSR اشاره کرد که در این مطالعه Kiani و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی روابط ژنتیکی ۳۹ اکسشن از گونه‌های مختلف لاله از استان‌های خراسان و یزد، تنوع ژنتیکی پایینی را در داخل اکسشن‌های گونه‌های *T. micheliana* و *T. lehmaniana* تشخیص دادند و این نشانگر را به‌عنوان ابزاری مفید در شناسایی اکسشن‌های لاله معرفی کردند. در دومین مطالعه، Pourkhaloee و همکاران (۲۰۱۸) تنوع ژنتیکی و فیلوژنی ۲۸۰ فرد از ۳۶ اکسشن از لاله‌های وحشی و کاشته شده از دو کشور ایران و هلند را بر اساس نشانگرهای ریزماهوره (SSR) درون توالی‌های بیان شده برچسب‌دار^۱ مورد ارزیابی قرار دادند و در گونه *T. systola* بیشترین پارامترهای تنوع ژنتیکی را تشخیص داده و گزارش نمودند، به طوری که به دلیل تنوع بالای ژنتیکی لاله‌های وحشی در مقایسه با لاله‌های کاشته شده می‌توان از آنها به‌عنوان یک منبع از آل‌های مفید برای مقاومت در برابر تنش‌ها استفاده کرد.

دسترسی به دانش مناسب از سطوح و الگوهای تنوع ژنتیکی در جهت تدوین راهبردهای حفاظت مؤثر و بهره‌برداری پایدار از منابع ژنتیکی ضروریست. به طوری که اطلاعات در زمینه تنوع ژنتیکی گیاهان برای توسعه راهبردهای مناسب در بیولوژی حفظ منابع طبیعی به خوبی در بسیاری دیگر از زمینه‌ها کاربردی شده است (Laikre et al., 2009). تنوع ژنتیکی یا تنوع درون تاکسونی به تنوع ژن‌های درون یک گونه و یا تعداد آل-

۱۹۷۷). جنس لاله از بزرگ‌ترین محصولات گل‌کاری در جهان است که دارای صدها کولتیوار می‌باشد و موارد مصرف آنها به صورت گیاه گلدانی، گل شاخه بریده و کاشت در فضای سبز است. تعداد گونه‌های این جنس در جهان متفاوت گزارش شده است، به طوری که در مناطق معتدله و نیمه گرمسیری اروپا، آسیا و شمال آفریقا بیش از ۱۰۰ گونه (Hall, 1940; Botschantzeva, 1962) و در گزارشی دیگر ۸۰ گونه (Wendelbo, 1977) ذکر شده است. Boissier (۱۸۸۲) تعداد گونه‌های جنس لاله را در ایران ۷ گونه و ۴ واریته، Parsa (۱۹۵۰) ۲۳ گونه، Wendelbo (۱۹۷۷) ۱۲ گونه و Rechinger (۱۹۹۰) ۱۹ گونه و یک واریته ذکر کرده‌اند. Matin (۱۹۹۷) بر اساس مطالعات مورفولوژی تعداد ۱۸ گونه و یک واریته و Jalilian و همکاران (۲۰۱۷ و ۲۰۱۹) نیز در نگارش فلور این جنس در ایران تعداد ۱۲ گونه و یک واریته متعلق به دو زیرجنس و ۸ بخش را شناسایی کردند. گونه‌های مختلف جنس لاله در نواحی کوهستانی سراسر کشور در دامنه ارتفاعی ۲۳۰ تا ۳۵۰۰ متر از سطح دریا پراکنش دارند (Jalilian et al., 2017, 2019). Rechinger (۱۹۹۰) جنس *Tulipa* را با استفاده از رده بندی Hall (۱۹۴۰) و بر اساس وجود کرک در قاعده میله پرچم به دو زیرجنس *Eriostemones* Boiss. و *Leiostemones* Boiss. (= *Tulipa*) تقسیم نمود. Van Raamsdonk و همکاران (۱۹۹۷) زیرجنس *Tulipa* را به ۵ بخش گروه‌بندی کردند. Zonneveld (۲۰۰۹) بر اساس اندازه ژنوم هسته‌ای و مطالعه روابط بیش از ۴۰ اکسشن متعلق به ۱۲۳ تاکسون از جنس *Tulipa*، چهار زیرجنس شامل *Tulipa*, *Clusianae* (Baker) Zonn. و *Orithyia* (D. و *Eriostemones* (Boiss.) Raamsd Don) Baker و ۱۲ بخش را گروه‌بندی کرد.

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA استفاده می‌شود. از جمله روش‌های کلاسیک، استفاده از صفات مورفولوژیک است، اما با توجه به اینکه تعداد صفات

پژوهش از هر بار بیوم‌های سراسر کشور دریافت شد. مشخصات مربوط به نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج DNA

استخراج DNA از برگ‌های خشک ۴۶ فرد (اکسشن) متعلق به ۹ گونه از جنس *Tulipa* که از هر بار بیوم‌های سراسر کشور دریافت شده بود (جدول ۱) به روش CTAB برگرفته از Doyle و Doyle (۱۹۸۷) با انجام یک سری تغییرات انجام شد. برای حصول اطمینان از کمیت و کیفیت DNA از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه موقعیت و شدت باند حاصل با نشانگر λ استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش PCR با استفاده از ۲۱ آغازگر CDDP (Collard and Mackill, 2009) (جدول ۲) ساخته شده توسط شرکت Metabion (آلمان) و در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر توسط دستگاه ترموسایکلر گرادینت (مدل My Cycler, شرکت Bio-Rad) انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۸ میکرومول از آغازگر، بافر PCR 1x، ۰/۲۴ میلی‌مول از مخلوط *dntp*، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی بود. واسرشت سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و به دنبال آن ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR برای کنترل کیفی روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. برای آشکارسازی و عکس‌برداری قطعات DNA تکثیر شده از دستگاه ژل داگ (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System) شرکت Bio-Rad استفاده شد. در این پژوهش از مجموع ۲۱ آغازگر استفاده شده، دو آغازگر نتوانستند باندهای قابل امتیازدهی را تکثیر نمایند (جدول ۲).

های ژنی درون یک جمعیت اشاره می‌کند. از سوی دیگر می‌توان گفت با کاهش تنوع ژنتیکی، خطر انقراض گونه‌ها افزایش می‌یابد (Ejtehadi et al., 2009). برای تعیین تقدم حفاظتی گونه‌های زراعی و معادل‌های وحشی هم‌خانواده با آنها، بررسی تنوع و تفاوت ژنتیکی افراد درون گونه از اهمیت زیادی برخوردار است و از طریق مطالعه تنوع گیاهی، می‌توان پویایی جامعه گیاهی را بررسی نمود (Ejtehadi et al., 2009).

تکنیک چندشکلی مشتق شده از DNA حفاظت شده (CDDP)^۱ روشی است که در آن با استفاده از نواحی بسیار حفاظت شده پروتئین‌ها و طراحی آغازگرهایی بر اساس این نواحی اقدام به تکثیر DNA می‌کنند و الگوی باندی آن بر روی ژل آگارز تعیین می‌شود. این تکنیک ژن‌هایی را مورد هدف قرار می‌دهد که به طور مستقیم در پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده درگیر هستند. این تکنیک بر اساس تک آغازگرهای بلند با دمای اتصال بالا طراحی شده است که باعث افزایش تکرارپذیری آن می‌شود. از مزایای این روش می‌توان به ساده بودن، نیاز به کمترین امکانات آزمایشگاهی و نیاز به DNA الگوی بسیار کمتر نسبت به سایر روش‌ها اشاره کرد (Pocazi et al., 2011).

استفاده از نشانگر CDDP در این مطالعه برای اولین بار بر روی جنس *Tulipa* گزارش شد. هدف از این تحقیق، ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی گونه‌های جنس *Tulipa* در ایران با استفاده از نشانگر CDDP، تعیین میزان تنوعات درون و بین‌گونه‌ای، بررسی درصد چندشکلی و میزان کارآمدی روش نشانگر مولکولی CDDP در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف جنس *Tulipa* می‌باشد.

مواد و روش‌ها مواد گیاهی

برگ خشک نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این

1 Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP)

جدول ۱- مشخصات مربوط به نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	نام گونه	شماره هرباریومی	محل جمع‌آوری، نام جمع‌آوری‌کنندگان و مخفف نام هرباریوم‌ها	ارتفاع جمع‌آوری (متر)	کد نمونه
۱	<i>T. armena</i>	۱۹۷۲۸	آذربایجان غربی: ارومیه، رونه مارک و فروغی TARI	۲۰۰۰	AR2
۲	<i>T. ulophylla</i>	۷۹۶۶	مازندران: آمل، جاده هراز، جلیلیان، قلیچ‌نیا و نعمتی RANK	۷۳۰	U2
۳	<i>T. hoogiana</i>	۶۹۱۷۹	گلستان: گرگان، تنگه گلزار، اسدی و شاهسواری TARI	۸۰۰	H1
۴	<i>T. hoogiana</i>	۷۹۵۸	مازندران: آمل، سیاه‌بیشه، جلیلیان RANK	--	H3
۵	<i>T. lehmanniana</i>	۳۰۸۷۲	خراسان: گناباد، جعفری، قانع و کاظمی FAR	--	L1
۶	<i>T. lehmanniana</i>	۳۱۶۳۰	خراسان: شمال سرابان، جعفری، قانع و کاظمی FAR	--	L2
۷	<i>T. lehmanniana</i>	۲۸۲۸۳	یزد: جاده طبس، هنرخواه FAR	--	L3
۸	<i>T. micheliana</i>	۵۰۵۳۱	خراسان: ۴۵ کیلومتری شمال شیروان، اسدی و معصومی TARI	۲۳۰۰-۱۶۰۰	MI1
۹	<i>T. micheliana</i>	۲۶۸۵	مرکزی: اراک، چپقلی، مهدوی ALUH	۲۷۰۰-۲۳۰۰	MI2
۱۰	<i>T. micheliana</i>	۹۶۱۲۷	خراسان: اسفراین، کوه‌های پلمیس، ایمانی TARI	۱۸۰۰	MI3
۱۱	<i>T. micheliana</i>	۳۱۵۷۲	خراسان: شیروان، روستای قوانلو، جوهرچی FUMH	--	MI4
۱۲	<i>T. clusiana</i>	۱۷۳۶	کرمان: بافت، غنچه‌پور و تاج‌الدین KF	۱۸۵۰	C1
۱۳	<i>T. clusiana</i>	۷۹۵۵	تهران: باغ گیاه‌شناسی، جلیلیان RANK	--	C5
۱۴	<i>T. clusiana</i>	۲۸۲۹۶	خراسان: کوه‌های طبس، کیانی و زنگویی FUMH	--	C6
۱۵	<i>T. montana</i>	۷۹۶۱	مازندران: ۳ کیلومتر بعد از امامزاده هاشم به طرف آمل، جلیلیان و نعمتی RANK	۲۵۰۶	MO1
۱۶	<i>T. montana</i>	۷۹۶۲	مازندران: ۳ کیلومتر بعد از امامزاده هاشم به طرف آمل، جلیلیان و نعمتی RANK	۲۵۰۶	MO2
۱۷	<i>T. montana</i>	۷۹۶۵	مازندران: ۷۰ جاده آمل به تهران، جلیلیان و نعمتی RANK	--	MO4
۱۸	<i>T. montana</i>	۷۷۶	همدان: گنجانمه HANRRC	۲۳۰۰-۲۱۰۰	MO5
۱۹	<i>T. montana</i>	۱۶۷۶۲	اصفهان: کوه آتشیان، حسینی HUI	--	MO6
۲۰	<i>T. montana</i>	۷۰۷۷	کردستان: بیجار به تکاب، معروفی و مرادی HKS	۱۷۰۰	MO7
۲۱	<i>T. montana</i>	۲۹۹۵	مازندران: چالوس، کندوان NANRRC	--	MO8
۲۲	<i>T. montana</i>	۲۹۸۲	مازندران: چالوس، کندوان NANRRC	--	MO9
۲۳	<i>T. montana</i>	۷۷۷	همدان: گنجانمه، کلوندی و علیدادی HANRRC	۲۳۰۰-۲۱۰۰	MO10
۲۴	<i>T. schrenkii</i>	۷۹۴۵	کرمانشاه: جوانرود، جلیلیان، اسفندیاری و نعمتی RANK	۱۳۴۰	SH1
۲۵	<i>T. schrenkii</i>	۱۰۷۲	همدان: همدان به طرف اسدآباد، صفی‌خانی و کلوندی HANRRC	۱۶۵۰-۱۴۸۰	SH3

ردیف	نام گونه	شماره هرباریومی	محل جمع‌آوری، نام جمع‌آوری‌کنندگان و مخفف نام هرباریوم‌ها	ارتفاع جمع‌آوری (متر)	کد نمونه
۲۶	<i>T. schrenkii</i>	۳۸۰۳	کردستان: غرب سنندج، کوه‌های آیدر، کفاشی و فانی HKS	۱۸۷۰	SH4
۲۷	<i>T. systola</i>	۱۴۷۲۵	اصفهان: نجف‌آباد، نوروزی و شمس SFAHAN		S1
۲۸	<i>T. systola</i>	۶۴۰۹	کردستان: مریوان، معروفی و ناصری HKS	۱۳۰۰	S2
۲۹	<i>T. systola</i>	۲۰۶۳	اصفهان: سمیرم، پادنا، نوروزی SFAHAN	۲۵۰۰-۲۳۰۰	S3
۳۰	<i>T. systola</i>	۲۹۵	اصفهان: چادگان، آنالوگه، نکویی و نوروزی SFAHAN	۲۸۰۰-۲۶۰۰	S4
۳۱	<i>T. systola</i>	۷۶۸۱	کرمانشاه: ارتفاعات کوه نوا، طهماسبی RANK		S5
۳۲	<i>T. systola</i>	۵۷۴۱	کردستان، معروفی، منصوری و ناصری HKS	۱۵۰۰	S7
۳۳	<i>T. systola</i>	۱۰۳۰۱	کردستان: سقز، معروفی و احمدی HKS	۱۷۲۰	S9
۳۴	<i>T. systola</i>	۶۸۸۱	کردستان: دیواندره، معروفی و مرادی HKS	۲۲۵۰	S10
۳۵	<i>T. systola</i>	۲۰۴۹	کرمانشاه: گهواره، میرعبدالی و حاتمی RANK	۱۴۵۰	S11
۳۶	<i>T. systola</i>	۱۰۲۲	همدان: صفی‌خانی HANRRC	۲۰۰۰-۱۸۵۰	S13
۳۷	<i>T. systola</i>	۵۷۴۷	همدان: کلوندی، صفی‌خانی و نجفی HANRRC	۲۰۰۰	S14
۳۸	<i>T. systola</i>	۱۴۵۹۰	فارس: ۱۴۵-۱۵۰ کیلومتری آباده - شیراز، رحیمی‌نژاد و صاحبی HUI	۱۹۷۰	S17
۳۹	<i>T. systola</i>	۱۶۴۳۳	لرستان: خلیل‌آباد، اسدی و وندلیو TARI	۲۴۵۰-۲۳۰۰	S18
۴۰	<i>T. systola</i>	۲۴۶۳	همدان: ۱۰۰ کیلومتری شمال کبوترآهنگ، کلوندی HANRRC	۲۲۲۰-۲۰۰۰	S19
۴۱	<i>T. systola</i>	۲۴۷۹	همدان: ۱۰ کیلومتری نهاوند؛ جنگل کبان، صفی‌خانی و علیدادی HANRRC	۱۸۰۰-۱۶۵۰	S20
۴۲	<i>T. systola</i>	۷۲	لرستان: خرم‌آباد، اندیشمک، رشنو BHAU	۱۲۷۳	S21
۴۳	<i>T. systola</i>	۶۴۰۷	کردستان: سقز، معروفی و ناصری HKS	۱۶۷۰	S22
۴۴	<i>T. systola</i>	۶۷۷۹	همدان: ۵ کیلومتری گل‌تپه، صفی‌خانی و کلوندی HANRRC	۲۰۵۰-۲۰۰۰	S24
۴۵	<i>T. systola</i>	۷۰۳۷	کردستان: جنوب غربی سنندج، گل‌محمدی HKS	۱۹۰۰	S25
۴۶	<i>T. systola</i>	۷۰۹۶	کردستان: ۳۵ کیلومتری بیجار، مرادی و معروفی HKS	۱۶۵۰	S26

TARI موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

FAR دانشگاه خوارزمی

ALUH دانشگاه الزهرا

FUMH پژوهشکده علوم گیاهی مشهد

HUI دانشگاه اصفهان

HANRRC مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان

BHAU دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد

HKS مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان

RANK مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه

KF دانشگاه کرمان

SFAHAN مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان

NANRRC باغ گیاهشناسی نوشهر

جدول ۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده (Collard and Mackill, 2009)

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm (°C)*	GC%**
۱	WRKY-R1	5`- GTG GTT GTG CTT GCC -3`	۴۹	۶۰/۰
۲	WRKY-R2	5`- GCC GTC GTA SGT SGT -3`	۵۲	۶۶/۷
۳	WRKY-R3	5`- GCA SGT GTG CTC GCC -3`	۵۴	۷۳/۳
۴	MADS-4	5`- CTS TGC GAC CGS GAG GTG -3`	۶۳	۷۲/۲
۵	ABP1-1	5`- ACS CCS ATC CAC CGC -3`	۵۴	۷۳/۳
۶	ABP1-3	5`- CAC GAG GAC CTS CAGG -3`	۵۶	۶۸/۸
۷	WRKY-F1	5`- TGG CGS AAG TAC GGC CAG -3`	۶۱	۶۶/۷
۸	ERF2	5`- GCS GAG ATC CGS GAC CC -3`	۶۲	۷۶/۵
۹	ERF3	5`- TGG CTS GGC ACS TTC GA -3`	۵۷	۶۴/۷
۱۰	KNOX-1	5`- AAG GGS AAG CTS CCS AAG -3`	۵۸	۶۱/۱
۱۱	WRKY-R2B	5`- TGS TGS ATG CTC CCG -3`	۵۲	۶۶/۷
۱۲	WRKY-R3B	5`- CCG CTC GTG TGS ACG -3`	۵۴	۷۳/۳
۱۳	MYB1	5`- GGC AAG GGC TGC CGC -3`	۵۷	۸۰/۰
۱۴	MYB2	5`- GGC AAG GGC TGC CGG -3`	۵۷	۸۰/۰
۱۵	ERF1	5`- CAC TAC CGC GGS CTS CG -3`	۶۲	۷۶/۵
۱۶	KNOX-2	5`- CAC TGG TGG GAG CTS CAC -3`	۶۱	۶۶/۷
۱۷	KNOX-3	5`- AAG CGS CAC TGG AAG CC -3`	۵۷	۶۴/۷
۱۸	MADS-1	5`- ATG GGC CGS GGC AAG GTG C -3`	۶۶	۷۳/۷
۱۹	MADS-2	5`- ATG GGC CGS GGC AAG GTG G -3`	۶۶	۷۳/۷

*Tm (°C): دمای اتصال برحسب درجه سانتی‌گراد

**GC%: محتوای گوانین-سیتوزین برحسب درصد

تحلیل‌های آماری

برای انجام تحلیل‌های آماری، باندهای مشاهده شده بر روی ژل‌ها در قالب ماتریسی از صفر و یک تنظیم گردید. بدین منظور حضور باند با عدد (۱) و عدم حضور آن با عدد صفر (۰) در نظر گرفته شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای PopGene32 (GenAlex ver 6.4)، PowerMarker (ver 3.25) و DARwin (ver 5.0.158) استفاده گردید.

میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بر اساس

رابطه $PIC=1-\sum f_i^2$ توسط نرم‌افزار PowerMarker محاسبه شد که در این رابطه f_i برابر با فراوانی آلل نام است (Botstein et al., 1980). همچنین شاخص نشانگر (MI) برای کلیه آغازگرها طبق رابطه $MI=PIC.N.\beta$ محاسبه گردید. در این رابطه N تعداد باندهای چندشکل و β درصد چندشکلی برای هر آغازگر است. شاخص قدرت تفکیک (Resolving power) برای هر آغازگر طبق رابطه $Rp=\sum I_b$ و میزان I_b نیز از رابطه $I_b=1-(2|0.5-P_i|)$ محاسبه شد. در رابطه اخیر P_i درصد فراوانی یک آلل از هر باند

است (Powell et al., 1996).

آنالیز تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Popgene32 و با کمک ضریب تشابه دایس انجام شد. در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I) برای هر گونه محاسبه شد. برای تجزیه خوشه‌ای و بررسی ارتباط گونه‌ها، از ضریب دایس و روش UPGMA در نرم‌افزار Power Marker (ver 3.25) و برای دسته‌بندی اکسشن‌ها از نرم‌افزار DARwin (ver 5.0.158) با استفاده از ماتریس فاصله و ضریب دایس مبتنی بر روش UPGMA که بیشترین ضریب کوفتیک (۰/۸۱) را داشت، استفاده گردید. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) با استفاده از نرم‌افزار GenAIEX (v6.3) انجام شد.

نتایج

از ۱۹ آغازگر CDDP استفاده شده در این مطالعه در مجموع ۲۶۵ باند تکثیر شد که همه آنها چندشکلی (پلی‌مورفیسم) بودند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر ۱۳/۹ و میانگین تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر ۱۰۰٪ بود. بیشترین تعداد باند چندشکل در آغازگر ۵ (ABP1-1) با ۲۰ باند و کمترین تعداد در آغازگرهای ۱ (WRKY-R1)، ۱۱ (WRKY-R2B) و ۱۴ (MyB2) با ۹ باند مشاهده گردید (شکل ۱). دامنه قطعات تکثیر شده بین ۱۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز بود. تعداد کل باندهای منحصر به فرد (اختصاصی) در مجموع ۴ باند و به‌طور میانگین ۲۱٪ بود. محدوده محتوای اطلاعات چند

شکلی (PIC) بین ۰/۲۷ تا ۰/۵۲ متغیر بود که در آغازگرهای ۱۸ (MADS-1) و ۱۹ (MADS-2) با ۰/۲۷ کمترین مقدار و در آغازگرهای ۱ (WRKY-R1) و ۱۰ (Knox-1) با ۰/۵۲ بیشترین مقدار بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۴۵ به‌دست آمد (جدول ۳). میزان قدرت تفکیک (Rp) در آغازگر ۱ (WRKY-R1) با ۳/۷۷ کمترین مقدار و در آغازگر ۵ (ABP1-1) با ۱۳/۸۵ بیشترین مقدار و به‌طور میانگین برابر با ۷/۵۹ بود (جدول ۳).

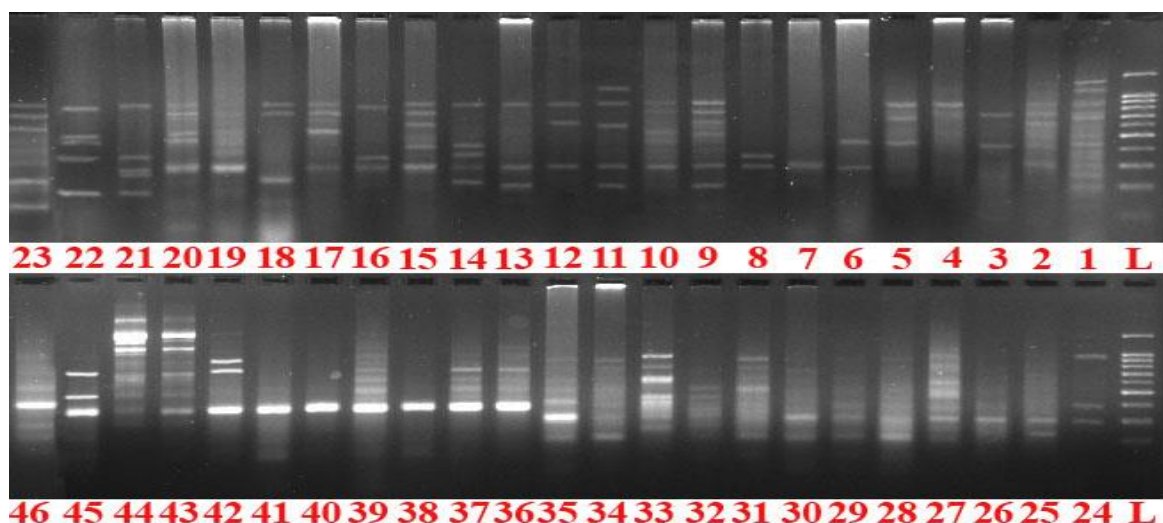
شاخص نشانگر (MI)، در آغازگر ۱۸ (MADS-1) با ۳/۷۸ کمترین مقدار و در آغازگر ۵ (ABP1-1) با ۹/۴۰ بیشترین مقدار و به‌طور میانگین برابر با ۵/۸۵ بود. بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) در گونه *T. systola* با ۱/۸۴۵ آلل و کمترین مقدار آن در گونه *T. ulophylla* با ۱ آلل بود. آلل‌های مؤثر (Ne) یعنی آللهایی که فراوانی برابری دارند و دارای توزیع خوبی می‌باشند، در گونه *T. ulophylla* با مقدار ۱ آلل کمترین و در گونه *T. montana* با ۱/۴۱۱ آلل بیشترین بود. بیشترین و کمترین شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) به‌ترتیب در گونه *T. systola* برابر با ۰/۳۷۱ و در گونه *T. ulophylla* برابر با صفر بود. بیشترین و کمترین شاخص نی (H) به‌ترتیب در گونه *T. montana* برابر با ۰/۲۴۴ و در گونه *T. ulophylla* برابر با صفر بود (جدول ۴).

آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GenAIEX (v6.3) انجام شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در مجموع تنوع درون گونه‌ای (۷۷٪) از تنوع بین گونه‌ای (۲۳٪) بیشتر است (جدول ۵).

جدول ۳- نتایج مربوط به آغازگرهای نشانگر CDDP در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*

دامنه قطعات تکثیر شده	MI	PIC	Rp	PSB%	NSB	PPB%	NPB	TNB	نام آغازگر	آغازگر
۴۰۰-۱۸۰۰	۴/۶۸	۰/۵۲	۳/۷۷۲	۰	۰	۱۰۰	۹	۹	WRKY-R1	۱
۲۰۰-۱۷۰۰	۴/۹۵	۰/۴۵	۶/۹۶۹	۰	۰	۱۰۰	۱۱	۱۱	WRKY-R2	۲
۳۰۰-۱۵۰۰	۶/۲۴	۰/۴۸	۶/۳۴۰	۱۵/۳۸	۲	۱۰۰	۱۳	۱۳	WRKY-R3	۳
۲۰۰-۱۶۰۰	۵/۷۸	۰/۳۴	۹/۴۳۸	۰	۰	۱۰۰	۱۷	۱۷	MADS-4	۴
۲۰۰-۱۶۰۰	۹/۴۰	۰/۴۷	۱۳/۸۵۶	۰	۰	۱۰۰	۲۰	۲۰	ABP1-1	۵
۲۰۰-۲۰۰۰	۷/۲۰	۰/۴۸	۸/۷۸۱	۰	۰	۱۰۰	۱۵	۱۵	ABP1-3	۶
۲۰۰-۱۶۰۰	۸/۱۶	۰/۴۸	۱۰/۸۳۸	۰	۰	۱۰۰	۱۷	۱۷	WRKY-F1	۷
۲۰۰-۱۵۰۰	۵/۲۷	۰/۳۱	۹/۸۲۶	۰	۰	۱۰۰	۱۷	۱۷	ERF2	۸
۲۵۰-۱۷۰۰	۵/۰۷	۰/۳۹	۴/۵۰۸	۷/۶۹	۱	۱۰۰	۱۳	۱۳	ERF3	۹
۲۰۰-۱۵۰۰	۵/۲۰	۰/۵۲	۶/۲۵۲	۰	۰	۱۰۰	۱۰	۱۰	Knox-1	۱۰
۳۰۰-۱۵۰۰	۴/۲۳	۰/۴۷	۵/۳۴۶	۱۱/۱۱	۱	۱۰۰	۹	۹	WRKY-R2B	۱۱
۱۵۰-۱۶۰۰	۸/۱۶	۰/۴۸	۱۰/۸۲۶	۰	۰	۱۰۰	۱۷	۱۷	WRKY-R3B	۱۲
۳۰۰-۱۵۰۰	۶	۰/۴۰	۶/۸۰۶	۰	۰	۱۰۰	۱۵	۱۵	Myb1	۱۳
۳۰۰-۱۶۰۰	۴/۵۹	۰/۵۱	۵/۸۵۴	۰	۰	۱۰۰	۹	۹	Myb2	۱۴
۲۰۰-۱۵۰۰	۶/۳۷	۰/۴۹	۷/۴۱۰	۰	۰	۱۰۰	۱۳	۱۳	ERF-1	۱۵
۲۰۰-۱۶۰۰	۵/۷۰	۰/۳۸	۴/۶۸۰	۰	۰	۱۰۰	۱۵	۱۵	Knox-2	۱۶
۵۰۰-۱۵۰۰	۵/۴۰	۰/۴۵	۷/۵۴۶	۰	۰	۱۰۰	۱۲	۱۲	Knox-3	۱۷
۳۰۰-۱۵۰۰	۳/۷۸	۰/۲۷	۷/۴۳۶	۰	۰	۱۰۰	۱۴	۱۴	MADS-1	۱۸
۳۰۰-۱۵۰۰	۵/۱۳	۰/۲۷	۷/۸۲۲	۰	۲	۱۰۰	۱۹	۱۹	MADS-2	۱۹
-	-	-	-	۳۴/۱۸	۴	۱۹۰۰	۲۶۵	۲۶۵	-	مجموع
-	۵/۸۵	۰/۴۵	۷/۵۹۵	۱۱/۳۹	۰/۲۱	۱۰۰	۱۳/۹	۱۳/۹	-	میانگین

(TNB: تعداد کل باندها؛ NPB: تعداد باندهای چندشکل؛ PPB: درصد باندهای چند شکل؛ NSB: تعداد باندهای اختصاصی؛ PSB: درصد باندهای اختصاصی؛ Rp: قدرت تفکیک؛ PIC: محتوای اطلاعات چند شکلی؛ MI: شاخص نشانگر)



شکل ۱- الگوی باندهای تکثیر شده توسط آغازگر ۹ نشانگر مولکولی CDDP، ۴۶ فرد از ۹ گونه متعلق به جنس *Tulipa*

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*

H	I	Ne	Na	نام گونه
۰/۰۰۴	۰/۰۰۶	۱/۰۰۷	۱/۰۱۰	<i>T. armena</i>
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	<i>T. ulophylla</i>
۰/۱۷۷	۰/۲۵۸	۱/۳۰۲	۱/۴۲۷	<i>T. hoogiana</i>
۰/۱۰۵	۰/۱۵۶	۱/۱۸۲	۱/۲۳۷	<i>T. lehmanniana</i>
۰/۱۳۲	۰/۱۹۴	۱/۲۳۵	۱/۳۳۵	<i>T. micheliana</i>
۰/۱۳۱	۰/۱۹۲	۱/۲۲۱	۱/۳۲۹	<i>T. clusiana</i>
۰/۲۴۴	۰/۳۶۸	۱/۴۱۱	۱/۷۲۱	<i>T. montana</i>
۰/۲۱۱	۰/۳۱۳	۱/۳۵۸	۱/۵۵۱	<i>T. schrenkii</i>
۰/۲۳۹	۰/۳۷۱	۱/۳۸۹	۱/۸۴۵	<i>T. systola</i>
۰/۱۳۸	۰/۲۰۶	۱/۲۳۴	۱/۳۸۳	میانگین

H: شاخص تنوع ژنی نی، I: شاخص اطلاعاتی شانون، Ne: تعداد آل مؤثر، Na: تعداد آل مشاهده شده

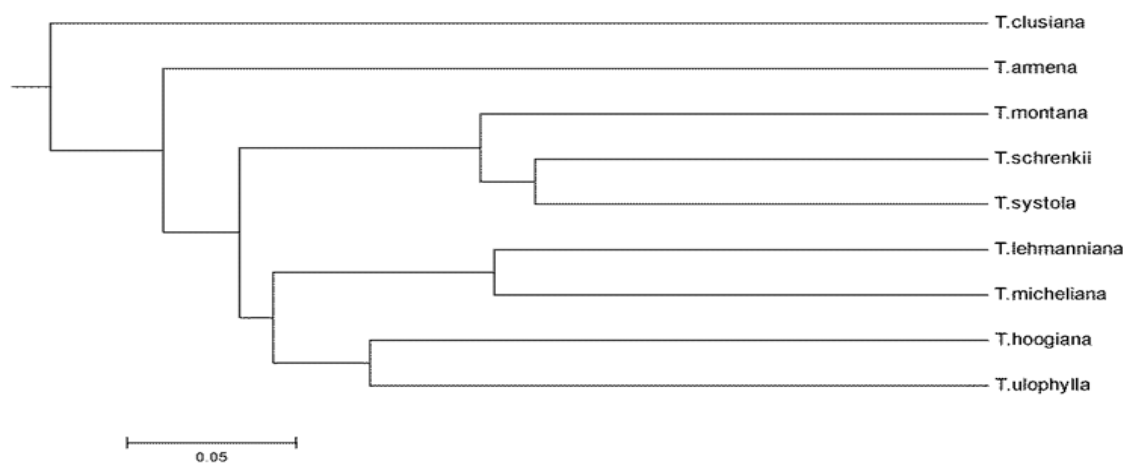
جدول ۵- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی CDDP در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*

درصد (%)	انحراف معیار	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
٪۲۳	۱۶/۰۱۱	۱۰۲۴/۷۹۰	۸	بین گونه‌ای
٪۷۷	۵۴/۳۸۳	۲۱۲۰/۹۳۹	۳۹	درون گونه‌ای
٪۱۰۰	۷۰/۳۹۴	۳۱۴۵/۷۲۹	۴۷	کل

در ارزیابی ماتریس فاصله با استفاده از ضریب دایس در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*، بیشترین فاصله مربوط به گونه‌های *T. clusiana* و *T. armena* (۰/۶۸۴) و کمترین فاصله مربوط به گونه‌های *T. schrenkii* و *T. systola* (۰/۲۶۷) می‌باشد (جدول ۶).

جدول ۶- ماتریس فاصله در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*

OTU	<i>T. armena</i>	<i>T. clusiana</i>	<i>T. hoogiana</i>	<i>T. lehmanniana</i>	<i>T. micheliana</i>	<i>T. montana</i>	<i>T. schrenkii</i>	<i>T. systola</i>
<i>T. clusiana</i>	۰/۶۸۴۹							
<i>T. hoogiana</i>	۰/۵۳۱۰	۰/۴۴۲۱						
<i>T. lehmanniana</i>	۰/۵۱۹۴	۰/۶۴۲۲	۰/۳۹۴۰					
<i>T. micheliana</i>	۰/۵۱۷۷	۰/۶۰۲۲	۰/۴۰۲۹	۰/۲۹۱۷				
<i>T. montana</i>	۰/۴۸۷۴	۰/۴۷۲۶	۰/۴۳۲۰	۰/۵۲۶۵	۰/۴۹۶۹			
<i>T. schrenkii</i>	۰/۴۵۹۰	۰/۴۶۴۳	۰/۴۴۳۸	۰/۴۵۹۰	۰/۴۴۹۲	۰/۳۰۹۵		
<i>T. systola</i>	۰/۴۱۵۲	۰/۵۲۷۳	۰/۴۰۵۶	۰/۳۹۴۲	۰/۳۶۹۸	۰/۲۹۰۶	۰/۲۶۷۷	
<i>T. ulophylla</i>	۰/۴۸۵۶	۰/۶۰۱۳	۰/۳۶۵۶	۰/۴۵۷۲	۰/۴۳۷۸	۰/۴۶۳۱	۰/۴۳۵۸	۰/۴۳۷۱

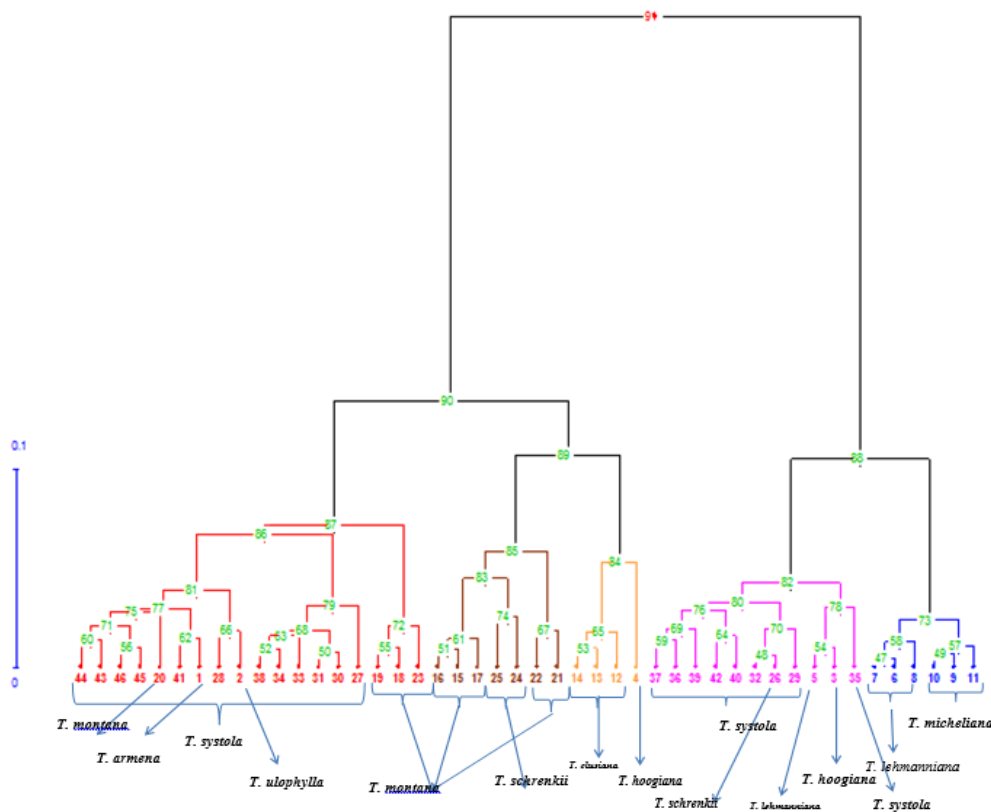


شکل ۲- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار Power Marker در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*

مورد بررسی در دو شاخه اصلی قرار گرفتند که هریک به زیرشاخه‌هایی جدا تقسیم شدند. بر اساس این آنالیز، اکسشن‌ها تا حدودی از لحاظ شواهد تاکسونومی و مورفولوژی کنار هم قرار گرفتند. بیشترین شباهت و نزدیکی در Node شماره ۴۷ می‌باشد (شماره‌های ۶ و ۷) که هر دو مربوط به اکسشن‌های گونه *T. lehmanniana* (L2, L3) است. کمترین شباهت مربوط به Node شماره ۹۱ می‌باشد که در واقع شاخه اصلی است (شکل ۳).

در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، گونه‌های مورد بررسی در ۵ گروه قرار گرفت که گروه اول شامل گونه‌های *T. ulophylla* و *T. hoogiana*، گروه دوم شامل گونه‌های *T. lehmanniana* و *T. micheliana*، گروه سوم شامل گونه‌های *T. montana* و *T. schrenkii*، *T. systola*، گروه چهارم شامل گونه *T. armena* و گروه پنجم شامل گونه *T. clusiana* است (شکل ۲).

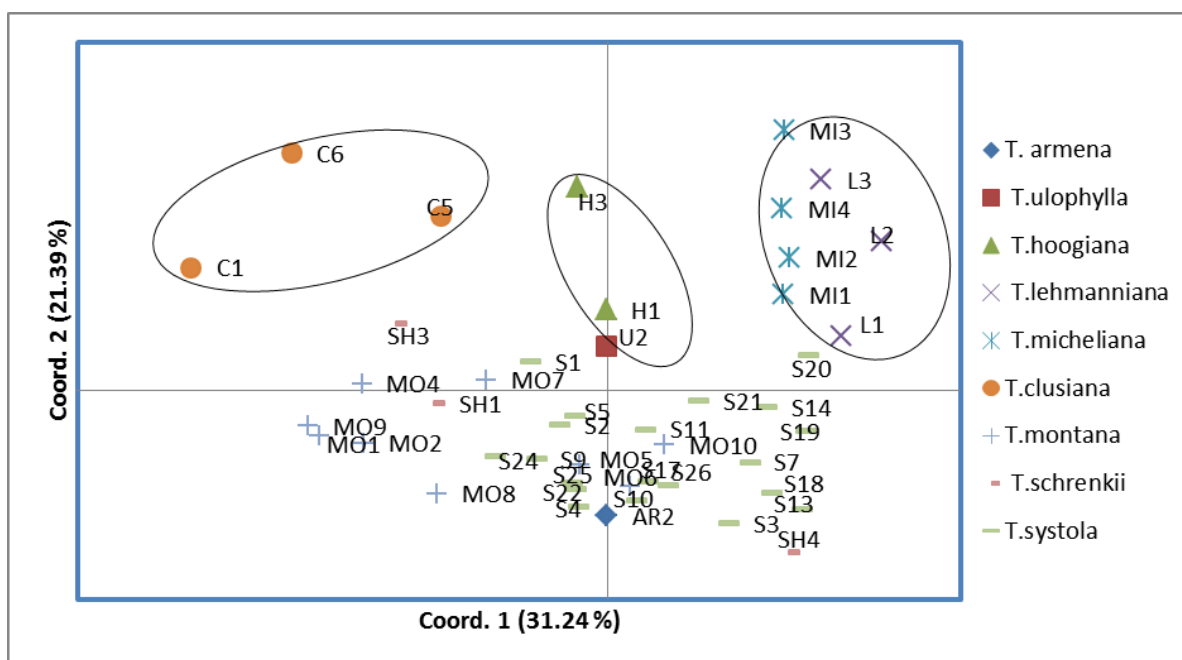
در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب دایس و مبتنی بر روش UPGMA، اکسشن‌های مختلف



شکل ۳- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin در گونه‌های مورد بررسی جنس *Tulipa*

۴). اشکال هندسی نمودار شکل ۴ با گروه‌بندی‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس گونه‌ها (شکل ۲) تطابق نشان می‌دهد و با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس اکسشن‌ها (شکل ۳) تا حدودی مطابقت دارد.

در تجزیه به مختصات اصلی، دو محور اول و دوم به ترتیب با مقادیر ۳۱/۲۴ و ۲۱/۳۹ بیشترین درصد از واریانس کل را توجیه نمودند که در مجموع بر اساس این دو محور ۵۲/۶۳ درصد از واریانس کل توجیه شد (شکل



شکل ۴- نمودار PCoA در ۴۶ فرد (که نام و مشخصات آنها در جدول ۱ آمده است) متعلق به ۹ گونه جنس *Tulipa*

بحث

۰/۵ $PIC >$ نشان‌دهنده یک نشانگر بسیار کارآمد و ۰/۲۵ $PIC >$ ۰/۵ $PIC >$ نشان‌دهنده یک نشانگر کارا و ۰/۲۵ $PIC <$ نشان‌دهنده یک نشانگر با کارایی پایین است (Botstein *et al.* 1980; Wei *et al.*, 2005; Thimmappaiah *et al.*, 2008).

نشانگر CDDP با دارا بودن محتوای اطلاعات چند شکلی نسبتاً بالا (میانگین ۰/۴۵) در بین اکسشن‌های مورد بررسی و با توجه به آغازگرهای مورد مطالعه نشان‌دهنده یک نشانگر کارا در مطالعه روابط بین‌گونه‌ای جنس *Tulipa* می‌باشد. گزارش Pourkhaloe و همکاران در سال ۲۰۱۸، در مطالعه تنوع ژنتیکی و فیلوژنی لاله‌های وحشی و کاشته شده بر اساس نشانگرهای ریزماهوره و میانگین شاخص PIC ، ۰/۶۶ گزارش گردید که نشان داد این نشانگرها قدرت تفکیک بالایی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی لاله‌ها دارند. با توجه به تعداد باندهای تولید شده، از آغازگرهای ۱ (WRKY-R1) و ۱۰ (Knox-1) می‌توان برای تفکیک و تمایز مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپ‌های جنس *Tulipa* در تحقیقات بعدی استفاده کرد. در صورتی

این پژوهش برای اولین بار به توصیف تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف جنس *Tulipa* با نشانگر CDDP پرداخته است. از گزارش‌های قبلی استفاده از نشانگر مولکولی CDDP می‌توان به تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گیاهانی مانند برنج (Collard and Mackill, 2009)، تاجریزی (Poczai *et al.*, 2011)، نخود (Hajibarat *et al.*, 2015)، زینان (Tomar and Malik, 2015)، گندم (Hamidi *et al.*, 2014; Seyedimoradi *et al.*, 2016)، گل رز (Eghbalneghad *et al.*, 2017) و گل صدتومانی (Wang *et al.*, 2014) اشاره کرد. نتایج این ارزیابی‌ها نشان داد این نشانگر توانسته است به‌عنوان سیستم نشانگری جدید به خوبی در تحلیل تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های موجود کارآمد باشد.

مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هر چه اعداد به‌دست آمده بزرگ‌تر باشد، بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در نمونه‌های مورد بررسی است که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد.

گونه‌های *T. schrenkii* و *T. systola* (۰/۲۶۷) می‌باشد. به‌طور کلی در مورد جمعیت‌های وحشی، فاصله جغرافیایی و جریان ژنی بین جمعیت‌ها تعیین‌کننده فاصله ژنتیکی است.

دندورگرام حاصل از ماتریس فاصله، اکسشن‌های متعلق به ۹ گونه از جنس *Tulipa* را به دو شاخه اصلی تقسیم کرد. بر اساس نتایج این تحقیق، اکسشن‌های متعلق به برخی گونه‌ها از یکدیگر تفکیک نشدند که با توجه به تجزیه خوشه‌ای کاملاً مشهود است. این مسئله سبب شده است که ماتریس فاصله و تجزیه خوشه‌ای بر اساس گونه‌ها با آنچه که در تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای بر اساس اکسشن‌ها مشاهده می‌گردد، مطابقت کامل نداشته باشد.

اما به‌رحال مشخص شد که بر اساس نتایج این تحقیق، اکسشن‌های مختلف متعلق به گونه‌های *T. micheliana*، *T. lehmanniana* و *T. clusiana* به خوبی تفکیک شدند که با توجه به خوشه‌های ایجاد شده، نتایج Kiani و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر تاکسونومی جنس در سطح بخش (Zonneveld, 2009) تأیید می‌گردد. دو گونه *T. micheliana* و *T. lehmanniana* پراکنش جغرافیایی مشابهی در مناطق شمال شرق و مرکز ایران دارند و بر اساس رنگ قطعات گلپوش و سایر ویژگی‌های گل مشابه بوده و بر اساس کرک پیاز از یکدیگر تفکیک می‌شوند.

اکسشن‌های مختلف از جنس *Tulipa* که از مکان‌های مختلف جمع‌آوری شدند و بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی به‌عنوان گونه‌های *T. systola* و *T. schrenkii* شناخته می‌شوند، به ترتیب در ۳ و ۲ گروه دسته‌بندی شدند و کمترین فاصله ژنتیکی بین این دو گونه گزارش گردید.

اکسشن‌های متعلق به گونه *T. montana* از مناطق تقریباً نزدیک به هم با تنوع رنگ و اندازه گل متفاوت در یک گروه قرار گرفتند و فاصله ژنتیکی ۰/۲۹ بین دو گونه *T. montana* و *T. systola* گزارش گردید که دندورگرام و تجزیه به مختصات اصلی آن را تأیید کرد و می‌توان نتیجه گرفت که شرایط محیطی نقش عمده‌ای در خصوصیات مورفولوژیکی یک تاکسون ایجاد می‌کند.

تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای

که آغازگرهای ۱۸ (MADS-1) و ۱۹ (MADS-2) توانایی قابل قبولی در جداسازی اکسشن‌ها نداشتند. بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (Rp) می‌باشد (Kayis et al., 2010)، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تأثیرپذیری دارد که در آغازگر ۵ (ABP1-1) بیشترین مقدار را نشان داد. شاخص نشانگر (MI)، نشان از فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد باند چندشکل بیشتر است که در آغازگر ۵ (ABP1-1) بیشترین مقدار را دارد. بنابراین با توجه به شاخص‌های Rp و MI، آغازگر ۵ بهترین عملکرد را در بین آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش داشته است.

توزیع و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی تحت تأثیر عوامل متعددی می‌باشد که شامل تنوع زیستگاه، سیستم لقاح، نحوه تکثیر و انتشار، شیوه زندگی، اندازه جمعیت، جریان ژنی، میزان جهش، رانش ژنتیکی و طول عمر است (Tang et al. 2016; Nam et al. 2014). با توجه به شاخص‌های تنوع ژنتیکی، در بین افراد گونه *T. systola* بیشترین تنوع ژنتیکی مشاهده شد و گونه *T. montana* در مرتبه دوم قرار گرفت، اما از سوی دیگر مشاهده شد که دو گونه *T. ulophylla* و *T. armena* تنوع‌پذیری و همچنین میزان پراکندگی کمتری نسبت به سایر گونه‌ها دارند. با توجه به اینکه تعداد افراد هر گونه یکسان نبودند، بخشی از این نتیجه‌گیری به تعداد افراد مورد بررسی ارتباط داشت. اما به‌رحال اکسشن‌های مختلف گونه *T. systola* در ارتفاعات مناطق کوهستانی پراکنش دارند و توسط بذر انتشار می‌یابند که دلیلی بر بالا بودن تنوع ژنتیکی افراد مختلف این گونه می‌باشد. مقایسه شاخص‌ها در این مطالعه با مطالعات دیگر نشان می‌دهد که نتایج حاصل در رنج معقولی واقع شده ولی اظهار نظر در مورد بالا و پایین بودن آن امری نسبی است که با نتایج Pourkhaloee و همکاران (۲۰۱۸) مبنی بر بیشترین پارامترهای تنوع ژنتیکی در گونه *T. systola* مطابقت دارد.

نتایج حاصل از ماتریس فاصله گونه‌ها نشان داد که حداکثر تفاوت بر اساس ضریب فاصله بین گونه‌های *T. clusiana* و *T. armena* (۰/۶۸۴) و کمترین فاصله بین

نمونه‌های هرباریومی و همچنین از آقای دکتر هوشمند صفری و آقای مهندس هومن شیروانی برای همکاری در تحلیل‌های آماری تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Boissier, E. 1884: Flora Orientalis, vol. 5: 191-201. Geneva & Basle: H. Georg
- Botschantzeva, Z. P. (1962). Tulips: taxonomy, morphology, cytology, phytogeography, and physiology. English translated edition by HQ Varekamp (1982). Balkema, Rotterdam
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32(3), 314.
- Collard B.C.Y and Mackill D.J. (2009). Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants. Plant Molecular Biology and Reproduction, 27: 558-562.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
- Ejtehadi, H., Sepehri A. and Akkafi, H. R. (2009). Methods of Measuring Biodiversity. Ferdowsi University of Mashhad Press, 226 p. (In Persian).
- Eghbaltheghad, Y., Saidi, A., Beiramizadeh, E. (2017). Evaluation of genetic diversity Rose (Rosa hybrid) flower genotypes using CDDP & RAPD markers. Agricultural Biotechnology Journal, 9 (2): 1-14.
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Hajibarat, Z., and Talebi, R. (2015). Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) and Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP). Physiology Molecular Biology Plants, 21 (3): 365-373.
- Hall, A.D. 1940: The genus *Tulipa*. 1-171.- The Royal Horticultural Society, London
- Hamidi. H., Talebi, R. and Keshavarzi, F. (2014). Comparative efficiency of functional gene-based markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum* L.). Cereal Research Communication, 42 (4): 558-567.
- Jalilian, N., Assadi, M. and Nemati, M. (2017). The final report of the research project "Preparation of the Flora of Iran: genus *Tulipa* L. of the Liliaceae family "(Report no. 51573)". Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran

تجزیه خوشه‌ای، تصویر بهتری از روابط بین نمونه‌ها را ارائه می‌دهد که منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود. در این تحقیق، تجزیه به مختصات اصلی، نمونه‌های مورد مطالعه را در ۴ گروه قرار داد که تا حدی مطابق با گروه‌بندی انجام شده توسط روش تحلیل خوشه‌ای گونه‌ها و اکسشن‌های حاصل از نرم‌افزارهای PowerMarker و DARwin بود.

از نظر تئوری بالا بودن تنوع در میان گونه‌ها از تمایز ژنتیکی پایین اکسشن‌ها ناشی می‌شود که سطح بالای همگنی را در اکسشن‌ها نشان می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان داد که ۲۳٪ از تنوعات، مربوط به بین گونه‌ها و ۷۷٪ مربوط به درون گونه‌ها است. با توجه به بالا بودن سهم واریانس درون گونه‌ای نسبت به بین گونه‌ای، می‌توان بیان کرد که جریان ژنی بالایی بین گونه‌های مورد بررسی وجود داشته که نتیجه این جریان ژنی تشابهات مورفولوژی بسیار زیاد گونه‌ها با یکدیگر می‌باشد که جداسازی گونه‌ها را بر اساس صفات مورفولوژیک مشکل می‌کند. از سوی دیگر آن قسمت از تنوع که به بین گونه‌ها اختصاص داشت نشانگر وجود ژنهای آگاهی‌بخش در جهت تمایز گونه‌ها بوده و می‌توان با انجام بررسی‌های بیشتر این مکان‌ها را بهتر شناسایی کرد تا بتوان در رده‌بندی گونه‌های مختلف جنس *Tulipa* از آنها استفاده کرد.

نتایج Pourkhaloee و همکاران (۲۰۱۸) که با این تحقیق مطابقت داشت، حکایت از وجود بیشترین تنوع درون گونه‌ها (۶۵٪) دارد، به نحوی که تنوع پایین بین افراد در جنس *Tulipa* به‌عنوان یک تهدید برای محافظت و جلوگیری از انقراض و از بین رفتن ژرم‌پلاسم گونه‌های وحشی باید در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری

از مساعدت مسئولان محترم هرباریوم‌های مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، مراکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان‌های کرمانشاه، کردستان، همدان، باغ گیاه‌شناسی نوشهر، همچنین دانشگاه‌های اصفهان، خوارزمی، الزهرا، کرمان و پژوهشکده علوم گیاهی مشهد به دلیل ارائه

- Tuyl, J. (2018). Molecular analysis of genetic diversity, population structure, and phylogeny of wild and cultivated tulips (*Tulipa* L.) by genic microsatellites. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59 (6): 875-888.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Rechinger, K. H. (1990) *Tulipa* L. In: Flora Iranica (ed. Rechinger, K.H.) 165: 76-103, Graz.
- Seyedimoradi, H., Talebi, R., and Fayaz, F. (2016). Geographical diversity pattern in Iranian landrace durum wheat (*Triticum turgidum*) accessions using start codon targeted polymorphism and conserved DNA-derived polymorphism markers. *Environmental and Experimental Biology*, 14: 63–68.
- Tang, N., Mo, G., van Tuyl, J., Arens, P., Liu, J. and Tang, D. (2014). Genetic diversity and structure of *Lilium pumilum* DC in southeast of Qinghai–Tibet plateau. *Plant Systematics and Evolution*, 300:1453–1464
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G. S. (2008). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 118: 1-7.
- Tomar, P. and Malik, C. (2015). CDDP and CBDP as novel markers. *LS: International Journal of Life Sciences*, 4 (2): 85-89.
- Van Raamsdonk, L.W.D., Eikelboom, W., De Vries, T. and Straathof, T.P. (1997). The systematics of the genus *Tulipa* L. *Acta Horticulturae*, 430:821–828.
- Wang, X., Fan, H., Li, Y., Sun, X., Sun, X., Wang, W., and Zheng, C. (2014). Analysis of genetic relationships in tree peony of different colors using conserved DNA-derived polymorphism markers. *Scientia Horticulturae*, 175: 68-73.
- Wei, Y. M., Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wu, W., Zhang, Z. Q., Liu, D. C., and Zhang, Y. L. (2005). Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 46: 3-9
- Wendelbo, P. (1977). *Tulipa* and Irises of Iran and their relatives, Botanical Institute of Iran, Tehran.
- Zonneveld, B. (2009). The systematic value of nuclear genome size for all species of *Tulipa* L. (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 281:217–245
- Jalilian, N., Assadi, M. and Nemati, M. (2019). A contribution to the taxonomic delimitation of *Tulipa armena* (Liliaceae) and a key to the Iranian species. *Feddes Repertorium*, 130: 389-395, <https://doi.org/10.1002/fedr.201800032>
- Kayis, S. A., Hakki, E. E., and Pinarkara, E. (2010). Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (21): 2925-2933.
- Kiani, M., Memariani, F. and Zarghami, H. (2012) Molecular analysis of species of *Tulipa* L. from Iran based on ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 298:1515–1522
- Laikre, L., Allendorf, F. W., Aroner, L. C., Baker, C. S., Gregovich, D. P., Hansen, M. M., Jackson, J. F., Kendall, k., McKelvey, K. S., Neel, M. C., Olivieri, I., Ryman, N., Schwartz, M. K., Stetz, J. B., Tallmon, D. A., Taylor, B. I., Vojta, C. D., Waller, D. M., and Waples, R. S. (2009). Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on biological diversity. *Wildlife Biology Faculty Publications*, 75.
- Matin, F. (1997) Tulips of Iran: 1-104.- Agricultural Research, Education and Extension organization (AREEO), Tehran
- Meghwal, P. R., Singh, A., Kumar, P., and Morwal, B. R. (2014). Diversity, distribution and horticultural potential of *Cordia myxa* L.: a promising underutilized fruit species of arid and semi-arid regions of India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61 (8): 1633-1643.
- Nam B. E., Nam, J. M. and Kim, J. G. (2016) Effects of habitat differences on the genetic diversity of *Persicaria thunbergii*. *Journal of Ecology and Environment*, 40:11
- Parsa, A. (1950). *Tulipa* L. In: Flora de l'Iran, 5: 199-228, Tehran.
- Powell, W., Morganet, M., Andre, C., Hanafey, M., vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A. (1996). The comparison of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Poczai, P., Varga, I., Bell, N. E. and Hyvönen, J. (2011). Genetic diversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, Solanaceae) germplasm using conserved DNA-derived polymorphism and intron-targeting markers. *Annals of Applied Biology* 159: 141-153.
- Pourkhaloe, A., Khosh-Khui, M. , Arens, P. , Salehi, H. , Razi, H. , Niazi, A. , Afsharifar, A. and van

Evaluation of genetic diversity of some Iranian species in the genus *Tulipa* L. using CDDP molecular marker

M. Haerinasab¹, N. Karimian², N. Jalilian^{3*} and M. yousefi⁴

1- Assist. Prof., Department of Biology, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, Iran

2- M.Sc., Department of Biology, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, Iran

3*- Corresponding author, Assist. Prof., Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Kermanshah, Iran, Email: n.jalilian@areeo.ac.ir

4- Assoc. Prof., Department of Biology, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, Iran

Received: 30.04.2019

Accepted: 15.09.2019

Abstract

The genus *Tulipa* belongs to the Liliaceae family and is one of the most important ornamental bulbous plants, which has been cultivated all over the world to produce cut flowers, potted plants and use for landscaping. In this study, the genetic diversity of 46 accessions belonging to 9 species of *Tulipa* was investigated using 19 CDDP primers. A total of 265 bands were amplified, all of which were polymorphic. The average number of amplified bands per primer was 13.9. Primer 5 (ABP1-1) with the best marker parameters was introduced as the best primer for investigating genetic diversity in this study. Calculation of genetic diversity parameters showed the greatest diversity among *T. systola* species. Results of analysis of molecular variance (AMOVA) showed that within species diversity (77%) was higher than between species diversity (23%). Evaluation of distance matrix based on the Dice similarity coefficient of the studied *Tulipa* species showed that the highest and the lowest distance were related to *T. armena* and *T. clusiana* (0.684) and *T. systola* and *T. schrenkii* (0.226), respectively. Due to the higher contribution of within species variance than to between species, grouping of the species based on cluster analysis did not fully correspond to those in the principal coordinate analysis. However, different accessions belonging to *T. micheliana*, *T. lehmanniana*, and *T. clusiana* were well separated. The present study showed that the remarkable efficacy of the CDDP marker in relation to the genus *Tulipa* requires a comprehensive study of the genetic diversity of this genus in different distribution points of Iran.

Keywords: Polymorphism, Genetic variation, Tulip, Molecular marker