

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) در منطقه زاگرس ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیکی

حسن مؤمنی^۱، بهروز شیران^{۲*}، محمود خدامباشی^۳ و کیانوش چغامیرزایی^۴
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار دانشگاه شهرکرد،
۴، دانشیار، دانشگاه رازی کرمانشاه
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۸ - تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۲۵)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) منطقه زاگرس ایران از نشانگرهای مولکولی ISSR و ۳۲ صفت مورفولوژیکی استفاده گردید. در کل ۱۶۰ نمونه لاله واژگون از ۸ جمعیت زاگرس واقع در ۶ استان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از ۶ آغازگر مورد استفاده، در مجموع ۵۷ نوار تولید شد که ۴۹ نوار چندشکل بودند. میانگین درصد چندشکلی مشاهده شده برابر ۸۵/۶ درصد و میانگین تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر واحد سنجش برابر با ۸/۱۷ درصد بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۱ بود. در دندروگرام حاصل از خوشه‌بندی نمونه‌ها بر اساس ضرایب تشابه جاکارد و روش گروه‌بندی UPGMA، همه جمعیت‌های مورد بررسی تشکیل خوشه مجزایی دادند که بیانگر کارایی بالای آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر قطعات مناسب از ژنوم است. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) درون و بین ۸ جمعیت لاله واژگون با گروه‌بندی ناحیه‌ای و بدون گروه‌بندی ناحیه‌ای انجام شد. واریانس بین جمعیت‌ها و بین افراد این جمعیت‌ها به ترتیب ۴۴/۰۵ و ۵۵/۹۵ درصد از کل واریانس را پوشش دادند. گروه‌بندی ناحیه‌ای نتوانست درصدی از واریانس کل را توجیه کند. دندروگرام حاصل از صفات مورفولوژیکی الگوی مشخصی مبنی بر جدا سازی افراد متعلق به جمعیت‌ها ارائه نداد. همبستگی بین ماتریس‌های تشابه بر مبنای داده‌های مولکولی و مورفولوژیکی معنی دار نبود ($r=0/25$).

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، لاله واژگون، زاگرس، نشانگرهای ISSR، صفات مورفولوژیکی.

مقدمه

خانواده سوسن (Liliaceae) می‌باشد. ظاهر بسیار زیبا، گل‌های واژگون این گونه، و متمرکز بودن بوته‌های این گیاه در مناطق دارای اقلیم مطلوب موجب شده است تا اکثر این مناطق به عنوان تفریحگاه‌های طبیعی مورد توجه و استفاده گردشگران داخلی و خارجی قرار گیرند.

در ایران بیش از ۱۷۰ گونه لاله به طور طبیعی رشد و نمو می‌کنند. در این بین لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) از اهمیت و اصالت منحصر به فردی برخوردار است. این گیاه متعلق به رده تک لپه‌ای‌ها و

دیگر تکرارپذیری نشانگرهای SSR را به دلیل طویل بودن طول آغازگرهایشان دارا می‌باشند (Chen et al., 2008; Wang et al., 2008). این روش شامل تکثیرقطعه‌های DNA موجود در فواصل بین دو ناحیه‌ی تکراری ریزماهورای است که در دو سوی آن قرار دارند (Ainong et al., 2010). تاکنون مطالعه‌ای با کمک نشانگرهای مولکولی ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه لاله واژگون ایران انجام نشده است. ولی مطالعه مشابهی بر روی گونه‌های غیر ایرانی از قبیل *F. thnbergii* Miq. با استفاده از مارکر مولکولی ISSR انجام شده است (Liu et al., 2010).

مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی گونه‌های مختلف جنس *Fritillaria* نشان داده است که مرکز اصلی تنوع این جنس احتمالاً ایران می‌باشد چون نمونه‌های موجود در ایران خصوصیات نمونه‌های آسیای مرکزی، مدیترانه و قفقاز را دارا می‌باشند (Rix, 1977). بررسی وضعیت تاکسونومیک ۴۲ ژرم‌پلاسما از گونه‌های جنس *Fritillaria* در ترکیه با استفاده از تکنیک RAPD-PCR و تجزیه و تحلیل پروتئین (SDS-PAGE) بذر نشان داده است که همه گونه‌های مورد بررسی می‌توانند در قالب یک جنس طبقه‌بندی شوند (Celebi et al., 2006). گروه‌بندی گونه‌های جنس *Fritillaria* متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف با استفاده از روش سنجش تفرق اشعه‌ی X روی نشاسته‌ی نیمه متبلور، با گروه‌بندی جغرافیایی و گروه‌بندی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی مطابقت داشته است (Wang et al., 2006). بنابر این جهت شناسایی تنوع بین گونه‌های جنس *Fritillaria* نشانگرهای مورفولوژیکی مناسب بوده‌اند؛ اما جهت بررسی در سطح گونه لاله واژگون، استفاده از نشانگرهای مولکولی، اجتناب ناپذیر است. در این بررسی جهت شناسایی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های لاله واژگون منطقه زاگرس از نشانگرهای مولکولی ISSR و صفات مورفولوژیکی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیاهی لاله واژگون

در مجموع تعداد ۱۶۰ نمونه گیاه لاله واژگون (۲۰ نمونه از هر جمعیت) از ۳ ناحیه زاگرس ایران در

این گیاه پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان گیاه زینتی و نیز داروئی را دارا می‌باشد. در زمینه کاربردهای داروئی این گیاه تحقیقاتی انجام گرفته است. از جمله خواص داروئی آن وجود آکالوئیدهایی در سوخ این گیاه می‌باشد که تأثیر آن‌ها در درمان عوارضی از قبیل سرفه، آسم، برونشیت و تومورها به اثبات رسیده است (Nadeem et al., 2002; Rahman et al., 2002).

لاله واژگون علاوه بر ایران در مناطق وسیع دیگری از دنیا از جمله ترکیه، عراق، افغانستان، پاکستان، کشمیر و رشته کوه هیمالیا مشاهده و گزارش شده است (Alp et al., 2009). بیشترین پراکنش این گونه در ایران مربوط به استان‌های واقع در منطقه زاگرس می‌باشد. لاله واژگون بیشتر به صورت بومی در استان‌های فارس، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کرمانشاه و کردستان وجود دارد و شاید مرکز اصلی تنوع این گیاه، کوه‌های زاگرس ایران باشد (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007). بنابراین شناسایی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های لاله واژگون منطقه زاگرس ایران اولین قدم در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه و شناسایی دقیق ژرم‌پلاسما آن می‌باشد.

جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی روش‌های متفاوتی وجود دارد از جمله روش‌های کلاسیک، استفاده از صفات مورفولوژیک می‌باشد؛ اما با توجه به اینکه تعداد صفات مورفولوژیک محدود بوده و تحت تأثیر سن گیاه و محیط قرار دارند، امروزه از روش‌های مطمئن‌تری مانند نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود (Fares et al., 2009). از سال ۱۹۹۴ نشانگر مولکولی ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) معرفی شد (Ziekiewicz et al., 1994). نشانگرهای ISSR نیمه‌تصادفی بوده و از تکرارپذیری و چند شکلی بالایی برخوردار است و در دامنه‌ی وسیعی از گیاهان کاربرد دارد (Denduangboripant et al., 2010; Lin et al., 2010). آغازگرهای مورد استفاده در این نشانگرها، مکمل توالی‌های ریز ماهورای (SSRs) هستند. این روش نیازمند آگاهی از توالی ژنوم نیست و الگوهای چند شکلی زیاد و چند مکانی را تکثیر می‌نماید (Paradeep et al., 2002; Lian et al., 2001). این نشانگرها، همانند نشانگرهای RAPD از نظر تکنیکی ساده بوده و از طرف

بسته‌های یک گرمی تهیه و در فریزر 70°C تا زمان استخراج DNA نگهداری شد. از هر یک از گیاهان انتخاب شده، نمونه هرباریومی تهیه شد و پس از اسکن، اندازه‌گیری صفات کمی با استفاده از نرم افزار گرافیکی AutoCAD 2010 محصول شرکت Autodesk با مقیاس ۱:۱ و دقت یک میکرومتر انجام گرفت. این متغیرها شامل طول، عرض و مساحت برگ‌ها، طول، عرض و مساحت براکته‌ها، طول، عرض و مساحت کاسبرگ‌ها، طول، عرض و مساحت گلبرگ‌ها، طول و عرض بساک پرچم، طول میله پرچم و طول مادگی بودند (Persson, 1992). برای اندازه‌گیری صفت رنگ از روش کددهی با استفاده از نرم افزار AutoCAD 2010 استفاده شد تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی با استفاده از نرم افزارهای Minitab 16 و Statistics 18 PASW انجام شد.

فروردین و اردیبهشت ۱۳۸۸ جمع‌آوری گردید. با توجه به توزیع جغرافیائی سه ناحیه به هشت جمعیت تقسیم شد (جدول ۱). 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 صورتی که 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 موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های مورد ارزیابی، مشخص شده است.

اندازه‌گیری‌های تعداد گل، ارتفاع گیاه و قطر ساقه در محل نمونه‌گیری انجام شد (Persson, 1992). از هر گیاه نمونه‌های برگ، براکته و گل جدا شده و به آزمایشگاه منتقل گردید؛ از برگ و براکته تازه هر گیاه

جدول ۱- مشخصات مناطق جمع‌آوری نمونه‌های گونه لاله واژگون

ردیف	ناحیه	جمعیت	استان	تعداد نمونه	کد نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	حداقل ارتفاع از سطح دریا (m)
۱	زاگرس	استهبان	فارس	۲۰	E1-E20	۵۴° ۴۱' ۳۲/۴"	۲۹° ۳۴' ۱۲/۶"	۲۵۹۸
۲	جنوبی	گردنه مورپریسه یاسوج	کهگیلویه و بویراحمد	۲۰	Y1-Y20	۵۱° ۳۹' ۵۷/۶"	۳۰° ۳۲' ۳۷/۱"	۲۶۴۸
۳		آستانه	اصفهان	۲۰	A1-A20	۵۱° ۵۱' ۳۱/۷"	۳۱° ۵۷' ۲۱/۲"	۲۶۹۸
۴	زاگرس	کوه‌رنگ	چهارمحال و بختیاری	۲۰	K1-K20	۵۰° ۱۳' ۴۹/۹"	۳۳° ۳۴' ۰۶/۸"	۲۵۶۲
۵	مرکزی	گلستان کوه خوانسار	اصفهان	۲۰	G1-G20	۵۰° ۲۳' ۵۷/۱"	۳۳° ۰۹' ۱۲/۴"	۲۷۶۵
۶		اشترانکوه دورود	لرستان	۲۰	O1-O20	۴۹° ۱۲' ۰۱/۳"	۳۳° ۲۱' ۴۱/۴"	۲۷۴۵
۷	زاگرس	پرو	کرمانشاه	۲۰	P1-P20	۴۷° ۲۲' ۳۴/۱"	۳۴° ۳۳' ۴۵/۶"	۲۶۹۴
۸	شمال غرب	گردنه دولاب	کردستان	۲۰	Kr1-Kr20	۴۷° ۴۴' ۲۷/۳"	۳۵° ۰۲' ۲۳/۵"	۲۶۵۰

استخراج DNA و تجزیه ISSR

واحد، کلرید منیزیم (۲/۵ mM)، مخلوط ۴ نوکلئوتید (۰/۲۴mM)، بافر PCR (۱*)، فورامید (۱/۱) انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر BioRad با برنامه‌های دمایی یک چرخه ۴ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی-گراد و ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی-گراد، ۱ دقیقه در ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی-گراد (بر حسب دمای اتصال آغازگر) و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی-گراد و مرحله بسط نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی-گراد انجام شد. تفکیک محصولات واکنش با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. الگوهای چندشکل بر اساس حضور و عدم حضور نوار به ترتیب با ۱ و صفر امتیازبندی شدند. برای تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYS 2.2.1j (Rolf, 2010)

استخراج DNA به روش تغییر یافته CTAB (Murry & Thompson, 1980) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان تعیین گردید. از شش آغازگر مکمل توالی‌های ریزماهواره دارای نوکلئوتید اضافه در انتهای ۳' شامل (CA)6AG، (CT)8G، (GA)8YT، (AC)YG، (AC)8G و (CA)8G استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۳ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۷۵ نانوگرم، آنزیم Taq DNA polymerase (۱)

فراوانی نام آمل است. حداکثر PIC برای نشانگرهای غالب ۰/۵ می باشد. شاخص مارکر (Marker Index, MI)، با استفاده از معادله $MI=DI \times EMR$ محاسبه گردید.

بهره‌گیری شد. محتوی اطلاعات چند شکلی (Polymorphic information content, PIC) هر یک از آغازگرهای ISSR با استفاده از رابطه $PIC_i = 1 - \sum p_i^2$ (Powell et al. 1996) محاسبه شد، که p_i^2 برابر با

جدول ۲ - درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات شش آغازگر مورد استفاده برای ۱۶۰ ژنوتیپ *F. imperialis* L.

ردیف	نام آغازگر	توالی	تعداد کل نوار	تعداد نوار چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI
۱	17899A	(CA)6AG	۷	۱	۱۴/۲۹	۰/۱۴	۰/۰۰۱۹
۲	UBC 815	(CT)8G	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۹	۴/۷
۳	UBC 840	(GA)8YT	۹	۸	۸۸/۸۹	۰/۲۵	۱/۸۴
۴	UBC 857	(AC)8YG	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۰	۳/۵۸
۵	UBC 827	(AC)8G	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۴۵	۴/۵
۶	UBC 818	(CA)8G	۱۰	۹	۹۰	۰/۳۶	۲/۳
	میانگین		۹/۵	۸/۱۷	۸۵/۹۶	۰/۳۱	۲/۸

نتایج و بحث

بررسی محتوای اطلاعات چند شکلی ISSR

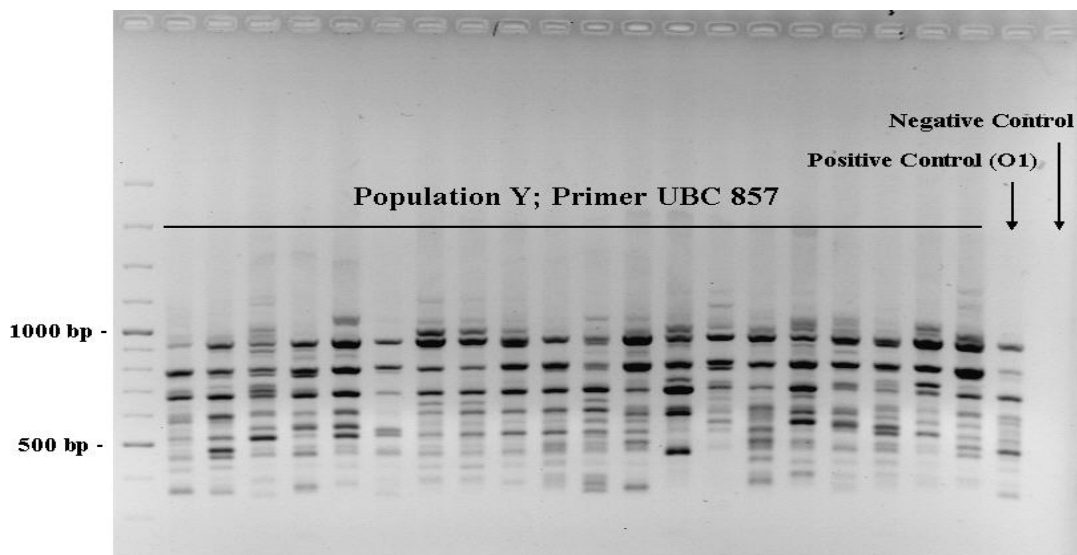
آغازگرهای مورد استفاده چند شکلی مناسبی تولید نمودند و تکرارپذیری بالایی داشتند. نوارهای حاصل از آغازگرهای UBC 815، UBC 840، UBC 857، UBC 818 و UBC 827 در سرتاسر ژل توزیع چندشکل‌تری نسبت به نوارهای حاصل از آغازگر 17899A داشتند (شکل ۱). در مجموع ۵۷ نوار ایجاد شد که از بین آنها ۴۹ نوار، چند شکل بودند. بیشترین تعداد نوار چندشکل مربوط به آغازگر UBC 815 با ۱۲ نوار چندشکل و کمترین تعداد نوار چندشکل مربوط به آغازگر 17899A با ۱ نوار چندشکل بود. میانگین درصد چندشکلی مشاهده شده برابر با ۸۵/۶ درصد و میانگین تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر واحد سنشش برابر با ۸/۱۷ نوار بود. در مورد نشانگرهای ISSR هر واحد سنشش معادل یک آغازگر می‌باشد. بیشترین مقدار PIC، ۰/۴۵ و مربوط به آغازگر UBC 827 و کمترین میزان آن، ۰/۱۴ و مربوط به آغازگر 17899A و میانگین PIC محاسبه شده در این تحقیق ۰/۳۱ بود. بالا بودن میزان PIC در این مطالعه نشان دهنده سطح بالایی تمایز می‌باشد. شاخص نشانگر بر اساس تعداد نوارهای چند شکل برای هر آغازگر محاسبه شد که از ۰/۱۹ تا ۴/۴۵ متغیر بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر ۴/۴۵

در این رابطه DI شاخص تنوع (Diversity Index) و EMR ضریب موثر چندگانه (Effective Multiplex Ratio) می‌باشد، که $DI = 1 - \sum p_i^2$ و $EMR = np\beta_i$ است، که p_i فراوانی نام آمل، np تعداد مکان‌های چند شکل و β_i نسبتی از مکان‌های چند شکل می‌باشد، و به صورت $\beta = n_{np} / (np + \beta)$ محاسبه می‌گردد که n_{np} تعداد مکان‌های تک شکل است. 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 گردید (Mantel, 1967)، و در نهایت تقسیم‌بندی سلسله مراتب واریانس مولکولی بین و درون جمعیت‌های مورد بررسی انجام شد. تجزیه و تحلیل مذکور با استفاده از نرم افزار GenAlex 6.4 انجام شد، و معنی‌دار بودن واریانس‌ها ۱۰۰۰ بار مورد آزمون قرار گرفت (Peakall & 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 آلل‌های 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).

قدرت تفکیک چندانی در مقایسه با سایر آغازگرها نداشت.

مربوط به آغازگر UBC 827 بود که نشان دهنده قدرت تفکیک بالای این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرها می‌باشد. آغازگر 17899A با شاخص نشانگری ۰/۰۱۹



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR نشانگر UBC 857 همراه نمونه شاهد (O-1) روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

نشانگرهای ISSR به صورت کاملاً متجانسی در بین و درون جمعیت‌های نمونه برداری شده توزیع شده است. بر اساس این دندروگرام، ۱۶۰ نمونه مورد بررسی، به نحوی مشخص داخل جمعیت‌های مربوط به خود قرار گرفتند.

تجزیه واریانس مولکولی ISSR

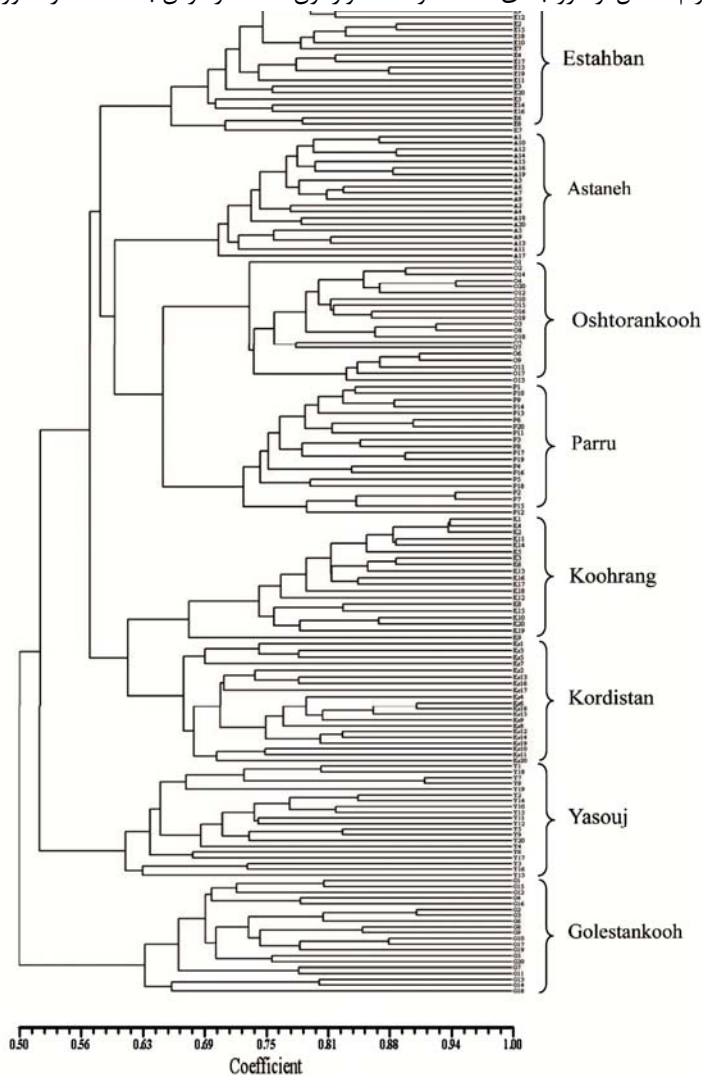
تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی به روش AMOVA با استفاده از نرم افزار GenAlex 6.45 و بر اساس داده‌های نشانگر ISSR و در دو حالت انجام گردید. در حالت اول همه جمعیت‌ها بدون گروه‌بندی بر اساس منطقه جغرافیایی بررسی شدند و در حالت دوم سه ناحیه بر اساس فاصله جغرافیایی جمعیت‌ها مشخص شد که در این حالت جمعیت‌های استهبان و یاسوج در گروه اول، جمعیت‌های کوه‌رنگ، آستانه، گلستان‌کوه و اشتران‌کوه در گروه دوم و جمعیت‌های پرو و کردستان در گروه سوم قرار گرفتند. نتایج حاصل در جدول‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. در تجزیه واریانس مولکولی با احتساب گروه‌بندی ناحیه‌ای درصد واریانس بین گروه‌ها بسیار پایین (۰/۰۰ درصد) و از نظر آماری غیر معنی-دار شد در حالی که واریانس بین جمعیت‌های داخل این

تجزیه خوشه‌ای ISSR

ابتدا آزمون منتل (Mantel, 1967) برای ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده بر اساس روش خوشه‌بندی UPGMA انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه ضریب تشابه جاکارد دارای آماره t منتل برابر با ۸/۷۴ و بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۸۷ بود که نشان دهنده برآزش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی بر اساس ضریب تشابه جاکارد می‌باشد با توجه به ماتریس ضرایب تشابه جاکارد، ضریب تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی از ۰/۳۰ تا ۰/۹۴ متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین دو نمونه P-2 و P-7 با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۹۴ بود که هر دو متعلق به جمعیت پرو از استان کرمانشاه می‌باشند. کمترین شباهت ژنتیکی بین دو نمونه G-11 و Kr-18 با ضریب تشابه ۰/۳۰ بود. نمونه G-11 متعلق به جمعیت گلستان‌کوه و نمونه Kr-18 متعلق به جمعیت کردستان می‌باشند. در شکل ۲ دندروگرام حاصل از گروه‌بندی نمونه‌های لاله واژگون بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA نشان داده شده است. تنوع حاصل از

گروه‌ها و همچنین واریانس بین افراد بسیار معنی‌دار شد که به ترتیب ۴۴/۰۵ درصد و ۵۵/۹۵ درصد به دست آمد.

شکل ۲- دندروگرام حاصل از گروه‌بندی ۱۶۰ نمونه لاله واژگون منطقه زاگرس با استفاده از الگوریتم UPGMA.



جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی ISSR به دست آمده از ۱۶۰ نمونه لاله واژگون زاگرس بدون گروه‌بندی ناحیه‌ای

P value	Φ value	درصد واریانس	واریانس اجزاء	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
<۰/۰۰۱	Fst=۰/۴۳۵	۴۴/۰۵	۴/۳۳۲	۶۵۳/۴۲۱	۷	بین جمعیت‌ها
		۵۵/۹۵	۵/۵۰۲	۸۳۶/۳۵۰	۱۵۲	داخل جمعیت‌ها
		۱۰۰	۹/۸۳۴	۱۴۸۹/۷۸۱	۱۵۹	کل

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی ISSR به دست آمده از ۱۶۰ نمونه لاله واژگون زاگرس با گروه‌بندی ناحیه‌ای

P value	Φ value	درصد واریانس	واریانس اجزاء	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۳۷	Fct= ۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۷۱/۵۰۶	۲	بین گروه‌ها
<۰/۰۰۱	Fsc=۰/۴۳۰	۴۴/۰۵	۴/۳۳۲	۵۸۱/۹۲۵	۵	بین جمعیت‌های داخل گروه‌ها
<۰/۰۰۱	Fst= ۰/۴۵۲	۵۵/۹۵	۵/۵۰۲	۹۳۶/۳۵۰	۱۵۲	داخل جمعیت‌ها
		۱۰۰	۹/۸۳۴	۱۴۸۹/۷۸۱	۱۵۹	کل

است که فاصله جغرافیایی تأثیر مهمی روی ساختار ژنتیکی و جریان ژنی دارد (Wang et al, 2008).

تنوع به وجود آمده بین جمعیت‌ها به علت فاصله مکانی زیاد بین جمعیت‌ها است. چنین استنباط شده

است. از کل تنوع ژنی به دست آمده توسط نشانگر مولکولی ISSR (۰/۳۵۸۳)، میزان ۰/۲۲۱۱ از تنوع کل مربوط به داخل جمعیت‌ها و ۰/۱۳۷۲ مربوط به بین جمعیت‌ها می‌باشد. بنابراین بیشتر تنوع ژنی مربوط به تنوع داخل جمعیت‌ها می‌باشد و نسبت Hw/Ht برابر ۰/۶۲ است. مقدار Fst به دست آمده در بررسی تنوع ژنی کمتر از Fst به دست آمده در تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۵) است. بنابراین نسبت کمتری از تفاوت‌های ژنتیکی مربوط به تفاوت بین جمعیت‌ها می‌باشد، این مقدار تفاوت، نیز معنی‌دار (Fst=۰/۳۸۳۲) و ($P < ۰/۰۰۰۱$) است. 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. کاهش جریان ژنی بین جمعیت‌ها عمدتاً به دلیل زیاد بودن فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌ها ناشی می‌شود که پراکندگی اسپورها، گامت‌ها یا پیازهای رویشی را بین جمعیت‌های مورد مطالعه محدود می‌نماید.

گیاهان موجود در مناطق مختلف تبادل ژنتیکی چندانی را ندارند؛ ولی گیاهان موجود در یک منطقه تبادل ژنتیکی فراوانی با هم دارند (Wang et al, 2008). اگر در مجموعه لوکوس‌ها، داده گم‌شده‌ای وجود نداشته باشد، نتیجه حاصل از تجزیه مولکولی لوکوس به لوکوس، مشابه نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام خواهد بود و در صورت وجود داده‌های گم شده، درجه آزادی لوکوس‌ها کم می‌شود و بسته به تعداد داده‌های گم‌شده، مقادیر واریانس به دست آمده در دو آنالیز تفاوت خواهد داشت (Mohammadi & prasana, 2003). در این بررسی، به دلیل حضور تمام لوکوس‌ها نتیجه تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام کاملاً منطبق با تجزیه واریانس مولکولی بر اساس لوکوس به لوکوس بود. **تجزیه واریانس ژنی بر اساس نشانگرهای ISSR**
آنالیز آماری تنوع ژنی بین و داخل جمعیت‌های لاله واژگون ایران با استفاده از نرم افزار POPGENE3.1 انجام شد. تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد فراوانی‌های آللی لاله واژگون و حتی جنس *Fritillaria* گزارش نشده

جدول ۵- نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های لاله واژگون با استفاده از نشانگرهای ISSR.

جمعیت	n	Ht	Hw	SE (Hw)	Hb	SE (Hb)	Fst	Lower 99% Fst	Upper 99% Fst	P-value
لاله واژگون	۸	۰/۳۵۸۳	۰/۲۲۱۱	۰/۰۰۸۹۶۸	۰/۱۳۷۲	۰/۰۱۰۱۹۱	۰/۳۸۳۲	۰	۰/۰۲۷۸	<۰/۰۰۰۱

Ht: تنوع کل، Hw: میانگین تنوع داخل جمعیت‌ها، Hb: میانگین تنوع بین جمعیت‌ها، Fst: تفاوت بین جمعیت‌ها، Lower 99% و Upper 99% مقادیر Fst که بیانگر وجود تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها، در توزیع تصادفی ۹۹ درصد بر اساس ۱۰۰۰ جایگزینی تصادفی هستند.

و کوه‌رنگ به میزان ۰/۴۷۰۸ و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های کوه‌رنگ و استهبان به میزان ۰/۲۲۴۲ حاصل شد.

ماتریس فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس ضریب فاصله Fst محاسبه شد (جدول ۶). بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های اشتران‌کوه

جدول ۶- ماتریس فاصله ژنتیکی Fst بین ۸ جمعیت لاله واژگون منطقه زاگرس

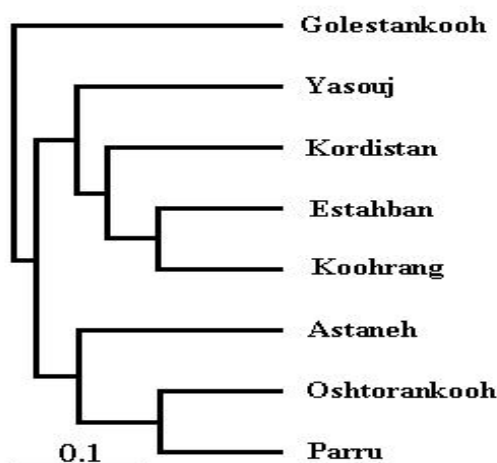
جمعیت	استهبان	یاسوج	کوه‌رنگ	آستانه	گلستانکوه	اشترانکوه	پرو	کردستان
استهبان	۰/۰۰۰							
یاسوج	۰/۳۶۸۹	۰/۰۰۰						
کوه‌رنگ	۰/۲۲۴۲	۰/۳۷۹۳	۰/۰۰۰					
آستانه	۰/۳۶۳۱	۰/۳۵۶۰	۰/۳۲۶۶	۰/۰۰۰				
گلستان کوه	۰/۴۰۲۷	۰/۳۵۸۸	۰/۳۹۵۶	۰/۴۲۵۰	۰/۰۰۰			
اشتران کوه	۰/۳۴۷۳	۰/۳۵۶۰	۰/۴۷۰۸	۰/۴۲۳۵	۰/۴۵۳۶	۰/۰۰۰		
پرو	۰/۳۵۹۱	۰/۴۰۶۵	۰/۳۶۴۸	۰/۳۲۳۹	۰/۴۴۶۷	۰/۳۲۲۷	۰/۰۰۰	
کردستان	۰/۳۹۳۹	۰/۳۸۲۴	۰/۲۸۰۰	۰/۳۷۶۵	۰/۴۴۵۸	۰/۴۱۵۹	۰/۳۵۱۴	۰/۰۰۰

استفاده از الگوریتم UPGMA را نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود ۸ جمعیت مورد بررسی در

شکل ۳ دندروگرام حاصل از خوشه‌بندی ۸ جمعیت لاله واژگون بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی Fst با

ایران برآورد گردید. حالت پروتوزنی اندام‌های زایشی باعث دگرگشتی در این گیاه شده است (Burquez, 1989) و به دلایل ژنتیکی درصد تشکیل بذر پایین می‌باشد. (Burquez 1989) گزارش نمود که پرندگان کوچک در گرده افشانی این گیاه نقش دارند. مکانیسم منحصر به فرد انتقال دانه گرده توسط پرندگان وابسته به جمعیت پرندگان و شرایط محیطی مبنی بر میزان منابع غذایی این پرندگان دارد (Peters & Pirl, 1995). بنابراین انتقال اسپرم، بذر و پیاز رویشی در لاله واژگون در فاصله جغرافیایی زیاد به ندرت اتفاق می‌افتد و فاصله زیاد جغرافیایی (>150 Km) بین دو رویشگاه مانع جغرافیایی جهت جریان ژنی بین جمعیت‌های لاله واژگون محسوب می‌گردد.

فاصله ژنتیکی $F_{st}=0/1$ به سه خوشه اصلی تقسیم شده‌اند. در خوشه اول جمعیت گلستانکوه به تنهایی قرار گرفت، در خوشه دوم جمعیت‌های یاسوج، کردستان، استهبان و کوه‌رنگ واقع شدند. در خوشه سوم جمعیت‌های آستانه، اشترانکوه و پرو واقع شدند. تنوع به وجود آمده بین جمعیت‌ها به علت فاصله مکانی زیاد بین جمعیت‌ها است. بیشتر بودن تنوع داخل جمعیت‌های لاله واژگون، وابسته به مکانیسم انتقال دانه گرده و تکثیر غیرجنسی در این گیاه است که منجر به افزایش جریان ژنی و افزایش تنوع داخل جمعیت‌ها می‌شود. در این مطالعه نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی و تجزیه تنوع ژنی یکسان بوده و در هر دو مورد تنوع داخل جمعیت‌ها بیشتر از تنوع بین جمعیت‌های لاله واژگون



شکل ۳- دندروگرام حاصل از گروه بندی ۸ جمعیت لاله واژگون منطقه زاگرس بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی Fst

تجزیه مورفولوژیکی

اولین مؤلفه که بزرگ‌ترین مؤلفه به شمار می‌رود، ۱۸/۱۶ درصد از تنوع کل را توجیه نمود. ۷۹/۸۶ درصد از تنوع توسط ۱۰ مؤلفه اول و ۱۰۰ درصد تنوع توسط ۳۱ مؤلفه توجیه می‌شود. در شکل ۴ پراکنش نمونه‌های متعلق به ۸ جمعیت، در اطراف دو مؤلفه اصلی اولیه نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود غیر از افراد جمعیت استهبان، الگوی خاصی در پراکنش داده‌ها مشاهده نمی‌شود؛ از سوی دیگر نمونه‌های پرت نیز در اطراف مؤلفه‌ها مشاهده نمی‌شود. این امر نشان دهنده عدم تأثیرگذاری عامل جمعیت (شرایط محیطی زنده و غیر زنده) در دسته‌بندی مورفولوژیکی لاله‌های واژگون منطقه زاگرس می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای و رسم

در این مطالعه به منظور اندازه‌گیری دقیق‌تر صفات مورفولوژیکی تعداد ۲۸۵ نمونه لاله واژگون از جمعیت‌های مورد بررسی منطقه زاگرس ایران ارزیابی گردید. بر این اساس میانگین طول پرچم ۳۳ میلی‌متر، طول بساک ۱۱ میلی‌متر و طول مادگی ۳۷ میلی‌متر محاسبه شد. این در حالی است که طول میله پرچم حداقل ۲۰ میلی‌متر نسبت به مقدار گزارش شده توسط غلامی و همکاران (۱۳۸۶) بیشتر است. در جدول ۷ اندازه‌های مربوط به ۳۲ صفت مورفولوژیکی لاله واژگون منطقه زاگرس ارائه شده است. تجزیه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار PASW Statistics 18 انجام گرفت.

خوشه‌بندی افراد مبنی بر تفکیک جمعیت‌ها مشاهده نگردید (شکل دندروگرام نشان داده نشده است). ولی افراد جمعیت استهبان در فاصله ۶۰۰ تشکیل یک خوشه مجزا را داده‌اند. اکثر افراد

دندروگرام به روش Ward Linkage، توسط نرم افزار Minitab ver 17 انجام شد. نتیجه به دست آمده از آنالیز خوشه‌ای نشان دهنده همان الگوی به دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی است. با توجه به دندروگرام به دست آمده از صفات مورفولوژیک الگوی خاصی در

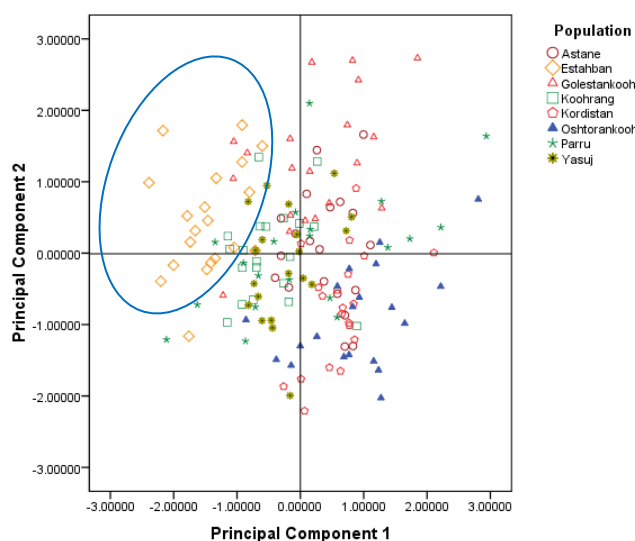
جدول ۷- صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده از ۲۸۵ نمونه لاله واژگون زاگرس ایران

ردیف	صفت	علامت اختصاری	بیشینه	کمینه	میانگین
۱	ارتفاع ساقه	HS (mm)	۹۶/۸۰	۲۲/۲۰	۴۹/۶۴
۲	قطر ساقه	DS (mm)	۲۰/۲۰	۳/۲۵	۱۰/۲۳
۳	تعداد گل	NF	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۴/۷۵
۴	رنگ گل	CF	۷/۰۰	۱/۰۰	۴/۱۷
۵	طول برگ فوقانی	LLU (mm)	۲۴۳/۳۶	۳۶/۰۹	۱۴۱/۷۲
۶	عرض برگ فوقانی	WLU (mm)	۷۱/۵۳	۱۲/۸۹	۳۶/۶۷
۷	مساحت برگ فوقانی	ALU (mm ²)	۹۱۸۱/۵۵	۲۵/۶۷	۳۴۹۳/۱۹
۸	طول برگ میانی	LLM (mm)	۲۶۲/۸۰	۸۳/۷۴	۱۴۷/۵۸
۹	عرض برگ میانی	WLM (mm)	۷۲/۳۳	۱۹/۶۲	۴۴/۳۷
۱۰	مساحت برگ میانی	ALM (mm ²)	۱۰۲۱۴/۶۹	۴۴/۳۷	۴۴۷۸/۵۹
۱۱	طول برگ تحتانی	LLD (mm)	۲۳۶/۵۸	۵۴/۳۱	۱۴۶/۷۲
۱۲	عرض برگ تحتانی	WLD (mm)	۹۲/۹۰	۱۴/۹۷	۷۵/۴۰
۱۳	مساحت برگ تحتانی	ALD (mm ²)	۱۲۷۸۴/۹۹	۶۶/۳۲	۵۶۸۷/۶۵
۱۴	طول براکته داخلی	LBI (mm)	۱۴۰/۳۳	۸/۳۷	۹۱/۲۱
۱۵	عرض براکته داخلی	WBI (mm)	۲۸/۱۷	۴/۳۸	۱۲/۲۰
۱۶	مساحت براکته داخلی	ABI (mm ²)	۱۹۰۷/۵۵	۱۴/۰۰	۷۷۶/۴۵
۱۷	طول براکته میانی	LBM (mm)	۱۷۲/۶۲	۲۸/۶۴	۹۷/۱۰
۱۸	عرض براکته میانی	WBM (mm)	۳۲/۴۱	۴/۸۳	۱۵/۳۳
۱۹	مساحت براکته میانی	ABM (mm ²)	۲۶۱۴/۹۷	۱۶۹/۸۸	۱۰۱۷/۹۲
۲۰	طول براکته خارجی	LBO (mm)	۱۶۴/۴۱	۵۳/۵۴	۹۹/۳۹
۲۱	عرض براکته خارجی	WBO (mm)	۴۲/۸۶	۷/۷۰	۱۹/۵۵
۲۲	مساحت براکته خارجی	ABO (mm ²)	۴۵۷۰/۴۸	۳۱۴/۱۳	۱۳۱۶/۹۶
۲۳	طول کاسبرگ	LS (mm)	۷۰/۱۸	۲۸/۷۸	۵۲/۸۴
۲۴	عرض کاسبرگ	WS (mm)	۳۱/۶۳	۷/۹۰	۱۷/۴۲
۲۵	مساحت کاسبرگ	AS (mm ²)	۱۲۸۴/۲۷	۱۸۳/۴۷	۶۸۳/۷۳
۲۶	طول گلبرگ	LPe (mm)	۶۹/۴۴	۲۷/۱۴	۵۲/۲۴
۲۷	عرض گلبرگ	WPe (mm)	۳۵/۱۴	۹/۲۳	۲۱/۸۹
۲۸	مساحت گلبرگ	Ape (mm ²)	۱۴۲۱/۷۶	۲۳۷/۷۴	۷۹۹/۱۳
۲۹	طول بساک پرچم	LA (mm)	۲۴/۰۵	۵/۸۴	۱۱/۳۶
۳۰	قطر بساک پرچم	DA (mm)	۴/۰۶	۱/۵۱	۲/۶۱
۳۱	طول میله پرچم	LF (mm)	۶۰/۶۸	۹/۹۹	۳۳/۰۶
۳۲	طول مادگی	LPi (mm)	۶۴/۱۷	۸/۱۵	۳۷/۴۸

بیان نمود که با توجه به تعداد صفات کمی در مقایسه با صفات کیفی (۳۰:۲) دندروگرام به دست آمده تحت تأثیر صفات کمی است. اما در مورد صفت کیفی رنگ گل که مهمترین صفت متمایز کننده واریته‌ها از یکدیگر است، در صورتی که توسط یک مکان ژنی کنترل شود،

جمعیت استهبان از واریته آرورا می‌باشند. واریته آرورا علاوه بر صفت رنگ گل (نارنجی روشن) دارای اندام‌های ظریف با ابعاد کم می‌باشند بنابراین افراد این جمعیت به همراه افرادی که دارای این خصوصیات ظریف باشند در یک خوشه مجزا قرار گرفته‌اند. می‌توان

این احتمال وجود دارد که الگوی متمایز کننده‌ای بین جمعیت‌ها و حتی افراد آن وجود داشته باشد.



شکل ۴- نقشه پراکنش ۱۶۰ نمونه لاله واژگون زاگرس ایران، در اطراف دو مؤلفه اصلی.

صفات مورفولوژیکی مشاهده نگردید (Roldan-Ruiz et al, 2001).

نتیجه گیری کلی

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده توانایی نشانگر مولکولی ISSR در جداسازی جمعیت‌های مختلف لاله واژگون می‌باشد. با بهره‌گیری از نشانگر ISSR سطح پایینی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و سطح بالایی از تمایز ژنتیکی بین هشت جمعیت لاله واژگون آشکار گردید. بنابراین بالا بودن تنوع درون جمعیت‌ها خود عاملی است که از انقراض جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند. حفظ تنوع ژنتیکی یکی از اهداف اصلی حفاظت گونه‌های در حال انقراض می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که مدیریت صحیح برای حفاظت جمعیت‌های وحشی لاله‌ی واژگون از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌های لاله واژگون عامل محدود کننده جریان ژنی بین جمعیت‌ها و همچنین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها محسوب می‌گردد. از سوی دیگر صفات مورفولوژیکی قادر به شناسایی تنوع موجود نبوده و نتایج حاصل از صفات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولی ISSR، منطبق نبود. با توجه به اینکه صفات مورفولوژیکی مربوط به بخش‌های رمزکننده ژنوم است، و تحت تأثیر شرایط

مقایسه داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی

مقایسه تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های ۳۲ صفت مورفولوژیکی با داده‌های مولکولی ISSR نشان داد که تشابه چندانی بین این دو الگو وجود ندارد. نتایج حاصل از مقایسه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز تأیید کننده نتایج تجزیه خوشه‌ای بود. از سوی دیگر محاسبه ضریب کوفنتیک (Mantel, 1967) بین ماتریس‌های تشابه حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی ($r=0/25$) عدم وجود همبستگی معنی‌دار بین آن‌ها را نشان داد. یکی از دلایل قابل ذکر آن است که میزان تمایز مولکولی تحت تأثیر جهش، رانده شدگی ژنتیکی و جریان ژنی می‌باشد اما تفاوت در صفات مورفولوژیک بیشتر وابسته به انتخاب طبیعی و تحت تأثیر عوامل محیطی است. عدم تطابق نتایج حاصل از داده‌های مورفولوژیکی، مولکولی RAPD و بیوشیمیایی در بررسی تاکسونومیکی گونه‌های متعلق به جنس *Fritillaria* در ترکیه نیز به دست آمده است (Celebi et al, 2006). چنین نتایجی در بررسی گیاهان دیگری که با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام شده است نیز مشاهده شده است، به عنوان نمونه در بررسی خویشاوندی چند رقم گیاه چمنی چچم، همبستگی معنی‌داری بین ماتریس-های تشابه نشانگرهای مولکولی (AFLP و STS) و

محیطی نیز قرار می‌گیرند، بنابراین عدم وجود صفات مورفولوژیکی بدیهی است. همبستگی معنی‌دار بین نشانگرهای مولکولی ISSR و

REFERENCES

1. Ainong, Sh., Kantartzi, S., Mmbaga, M. & Chen, P. (2010). Development of ISSR PCR markers for diversity study in dogwood (*Cornus* spp.). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3), 189-194.
2. Alp, S., Arsalan, N. & Koyuncu, M. (2009). Established forms of *Fritillaria imperialis* L. –a naturally growing species in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4), 1573-1576.
3. Burquez, A. (1989). Blue tits, *Parus caeruleus*, as pollinators of crown imperial, *Fritillaria imperialis* L, in Britain. *Oikos*, 55, 335-340.
4. Celebi, A., Texen, M., Acik, L. & Aytac, Z. (2006). Taxonomic relationships in genus *Fritillaria* (Liliaceae): Evidence from RAPD-PCR and SDS PAGE of seed proteins. *Acta Botanica Hungarica*, 50, 325-343.
5. Chen, Y., Zhau, R., Lin, X., Wu, K., Qian, X. & Huang, Sh. (2008). ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars. *Aquatic Botany*, 89, 311-316.
6. Denduangboripant, J., Sornsuda, S. & Wilasinee, S. (2010). Determination of local tobacco cultivars using ISSR Molecular Marker. *Chiang Mai Journal of Science*, 37(2), 293-303.
7. Fares, K., Guasmi, F., Touil, L., Triki, T. & Ferchichi, A. (2009). Genetic diversity of Pistachio tree using Inter-Simple Sequence markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. *Biotechnology*, 8(1), 24-34.
8. Gholami, M., Mahmoodi, A. & Gholami M. (2007). Micro- propagation of Iranian Imperial Crown. MSc. Thesis, Boalisina University. (In Farsi)
9. Lian, C., Zhao, Z. & Hogesta, T. (2001). A simple method for developing of microsatellite markers using amplified fragment of inter simple sequence repeat (ISSR). *Plant Research*, 114, 381-385.
10. Lin, X. C., You, Y. F., Liu, J., Peng, J. S., Liao, G. L. & Fang, W. (2010). Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. *Genetics and molecular research*, 9 (3), 1398-1404.
11. Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
12. Mohammadi, S. A. & Prassana, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
13. Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, A., Sardari, M., Ebrahimie, E., 2008. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 395-399.
14. Murray, H. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high- molecular- Weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
15. Nadeem, M. A., Rahman, A. U., Choudhary, M. I., Sener, B., Erdogan, I. & Tsuda, Y. (2002). New class of steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis*. *Phytochemistry*, 63, 115-122.
16. Paradeep, R., Sarla, N. & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
17. Peakall, R. & Smouse, P. E. (2010). GenAlEx 6.4: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295
18. Persson, K. (1992). Liliaceae III. In: Rechinger KH (ed.) *Flora Iranica*. 170, 1-40. Graz: Akademische Druck-u-Verlagsanstalt.
19. Peters, W. S., Pirl, M., Gottsberger, G. & Peters, D. S. (1995). Pollination of crown imperial *Fritillaria imperialis* by great tit *Parus major*. *Journal of Ornithology*, 136, 207-212.
20. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, Mm. Voge, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
21. Rahman, A., Akhtar, M. N., Choudhary, M. I., Tsuda, Y., Sener, B., Khalid, A. & Parvez, M. (2002). New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1013-1016.
22. Rix, E. M. (1977). *Fritillaria* L. (Liliaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany*, 1, 75-95. (In Farsi).
23. Rohlf, F. J. (2010). NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.21j. Exeter Software. Setauket, New York.
24. Roldan-Ruiz, F. A., Galliland, T. J., Dubreuil, C., Dillman, C. & Lallemand, J. (2001). A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lilium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1161-1168.

25. Terzopoulos, P. J. & Bebeli, P. J. (2008). DNA and morphological diversity of selected Greek tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Scientia Horticulturae*, 116, 354-361.
26. Wang, S., Jinglin, Y., Gao, W., Pang, J. & Yu, J. (2006). Using X-ray diffractometry for identification of *Flitillaria* preparations according to geographical origin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 10, 48-51.
27. Wang, X., Zhao, F., Hu, Z., Critchley, A. T., Morrell, S. L. & Duan, D. (2008). Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *chonadrus crispus* populations from North Atlantic. *Aquatic Botany*, 88, 154-159.
28. Xiao, M., Zhang, X. Q., Zhou, Y. H., Bai, S. Q. & Liu, W. (2008). Assessing genetic diversity of *Elymus sibiricus* (Poaceae:Triticeae) Populations from Qinghai-Tibet Plateau by ISSR markers. *Biochemical Systematic and Ecology*, 36, 514-522.
29. Yeh, F. C., Yang, R. C. & Boyle, T. (1999). Popgene version 1.31, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
30. Ziekiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-18.