بررسی سیتوژنتیکی برخی اکوتیپ‌های گل لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) در استان چهار محال و بختیاری

هادی جعفری [۱]، علیرضا بابایی [۲*]، قاسم کریم زاده [۳]، مرضیه احمدی روشن [۴]
۱-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران .
۳- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۴- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
* **نویسنده مسئول: علیرضا بابایی** a.babaei@hotmail.com

چکیده

در این بررسی، تعداد ۴ اکوتیپ گل لاله واژگون (*F.imperialis*) از نظر ویژگی های کروموزومی و کاریوتیپی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تهیه گستره های متافازی از پیش تیمار کلشیسین ۰/۰۵٪ (w/v) و رنگ آمیزی استو-اورسئین استفاده گردید. نتایج نشان داد که تمامی اکوتیپ های دیپلوئید (۲n = ۲x =۲۴) بوده و دارای ۳ نوع کروموزوم"m", "sm" و "st" در اکوتیپ ها بودند. پارامترهای طول کل کروموزوم (TL)، طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S)، نسبت بازو (AR) و شاخص سانترومری (CI) محاسبه گردید. دامنه تغییرات طول کل کروموزوم در بین اکوتیپ های مورد بررسی از۱۵/۱۲ µm تا ۱۸/۱۴ µm متغیر بود. نتایج تجزیه واریانس پارامترهای کروموزومی بیانگر وجود تنوع کروموزومی معنی دار بین اکوتیپ های مورد مطالعه بود.

کلمات کلیدی: گل لاله واژگون، *F.imperialis*، کاریوتیپ، کروموزوم، سیتوژنتیک

مقدمه

لاله واژگون گلی زینتی- داروئی است که بومی منطقه گسترده‌ای از آناتولی، فلات ایران و کوه‌پایه‌های هیمالیا می باشد. عمر این گیاه بسیار کوتاه است. گل‌دهی آن از اوایل اردیبهشت آغاز می‌شود و در فصل گرما پایان می‌یابد. لاله واژگون از گیاهان علفی پیازدار و چندساله‌است که تاکنون ۱۶ گونه آن در ایران شناسایی شده‌است (Mozafarian, 1388). پیاز آن به صورت یک غده متورم، گوشتدار بوده و دارای مقدار زیادی نشاسته و چندین عامل دارویی است. در چین پیاز گونه های لاله واژگون (*Fritillaria*) به عنوان گیاه داروئی ضد سرفه و خلط آور مورد استفاده قرار می گیرد که ترکیبی از ۹ گونه لاله واژگون می باشد که در فارماکوپه چین یاد شده است (Ambrozova *et al*., 2011; Coa *et a*l., 2008; Nadeem Akhtar *et al*., 2003). مطالعات داروشناسی مختلف نشان داد که عمده ترین اجزاء بیولوژیکی پیاز این گیاه، آلکالوئید ها می باشند که نوع و محتوایشان در میان گونه های مختلف لاله واژگون متفاوت می باشد (Wang *et al*., 2005). جمع آوری زیاد از طبیعت، گیاهان وحشی رادر معرض انقراض قرار داده است و بحث حفظ بقای این گیاه را ضروری نموده است. جنس لاله واژگون (*Fritillaria*) متعلق به خانواده Liliaceae می باشد که تا به حال ۱۲۵ گونه از آن از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است. گونه های مختلف این جنس در مناطق معتدل نیمکره شمالی پراکنش دارند. تعداد ۱۶ گونه لاله واژگون در ایران، ۲۰ گونه در آمریکا و مابقی در مناطق دیگری از اوراسیا پراکنده شده اند. جنس *Fritillaria* بر اساس صفات مورفولوژیک، در ۸ زیرجنس به نامهای *Fritillaria*، *Theresia*، *Petillium*، *Liliorhiza*، *Japonica*، *Korolkowia*، *Davidii* و *Rhinopetalum* طبقه بندی شده است (Ambrozova *et al*., 2011; Litch *et al* ., 2007; Rix, 2001;Ronsted *et al*., 2005). این جنس دارای ۱۶۵ تاکسون در سراسر جهان می باشد(Rix, 2001). ایران مرکز تنوع جنس *Fritillaria* به شمار می رود. تعداد ۱۴ گونه بومی مهم در ایران موجود است (De Hertogh and Le Nard, 1993).

مواد و روش‌ها

ویژگی های کروموزومی و کاریوتیپی ۴ اکوتیپ متعلق به گونه *F.imperialis* مورد مطالعه قرار گرفت. پیاز اکوتیپ های مورد مطالعه از نقاط مختلف کشور جمع آوری شدند (جدول ۱). پیازها طی دو ماه فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۰ جمع آوری شده و در گلخانه قرار گرفتند. پس از از بین رفتن اندام هوایی برای رفع خفتگی و تولید ریشه در دمای پایین (°C ۱۲-۷) قرار گرفتند و پس از گذشت ۳ هفته پیازها شروع به جوانه زنی کردند. برای آنالیزهای کاریوتیپی، از ریشه های ۳-۲ سانتی متری به مدت ۵ ساعت در کلشیسین ۰/۰۵٪ (w/v) در دمای اتاق پیش تیمار شده و سپس در محلول کارنوی (۳:۱، اتانول:اسیداستیک) به مدت حداقل ۲۴ ساعت در دمای یخچال قرار گرفتند. ریشه ها به مدت ۱۴ دقیقه در دمای اتاق با 1M HCl هیدرولیز شدند و سپس در محلول استو-اورسئین ۲٪ برای رنگ آمیزی قرار گرفتند. نوک ریشه ها پس از ۴-۳ ساعت قرار گرفتن در محلول رنگ آمیزی با یک قطره محلول استیک اسید ۴۵٪ له شدند و نمونه های تهیه شده توسط عدسی با بزرگنمایی X ۱۰۰ میکروسکوپ نوری Olympus BX50 از نمونه های متافازی مناسب توسط دوربین دیجیتال DP12، در حالت Super high quality (SHQ) و با فرمت Tiff عکسبرداری شد. در این بررسی تعداد کروموزوم ها، محل سانترومر، طول بازوی بلند (L) و بازوی کوتاه (S)، نسبت بازوها یا نسبت طول بازوی بلند به کوتاه (AR) و شاخص سانترومری (CI) با استفاده از نرم افزار (MicroMeasure 3.3) در پنج گستره متافازی متعلق به هر اکوتیپ محاسبه گردید. بعد از آزمون نرمال بودن، تجزیه واریانس در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار انجام شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام گردید. برای بررسی تقارن کاریوتیپی از فرم کلی کاریوتیپ (TF%) و کلاسه بندی استبینز (Stebbins 1971,) استفاده شد. نوع کروموزوم و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان و همکاران (Levan *et al.*, 1964) بررسی شد.

نتایج و بحث

براساس تصاویر متافاز میتوزی اکوتیپ های متعلق به گونه *F.imperialis* به همراه ایدیوگرام (شکل ۱) و نتایج حاصل از تجزیه کاریوتیپی (جدول ۲) تعداد کروموزوم پایه تمامی اکوتیپ های مورد مطالعه $x = ۱۲$ بود. از لحاظ سطح پلوئیدی، تمام اکوتیپ ها دیپلوئید بودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس پارامترهای کروموزومی نشان داد که بین اکوتیپ ها از لحاظ بعضی ویژگی های کروموزومی L,TL,AR اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۳) که دلالت بر وجود تنوع ژنتیکی در بین اکوتیپ های مورد مطالعه است. از لحاظ سه ویژگی طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S) و طول کل کروموزوم (TL)، اکوتیپ فخرآباد(E4) و چلگرد (E1) به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر پارامترهای مورد مطالعه را داشتند. همچنین اکوتیپ چال روغنی(E2) کمترین مقدار طول بازوی کوتاه را دارا بود. نسبت بازوها (AR) در اکوتیپ تنگه بستان (E3) در مقایسه با سایر اکوتیپ ها بیشتر بود. در همه اکوتیپ های گل لاله واژگون مورد بررسی ماهواره مشاهده شد که با نتایج مطالعات گزارش شده توسط بخشی خانیکی (Bakhshi Khaniki, 2002)مطابقت ندارد.

جدول ۱- ویژگی های کاریوتیپی در چهار اکوتیپ گل لاله واژگون

ردیف	گونه	محل جمع آوری	K.F[a]	SC[b]	TF%
E1	*F.imperialis*	شهرکرد ،چلگرد	4m + 2sm + 18st	3A	۲۳/۵۴
E2	*F. imperialis 'Lutea Maxima'*	شهرکرد، چال روغنی	4m + 20st	3A	۲۲/۳۳
E3	*F.imperialis*	شهرکرد، تنگه بستان	2m + 6sm + 16st	3B	۲۲/۱۸
E4	*F.imperialis*	شهرکرد، فخرآباد	2m+6sm+16st	3B	۲۲/۸۷

[a] Karyotype formula' فرمول کاریوتیپی

[b] Stebbins class,' دسته بندی استبینز

با استفاده از روش استبینز (Stebbins ,1971)، اکوتیپ شهرکرد چلگرد و شهرکرد چال روغنی در کلاس 3A و بقیه در 3B قرار گرفتند (جدول ۱) که بیانگر کاریوتیپ نا متقارن این اکوتیپ ها می باشد. همچنین در این بررسی اکوتیپ چلگرد دارای بیشترین مقدار TF% و تنگه بستان کمترین مقدار را داراست (جدول ۱). سه نوع کروموزوم "m", "sm", "st" بر اساس روش لوان و همکاران در اکوتیپ های مختلف تشخیص داده شد که فرمول کاریوتیپی آنها در جدول ۱ آمده است. تعداد ۲ اکوتیپ تنگه بستان و فخرآباد دارای فرمول کاریوتیپی مشابه با ۳ نوع کروموزوم"m", "sm", "st"بودند در حالیکه ۲ اکوتیپ دیگر فرمول کاریوتیپی متفاوتی را نشان دادند.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی در چهار اکوتیپ گل لاله واژگون (*F.imperialis*)

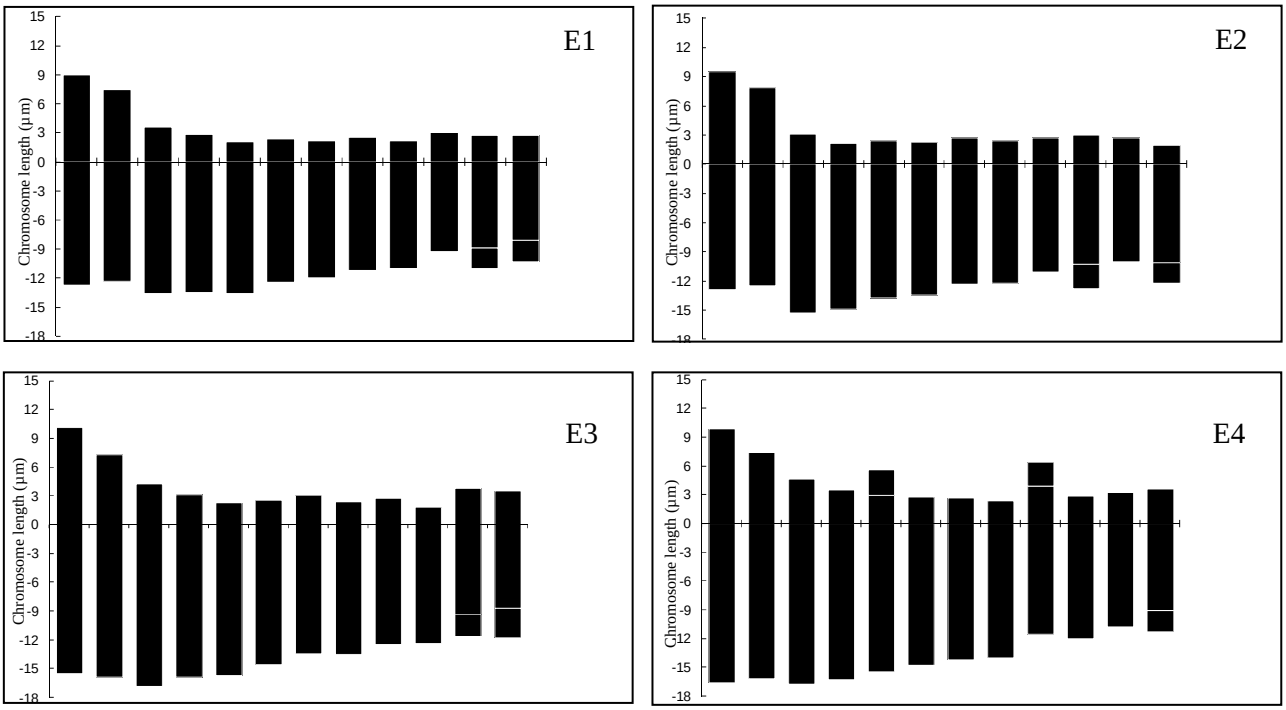
منبع تغییرات	Df	میانگین مربعات				
		S	L	TL	AR	CI
اکوتیپ	۳	۰/۴۰ ^{ns}	۶/۴۹ *	۹/۸۸ *	۰/۳۴ *	۰/۰۰۰۲۱ ^{ns}
خطا	۱۶	۰/۱۶	۱/۳۲	۲/۲۸	۰/۱۰	۰/۰۰۰۰۹

^{ns} و * : عدم اختلاف معنی دار و اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪

جدول ۳- مقایسه میانگین های پارامترهای کروموزومی در چهار اکوتیپ گل لاله واژگون (*F.imperialis*)

اکوتیپ	محل جمع آوری	TL (µ)	L (µ)	AR
E1	شهرکرد ،چلگرد	۱۵/۱۲^{c}	۱۱/۵۶^{b}	۴/۱۷^{b}
E2	شهرکرد، چال روغنی	۱۵/۹۹^{bc}	۱۲/۴۲^{ab}	۴/۷۲^{a}
E3	شهرکرد، تنگه بستان	۱۷/۶۴^{ab}	۱۳/۷۲^{a}	۴/۷۴^{a}
E4	شهرکرد فخرآباد	۱۸/۱۴^{a}	۱۳/۹۹^{a}	۴/۵۴^{ab}

درهرستون، میانگین هایی که دارای حروف لاتین مشابه هستند تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با هم ندارند.



شکل ۱- ایدیوگرام کروموزوم های سلول های سماتیکی اکوتیپ های **لاله** واژگون (*F.imperialis*)

فهرست منابع

Ambrozova, K., T. Mandakova, P. Bures, P. Neumann, I. J. Leitch, A. Koblızkova, J. Macas,. and M. A. Lysak. 2011. Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria lilies*. Annals of Botany, 107: 255-268.

Bakhshi Khaniki, G. 2002. Chromosome number of all Iranian species of *Fritillaria caucasica* group (Liliaceae). Nucleus, 45: 103-108.

Cao, X. W., S. B.Chen, J. Li, P. G. Xiao, and S. L. Chen. 2008. Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria delavayi Franch.*(Liliaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 36**:** 665-668.

De Hertogh, A. and M.Le Nard. 1993. The Physiology of Flower Bulbs. Amsterdam: Elsevier, The Netherlands.

Leitch, I. J., , J. M.Beaulieu, K.Cheung, L.Hanson, , M. A. Lysak and M. F. Fay. 2007. Punctuated genome size evolution in Liliaceae. Journal of EvolutionaryBiology, 20: 2296-2308.

Levan, A., K.Fredga, A.Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosome.Hereditas, (52): 201-220.

Mozafarian, V., 1388. Encyclopedia of Iran's plant. Publication of Farhang M**o**aser.

Nadeem Akhtar, M. A., M.Ur-Rahman, B. Iqbal Choudhary, I.Sener, Erdogan and Y.Tsuda. 2003. New class of steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis*. Phytochemistry, 63: 115-122.

Rix, E. M., 2001. *Fritillaria*. A revised classification. The *Fritillaria* Group of the Alpine Garden Society, UK.

Rønsted, N., S.Law, H.Thornton, M. F. Fay and M. W. Chase. 2005. Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae*;* Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 35: 509-527.

Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edwards Arnold (Publisher) Ltd., London. UK. 216 pp.

Wang, S., W.Gao, H.Chen and P.Xiao. 2005. New starches from *Fritillaria* species medicinal plants. Carbohydrate Polymers, 61: 111-114.

Cytogenetic Study some *Fritillaria* Flower (*Fritillaria imperialis*) Ecotypes in Chahar Mahal Va Bakhtiari Province

Hadi jafari[1], Alireza Babaei[2 *] and Ghasem Karimzadeh [3] marzeye.ahmadirooshan[4]

1- Depat. of Horticulture science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran 2- Dept. of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 3- Depat.of Plant Breeding and Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.4- Depat.of Plant Breeding and Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Alireza Babaei(a.babaei@hotmail.com)

Abstract

In this study, chromosomal and karyotypic parameters were examined in four Iranian ecotypes of *Fritillaria* flower (*Fritillaria imperialis*). For preparing metaphase spread cells, 0.05% (w/v) colchicine as a pretreatment and aceto-orcein as a stain were used. Results showed that all ecotypes were diploid ($2n = 2x = 24$), having 3 chromosome types of "m", "sm " and " st ". Parameters of the total chromosome length (TL), long arm (L), short arm (S), arm ratio (AR) and centromeric index (CI) were calculated. The chromosome length varied from 15.12 µm to 18.14 µm. ANOVA showed significant differences for chromosomal parameters, that this indicates chromosomal variation among the studied *Fritillaria* flower ecotypes.