مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره۳، پاییز ۱۳۹۰، ۲۵۶-۲۴۵

بررسی تنوع درون گونه ای گیاه *Artemisia incana* (L.) Druce در استان آذربایجان شرقی

عبدالکریم چهرگانی‌راد[1*]، مرتضی عطری[1]، سمیه یوسفی[2]

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، کد پستی ۶۵۱۷۸۳۸۶۸۳
۲- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a.chehregani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۰

چکیده

هدف: با توجه به اهمیت جنس *Artemisia* از جنبه اقتصادی، دارویی، خوراکی و زینتی، این بررسی به منظور تعیین و تشخیص تنوع درون گونه‌ای در جمعیت های گونه *Artemisia incana* در استان آذربایجان شرقی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: برای بررسی تنوع درون گونه‌ای گونه *A. incana* در استان آذربایجان شرقی از روش تعیین زیستگاه ویژه (D.S.S.) استفاده شد. بر اساس این روش، از بین زیستگاه‌های مورد بررسی، شش زیستگاه ویژه برای این گیاه تعیین و داده‌های فلوریستیک-اکولوژیک به همراه بذر جمعیت‌های این گونه از هر زیستگاه جمع آوری گردید. پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استخراج و با روش الکتروفورز مطالعه شد.

نتایج: در بررسی زیستگاه‌های ویژه، ۵۴ گونه گیاهی برای *A. incana* به‌عنوان گونه‌های همباش شناسایی شدند. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های فلوریستیک منجر به تشخیص ۴ گروه متمایز شد که نشان دهنده وجود تنوع درون گونه‌ای در این گیاه است. آنالیز داده‌های اکولوژیک نیز ۴ گروه فوق را تایید نمود. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره بذر در همه جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت و ۳ گروه پروتئینی کاملا بارز برای جمعیت‌های مورد بررسی به دست آمد.

نتیجه گیری: در بررسی الگوی الکتروفورزی، وجود تفاوت در تعداد و نوع باندهای پروتئینی در جمعیت‌های مورد بررسی نشان دهنده وجود تنوع درون گونه‌ای در گونه *A. incana* است. بنابراین در گونه مورد بررسی، گروه‌های جمعیتی معرفی شده با مارکر فلوریستیکی، توسط مارکرهای اکولوژیکی و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نیز تایید گردید که نشان می‌دهد گروه بندی فلوریستیکی می‌تواند به عنوان یک روش کم هزینه و کارآمد برای بررسی تنوع زیستی به کار رود.

واژگان کلیدی: الکتروفورز، درمنه، تنوع درون گونه‌ای، زیستگاه ویژه

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جنس درمنه *Artemisia* (از خانواده Asteraceae) یکی از بزرگترین و پر پراکنش‌ترین جنس‌های قبیله Anthemideae است که بیش از ۴۰۰ گونه را شامل می‌شود (۱). این جنس در ایران ۳۴ گونه گیاه علفی یکساله و چندساله دارد که در سراسر ایران پراکنده هستند (۲). بسیاری از گونه‌های این جنس ارزش اقتصادی (استفاده داروئی، خوراکی و زینتی) (۳، ۴)، برخی ارزش علوفه‌ای، تعدادی از آن‌ها نیز دارای اثرات آلرژی‌زایی و برخی علف هرز مزارع محسوب می‌شوند (۵) و البته تعدادی نیز سمی هستند (۶).

بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران نشان می‌دهد گونه-هایی که می‌توانند در زیستگاه‌های مختلف با شرایط اکولوژیک و فلوریستیک متفاوت حضور داشته باشند، دارای دامنه انتشار وسیعی هستند. بنابراین حضور این گونه‌ها در چنین شرایطی نشان‌دهنده ی خوپذیری یا تطابق بالای این گیاهان نسبت به شرایط متفاوت اکولوژیک است (۷). با توجه به اینکه هر زیستگاهی دارای ترکیبی از عوامل بوم شناختی ویژه خود است، بر اثر عوامل اکولوژیک خاص حاکم بر آن، ترکیب گونه‌ای ویژه‌ای را می‌پذیرد. بنابراین، نقش و اهمیت عوامل اکولوژیک روی ترکیب رستنی‌ها و روابط دو جانبه آن‌ها، در یک زیستگاه مشخص می‌شود. پس تنوع و تغییر عوامل اکولوژیک و تاثیر پدیده‌هایی چون بر هم کنش و جایگزینی عوامل اکولوژیک، باعث به وجود آمدن شرایط اکولوژیک مختلف و در نتیجه ایجاد زیستگاه‌های متفاوت در یک منطقه می‌شود (۸). بنابراین، مطالعه معیارهای اکولوژیک در ایجاد تنوع در زیستگاه‌های متفاوت یک منطقه امری ضروری است. توانایی بالای گیاهان جنس درمنه برای بقا در شرایط متفاوت اکولوژیک سبب شده است که این گیاهان بتوانند در زیستگاه‌های مختلف با شرایط متفاوت اکولوژیکی حضور داشته باشند (۹). بر همین اساس، سعی شد تا در بررسی تنوع درون گونه‌ای در گونه *A. incana* از روشی استفاده شود که هر دو معیار فلوریستیک و اکولوژیک را در مرحله جمع‌آوری داده‌ها مدنظر قرار دهد. در این راستا از روش تعیین زیستگاه ویژه .D.S.S (Determination of Special Station) (۱۰) برای جمع‌آوری داده‌ها استفاده شد که این روش الهام گرفته از جامعه شناسی گیاهی است.

یکی ازگسترده‌ترین روش ها برای توصیف بیوشیمیایی جمعیت‌های گیاهی، الکتروفورز پروتئین است (۱۱). Crawford (۱۲) از الکتروفورز پروتئین بذر به عنوان روشی مطمئن یاد کرد که به وسیله آن می‌توان روابط گونه‌ها را تعیین کرد. Boulter و همکاران (۱۳) کاربرد الگوی باندهای پروتئینی را در سیستماتیک گیاهی مورد بررسی قرار دادند. Mohamed (۱۴)، از این پروتئین‌ها به‌عنوان یک منبع معتبر برای نشان دادن خویشاوندی‌های سیستماتیک در سطح گونه، در جنس *Artemisia* استفاده کرده است. در بررسی حاضر به منظور تایید صحت و دقت نتایج حاصل از آنالیز داده‌های فلوریستیک-اکولوژیک و تعیین نوع و سطح تنوع درون‌گونه‌ای، از بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به روش الکتروفورز استفاده و نتایج این بررسی با گروه بندی‌های مبتنی بر مارکر فلوریستیک مقایسه گردیده است.

هدف از این مطالعه، تشخیص وجود یا عدم وجود تنوع درون گونه‌ای در افراد گونه *A. incana* در زیستگاه های مختلف و تحت شرایط اکولوژیک متفاوت در استان آذربایجان شرقی است.

مواد و روش‌ها

در بررسی تنوع درون‌گونه‌ای، گونه *A. incana* در استان آذربایجان شرقی از روش .D.S.S (۱۰) استفاده شد. بر اساس این روش جمع آوری داده‌های فلوریستیک-اکولوژیک به ترتیب مراحل زیر انجام می‌گیرد:

۱- انتخاب گونه چند زیستگاهه (ubiquiste): در این مرحله باید گونه‌ای را انتخاب نمود که افراد آن در زیستگاه‌های مختلف و تحت شرایط اکولوژیک متفاوت حضور دارد. بنابراین گونه *A. incana* انتخاب شد.

۲- تعیین محل‌های پراکنش (Localities) گونه مورد بررسی: در این مرحله با مراجعه به فلورها، منابع و متخصصین، محل‌های پراکنش و رویش گونه مورد بررسی در منطقه مورد مطالعه تعیین شد.

۳- تعیین زیستگاه‌های عمومی گونه مورد بررسی: در این مرحله با مراجعه به هر یک از محل‌های پراکنش تعیین شده، زیستگاه یا زیستگاه‌های عمومی گونه مورد بررسی مشخص شد.

۴- تعیین زیستگاه ویژه: در هر یک از زیستگاه‌های عمومی با محور قرار دادن فرد گونه مورد بررسی (در مرکز قرار دادن آن) و با استفاده از روش سطح حداقل مبتنی بر روش سطح-گونه یا روش Cain (۱۵)، زیستگاه ویژه فرد یا افراد گونه مورد بررسی

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین شد. لازم به ذکر است در روش .D.S.S، زیستگاه ویژه عبارت است از سطحی از پوشش گیاهی که بر اساس حضور فرد گونه مورد بررسی و سطح حداقل تعیین می شود و از نظر فلوریستیک - اکولوژیک یکنواخت است.

۵- جمع‌آوری داده‌های فلوریستیک- اکولوژیک از زیستگاه‌های ویژه: در این مرحله کلیه گونه‌های همباش با فرد گونه مورد بررسی هریک از زیستگاه‌های ویژه جمع‌آوری و کدگذاری شد. در این راستا علاوه بر ذکر گونه مورد بررسی و گونه‌های همباش در فرم مخصوص، به همراه داده‌های اکولوژیک مورد نظر (از جمله ارتفاع، درصد شیب، جهت شیب، نوع بستر و موقعیت جغرافیایی) نمونه‌ای از خاک هر زیستگاه ویژه نیز جمع آوری شد.

۶- شناسایی نمونه‌های گیاهی و آنالیز خاک: در این مرحله با مراجعه به فلورها و متخصصین گیاه‌شناسی کلیه گونه‌های گیاهی همباش با گونه مورد بررسی مورد شناسایی قرار گرفت و نمونه‌های خاک به آزمایشگاه خاک شناسی منتقل و از نظر نوع بافت، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، هدایت الکتریکی، کربن آلی و اسیدیته بررسی گردید.

۷- کدگذاری و آنالیز داده‌های فلوریستیک- اکولوژیک: دراین مرحله گونه مورد بررسی و گونه‌های همباش کدگذاری شد و آنالیز داده‌ها بر اساس ترکیب گونه‌ای (به عنوان مارکر فلوریستیک) هر یک از زیستگاه‌های ویژه با استفاده از نرم افزارهای مناسب انجام شد. در این بررسی آنالیز داده‌های فلوریستیک با نرم افزار Anaphyto (ver. 95) به روش‌های Factorial Correspondence Analysis (FCA) و Hierarchic Ascendant Classification (HAC) انجام شد. همچنین عوامل اکولوژیک مورد بررسی زیستگاه‌های ویژه با نرم-افزار MVSP (ver. 3.1) به‌روش Principal Components Analysis (PCA) و ضریب فاصله اقلیدسی آنالیز شد.

۸- گروه بندی زیستگاه‌های ویژه بر اساس مارکر فلوریستیک: بررسی و مقایسه نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها به روش FCA روی محورهای مختصات چندگانه و روش HAC منجر به تعیین گروه‌های حاصل از آنالیز بر اساس مارکر فلوریستیک شد. وجود گروه‌بندی حاصل از این آنالیز، مبین وجود تنوع درون گونه‌ای در گونه مورد بررسی خواهد بود.

۹- تعیین گونه یا گونه‌های تشخیصی (Distinguished): در این مرحله با تهیه جدول مربوط به زیستگاه‌های ویژه مورد بررسی و گونه‌های حاضر در هر یک از آن‌ها، حداقل سه گونه که تنها در یک زیستگاه یا یک گروه از زیستگاه‌های معین حضور داشتند به عنوان گونه‌های تشخیصی هر یک از آن‌ها معرفی شدند.

پس از تعیین و اثبات وجود تنوع درون گونه‌ای، به تعیین و تشخیص سطح و نوع تنوع درون گونه‌ای پرداخته شد. بدین منظور از روش‌های مورفومتری، فیتوشیمی، سیتولوژی، الکتروفورز و غیره استفاده شد تا نوع و سطح تنوع درون گونه‌ای مورد نظر تعیین شود. در این بررسی برای تعیین سطح و نوع تنوع درون گونه‌ای *A. incana* از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر روی ژل پلی اکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد (۱۶). برای استخراج پروتئین از بذرها، یک گرم از بذر گیاهان جمعیت هر زیستگاه ویژه، خوب خرد گردید تا پودر یکنواختی به دست آید. پودر بذر به دست آمده از گیاهان هر جمعیت به صورت جداگانه با نسبت یک به شش با بافر فسفات سدیم (pH= ۷) مخلوط گردید. به منظور جلوگیری از فعالیت آنزیم فنل اکسیداز و اثرات سو آن در سنجش پروتئین و در نتیجه پایدار کردن پروتئین‌ها، مقدار ۰/۰۲ گرم پلی وینیل پیرولیدن (PVP) اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد تا انحلال و آزاد سازی پروتئین‌ها صورت گیرد. مخلوط‌های فوق در سانتریفوژ یخچال‌دار به مدت ۲۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. با پایان یافتن عمل سانتریفوژ، محلول شفاف رویی جدا و در ویال‌های کوچک استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید تا در الکتروفورز مورد استفاده قرار گیرند. عصاره پروتئینی استخراج شده به نسبت مساوی یک به یک با بافر نمونه مخلوط گردید. مخلوط حاصله در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۳ دقیقه حرارت داده شد. ژل اکریل آمید ۱۲ درصد تهیه شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها و در یکی از چاهک‌ها مارکر پروتئینی تزریق گردید. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز شرکت Bio-Rad (USA) استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با مخلوط اسید استیک و اتانول تثبیت گردید. سپس ژل با آب مقطر شسته، به محلول رنگ منتقل شده و رنگ آمیزی با رنگ کوماسی بلو بریلیانت R_{250} انجام گرفت. سپس موقعیت هر باند روی ژل به‌صورت کدهای یک و صفر که نشان‌دهنده وجود و عدم وجود باند مربوطه است، مشخص گردید. کدهای به‌دست‌آمده با نرم افزار NTSYS (ver. 2.02)،

Archive of SID
www.SID.ir

روش Complete Lonkage و ضریب RT و همچنین نرم-افزار MVSP (ver. 3.1) به روش Principal Coordinates Analysis (PCO) و ضریب فاصله اقلیدسی مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج

نتایج بررسی‌های فلوریستیک:

با مراجعه به زیستگاه‌های عمومی گونه *A. incana* در استان آذربایجان شرقی ۶ زیستگاه ویژه برای این گونه تعیین شد (جدول ۱) و در مجموع تعداد ۵۴ گونه گیاهی به عنوان گونه-های همباش از زیستگاه‌های ویژه جمع‌آوری و شناسایی گردید. فهرست ترکیب گونه‌ای هریک از این زیستگاه‌ها به شرح زیر است:

- فهرست فلوریستیک زیستگاه ویژه شماره ۲۸:

Artemisia incana, Rhamnus pallasii, Ephedra procera, Stachys schtschegleevii, Teucrium polium, Helichrysum armenium, Atraphaxis spinosa, Salvia limbata, Artemisia scoparia, Artemisia fragrans, Atriplex nitens, Marrubium crassidens, Kochia prostrata, Zygophyllum atriplicoides, Jurinea leptoloba.

- فهرست فلوریستیک زیستگاه ویژه شماره ۲۹:

Artemisia incana, Chondrilla juncea, Parietaria judaica, Nepeta filaseum, Atraphaxis spinosa, Artemisia fragrans, Rhamnus pallasii, Capparis spinosa, Galium verum, Stachys schtschegleevii, Dianthus orientalis, Tanacetum parthenium, Zygophyllom atriplicoides, Sclerochloa sp.

- فهرست فلوریستیک زیستگاه ویژه شماره ۳۰:

Artemisia incana, Prangos uloptera, Artemisia fragrans, Centaurea virgata, Noaea mucronata, Rhamnus pallasii, Melica persica, Teucrium polium, Chondrilla juncea, Ephedra procera, Euphorbia marschalliana, Bromus tectorum, Jurinea leptoloba, Satureja sahendica, Scrophularia sp.

- فهرست فلوریستیک زیستگاه ویژه شماره ۳۱:

Artemisia incana, Atraphaxis spinosa, Artemisia fragrans, Teucrium polium, Thymus pubescens, Kochia prostrata, Phlomis lanceolata, Noaea mucronata, Tanacetum chiliophyllum, Helichrysum armenium, Rubia tenuifolia, Scutellaria pinnatifida

- فهرست فلوریستیک زیستگاه ویژه شماره ۳۲:

Artemisia incana, Centaurea virgata, Salvia limbata, Cynodon dactylon, Euphorbia szovitsii, Thymus pubescens, Achilea tenuifolia, Astragalus chrysostachys, Satureja atropatana, Sophora alopecuroides, Salsola kali, Cerasus incana, Reaumuria alternifolia, Caccinia macranthera, Stachys inflata, Helichrysum armenium, Rhamnus pallasii, Artemisia fragrans, Ferula rigidula, Rubia tenuifolia, Galium humifusum, Echinophora orientalis, Scabiosa crinita, Scabiosa argentea.

- فهرست فلوریستیک زیستگاه ویژه شماره ۳۳:

Artemisia incana, Rhamnus pallasii, Astragalus chrysostachys, Artemisia fragrans, Centaurea virgata, Stachys inflata, Satureja atropatana, Pyrus sp, Reaumuria alternifolia, Cerasus incana, Rubia tenuifolia, Berberis integerrima, Achilea tenuifolia, Amygdalus sp.

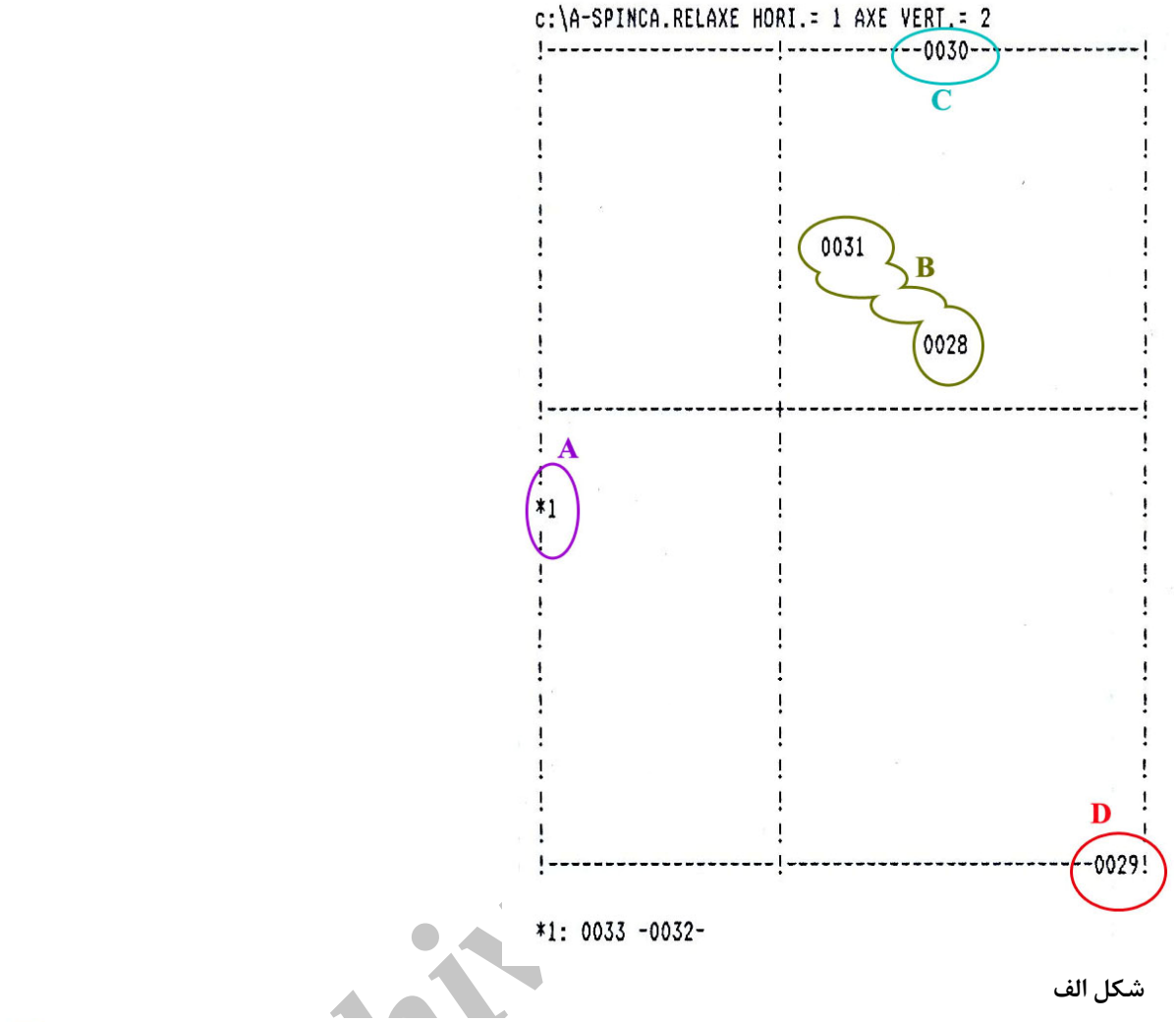
آنالیز زیستگاه‌های ویژه با استفاده از نرم‌افزار Anaphyto به دو روش FCA و HAC بر اساس ترکیب رستنی‌ها (به عنوان مارکر فلوریستیک)، منجر به گروه‌بندی زیستگاه‌ها در ۴ گروه متمایز شد (شکل ۱) که عبارتند از: گروه A شامل زیستگاه های ویژه ۳۲ و ۳۳، گروه B شامل زیستگاه‌های ویژه ۲۸ و ۳۱، گروه C شامل زیستگاه ویژه ۳۰ و گروه D شامل زیستگاه ویژه ۲۹. این گروه بندی بیانگر وجود تنوع درون گونه‌ای در گونه *A. incana* در مناطق مورد بررسی است.

جدول ۱: محل‌های جمع‌آوری گیاه A. incana

کد زیستگاه ویژه	تاریخ جمع‌آوری	محل جمع‌آوری	شماره هرباریومی
۲۸	۸۷/۵/۲۶	آذربایجان شرقی: جلفا به کلیسا، ۸ کیلومتری کلیسای سنت استپانوس	۱۷۸۲۷
۲۹	۸۷/۵/۲۶	آذربایجان شرقی: جلفا به کلیسا، ۴ کیلومتری کلیسا، روبروی رود ارس	۱۷۸۲۸
۳۰	۸۷/۵/۲۷	آذربایجان شرقی: تبریز به اسکله دریاچه ارومیه، ۲۵ کیلومتری اسکله، سمت چپ جاده	۱۷۸۲۹
۳۱	۸۷/۵/۲۷	آذربایجان شرقی: اردوگاه سیاحتی جهاد کشاورزی آذربایجان شرقی	۱۷۸۳۰
۳۲	۸۷/۵/۲۸	آذربایجان شرقی: تبریز، جاده ونیار به نهند، ۸ کیلومتری روستای نهند، سمت چپ جاده	۱۷۸۳۱
۳۳	۸۷/۵/۲۷	آذربایجان شرقی: تبریز، جاده ونیار به نهند، ۵ کیلومتری سه راهی، سمت چپ جاده	۱۷۸۳۲

Archive of SID

www.SID.ir



شکل الف

شکل ب

شکل ۱: نتایج حاصل از آنالیز ۶ زیستگاه ویژه A. incana بر اساس ترکیب رستنی‌ها به روش FCA (شکل الف) و HAC (شکل ب) و گروه بندی زیستگاه‌های ویژه.

نتایج بررسی‌های اکولوژیک:

با توجه به این که تنوع شرایط اکولوژیکی در یک منطقه منجر به ایجاد زیستگاه‌های متفاوت در آن منطقه می‌گردد، به بررسی عوامل اکولوژی حاکم بر هر زیستگاه ویژه پرداخته شد. عوامل اکولوژیک مورد بررسی زیستگاه‌های ویژه و برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک زیستگاه‌های ویژه این گونه به ترتیب در جدول ۲ و ۳ ارائه شده است.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل عوامل اکولوژیک با نرم‌افزار MVSP به روش PCA (شکل ۲)، زیستگاه‌های ویژه این گیاه را در ۴ گروه متمایز قرار داد که عبارتند از: گروه A شامل زیستگاه‌های ویژه ۳۲ و ۳۳، گروه B شامل زیستگاه‌های ویژه ۲۸ و ۳۱، گروه C شامل زیستگاه ویژه ۳۰ و گروه D شامل زیستگاه ویژه ۲۹.

www.SID.ir

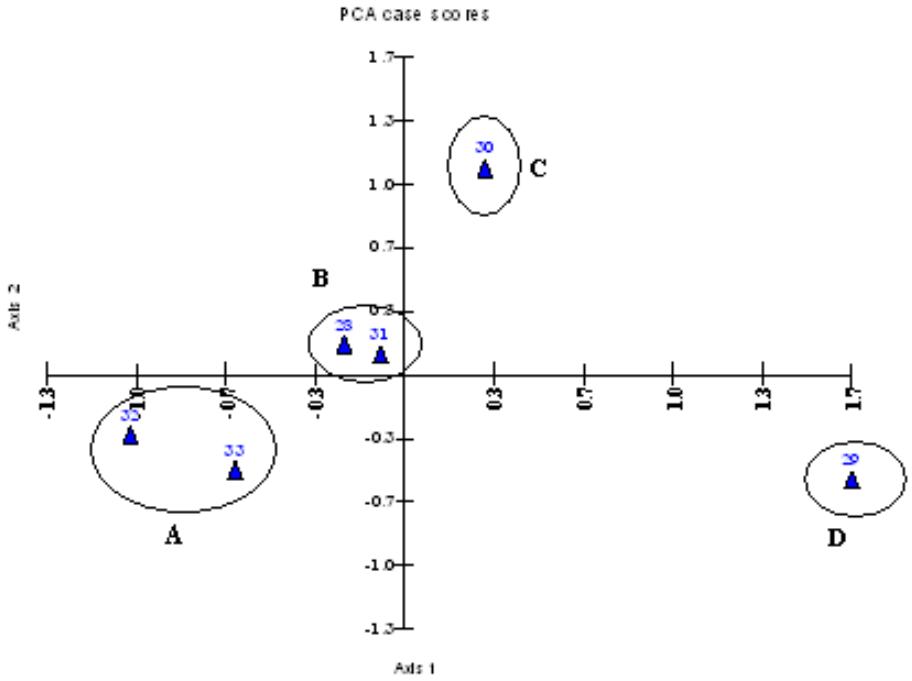
جدول ۲: عوامل اکولوژیک مورد بررسی زیستگاه های ویژه *A. incana*

ردیف	کد زیستگاه ویژه	ارتفاع(متر)	درصد شیب	جهت شیب	نوع بستر
۱	۲۸	۱۴۱۴	۵۰	جنوبی	صخره
۲	۲۹	۸۱۹	۹۰	شمال شرقی	صخره
۳	۳۰	۱۳۵۴	۳۰-۴۰	جنوب شرقی	سنگی- صخره ای
۴	۳۱	۱۴۴۳	۱۵-۲۰	شرقی	سنگلاخ
۵	۳۲	۱۵۱۹	۱۰-۱۵	جنوب‌غربی	صخره
۶	۳۳	۱۵۴۴	۷۰	شرقی	سنگی

جدول ۳: داده‌های اکولوژیک خاک شناسی مورد بررسی در زیستگاه‌های ویژه *A. incana*

ردیف	کد زیستگاه ویژه	pH	EC	OC%	بافت خاک			
					Si%	S%	Cl%	بافت خاک
۱	۲۸	۷/۳۵	۰/۳۹	۰/۸۶	۳۴	۶۴	۲	S.L
۲	۲۹	۸/۲۲	۰/۰۱	۳/۱	۲۲	۷۶	۲	L.S
۳	۳۰	۷/۴۸	۴/۳	۲/۹	۲۸	۷۰	۲	S.L
۴	۳۱	۷/۳۱	۰/۴۱	۰/۷۸	۲۶	۷۲	۲	L.S
۵	۳۲	۷/۶۱	۰/۲۱	۰/۰۲	۱۰	۸۸	۲	S
۶	۳۳	۷/۶۹	۰/۲۵	۰/۲۵	۱۲	۸۶	۲	L.S

pH، اسیدیته خاک؛ EC، هدایت الکتریکی خاک؛ OC% ، درصد کربن آلی خاک؛ Si%، درصد سیلیس؛ S%، درصد شن؛ Cl%، درصد رس؛ S.L، ماسه ای- رسی؛ L.S، رسی – ماسه ای؛ S، ماسه ای



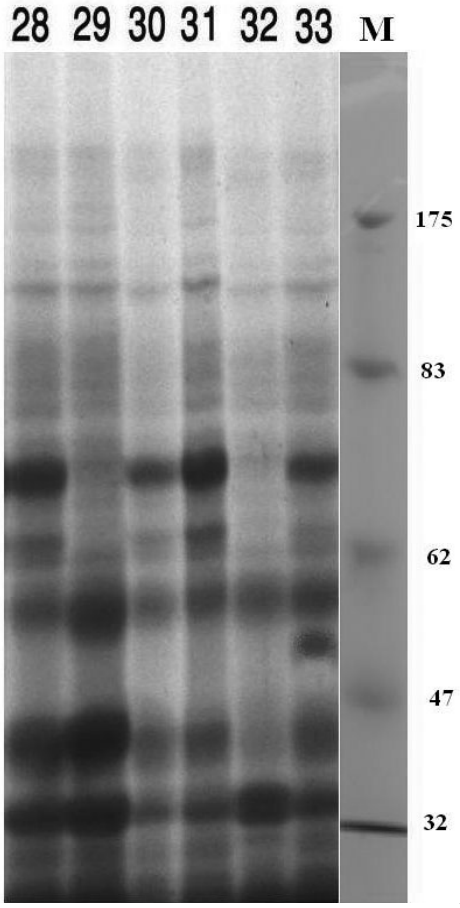
شکل ۲: گروه بندی زیستگاه‌های ویژه *A. incana* بر اساس عوامل اکولوژیک به روش PCA

www.SID.ir

نتایج بررسی‌های الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره بذر:

با توجه به نتایج ارائه شده در شکل ۳ و جدول ۴، به‌طورکلی ۱۲ ردیف باند پروتئینی در این گونه مشاهده شد. باندهای ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ در همه جمعیت‌های مورد بررسی این گونه مشترک می‌باشند که به عنوان باند های اختصاصی این گونه در نظر گرفته می‌شوند و نشان‌دهنده پروتئین‌های مشابه در این گونه هستند. باندهای ۱، ۲ و ۶ در بین جمعیت‌ها تنوع را نشان داد و باند شماره ۹ فقط در جمعیت با کد ۳۳ مشاهده شد.

در دندروگرام حاصل از نرم‌افزار NTSYS به روش Complete Linkage (شکل ۴)، که بر اساس داده‌های الکتروفورزی حاصل شده است زیستگاه‌های ویژه این گیاه در ۳ گروه قرار می‌گیرند که عبارتند از: گروه A و C شامل زیستگاه‌های ویژه ۳۰، ۳۲ و ۳۳، گروه B شامل زیستگاه‌های ویژه ۲۸ و ۳۱ و گروه D شامل زیستگاه ویژه ۲۹. همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌های الکتروفورزی این گیاه با نرم‌افزار MVSP به روش PCO (شکل ۵)، نیز این گروه بندی را تایید می‌کند.



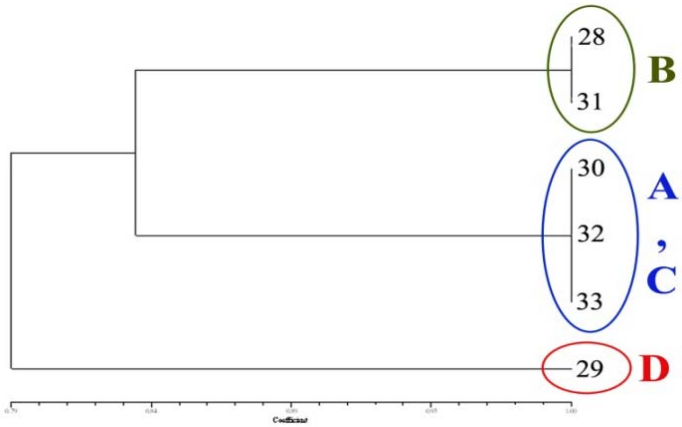
شکل ۳: الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بذر در جمعیت‌های مورد بررسی A. incana. جمعیت‌های مورد مطالعه با کد و شماره مشخص شده‌اند؛ M، مارکرهای وزن ملکولی.

جدول ۴: الکتروفورگرام SDS-PAGE در جمعیت‌های مورد بررسی گیاه A. incana

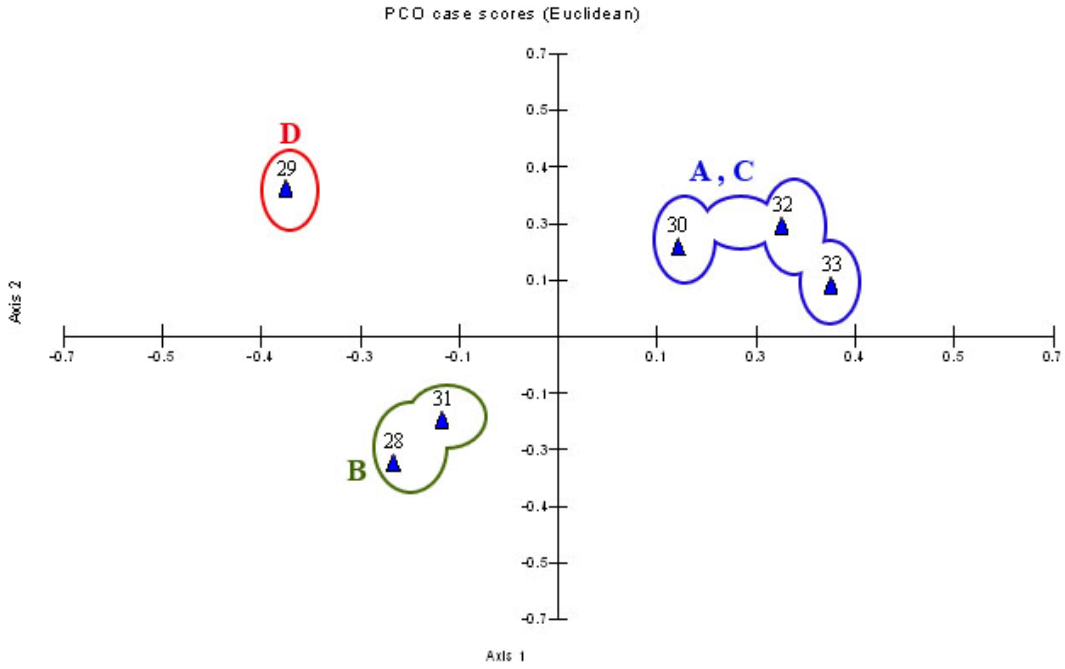
کد زیستگاه / ویژه شماره باند	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲	۱	۱	۰	۱	۰	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۶	۱	۰	۱	۱	۰	۱
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۹	۰	۰	۰	۰	۰	۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی جمعیت‌های گیاه *A. incana* در مناطق مورد بررسی با نرم افزار NTSYS به روش Complete Linkage.



شکل ۵: نتایج آنالیز داده‌های الکتروفورز زیستگاه‌های ویژه گیاه *A. incana* در مناطق مورد بررسی به روش PCO.

بحث

کلیه موجودات زنده در محیط زیست خود تحت تاثیر همزمان عوامل مختلفی قرار می‌گیرند و هیچ موجودی بدون وابستگی به محیط اطراف خود و به شکل مجزا زندگی نمی‌کند. محیط‌های طبیعی که محیط زیست گیاه و اجتماعات گیاهی را به وجود می‌آورند، انواع گوناگونی از عوامل اکولوژیک متنوع را به نمایش می‌گذارند. بنابراین شرایط محیطی زیستگاه، منعکس کننده‌ی ویژگی‌های یک فرد است، زیرا این ویژگی‌ها به شرایط محیطی وابسته‌اند (۱۶). چون ترکیب رستنی‌ها در همبستگی تنگاتنگ با ترکیب عوامل اکولوژیک (نوع محیط زیست) است، بنابراین بهترین معیار برای تشخیص عوامل اکولوژیک، محیط زیست مربوطه است (۱۷). عوامل اکولوژیک اثر مهمی روی ترکیب رستنی‌ها و ریختارهای گیاهی در یک منطقه دارند. هر گونه تغییر در عوامل اکولوژیک می‌تواند به تغییراتی در ترکیب رستنی‌ها یا حتی ریختار گیاهی منجر گردد. بنابراین تنوع زیستی، نتیجه پاسخ افراد یک اکوسیستم به شرایط مختلف محیطی است و آن می‌تواند به شکل‌های ژنوتیپ، فنوتیپ یا کموتیپ و حتی زیرگونه تجلی یابد و یا به گونه زایی منجر شود (۷).

www.SID.ir

طبق نتایج به دست آمده، گروه بندی زیستگاه‌های ویژه *A. incana* بر اساس عوامل اکولوژیک به‌روش PCA (شکل ۲)، با گروه بندی زیستگاه‌های ویژه این گیاه بر اساس ترکیب رستنی‌ها به روش FCA و HAC (شکل۱)، کاملا منطبق است. نتایج متعدد مشابهی توسط برخی از پژوهشگران پیشین که تنوع درون گونه‌ای در *Astragalus verus* را از نظر ترکیب شیمیایی مطالعه کرده‌اند، و با روش مطالعاتی D.S.S. مقایسه نموده‌اند، به دست آمده است که با نتایج پژوهش حاضر همسویی دارد (۸و۱۸).

در نهایت بررسی و آنالیز الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره ی بذر نیز منجر به تعیین گروه‌هایی گردید که این گروه‌بندی مبین وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف این گونه است و تا حدودی با گروه‌بندی‌های مبتنی بر مارکر فلوریستیک و اکولوژیک مطابقت و هم‌خوانی دارد. بنابراین بر اساس این نتایج، همه گروه‌های به دست آمده از آنالیز داده‌های الکتروفورز در استان آذربایجان شرقی با گروه‌های حاصل از آنالیز داده‌های فلوریستیک و اکولوژیک مطابقت کامل دارد و آن را تایید می‌کند و تنها ۳ زیستگاه ویژه ۳۰، ۳۲ و ۳۳ که بر اساس آنالیز داده های فلوریستیک و اکولوژیک در دو گروه مستقل (C و A) قرار گرفتند، بر اساس آنالیز داده‌های الکتروفورز در یک گروه، گروه بندی شد.

به طور کلی می توان گفت که در هر گروه زیستگاه های مشابهی جای دارند که ترکیب گونه‌ای و شرایط اکولوژیک آن‌ها به هم نزدیکتر است. در بررسی الگوهای الکتروفورزی، افراد داخل هر گروه، الگوی پروتئینی تقریبا مشابهی داشتند ولی الگوی باندهای پروتئینی مربوط به گروه‌های مختلف فلوریستیک-اکولوژیک به طور کلی از یکدیگر متفاوت بودند. به طوری که چهار گروه مذکور، سه اثر پروتئینی بارز و مشخص ارائه دادند.

در پژوهش حاضر، استفاده از مطالعات الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره بذر در بررسی تنوع درون‌گونه‌ای (بین جمعیتی) *A.incana* نشان داد که این روش می‌تواند ابزاری قدرتمند و مفید برای تفکیک و جدایی تاکسون‌ها در سطوح پایین‌تر از گونه باشد. در نتیجه تنوع بالا در پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در جمعیت‌های مختلف گونه گیاهی مورد بررسی، می‌تواند در جدایی جمعیت‌های یک گونه ارزش داشته باشد و بنابراین ذخیره‌گاهی برای تنوع‌یابی و در نتیجه گونه‌زایی محسوب گردد. در پژوهش‌های متعددی (۱۹، ۲۰و ۲۱) از پروتئین‌های ذخیره بذر در بررسی تنوع درون و بین گونه‌ای، جهت مطالعات سیستماتیک و کمک به رده‌بندی‌های جدید استفاده شده است و نشان داده شده که مطالعه الگوی باندهای پروتئینی می‌تواند در کنار سایر روش‌ها ابزار سودمندی در تشخیص تنوع درون گونه‌ای باشد که با نتایج پژوهش حاضر همسویی دارد. ولی یافته‌های ما در تضاد با برخی از گزارشات پیشین است (۲۰و ۲۱).

وجود تنوع در گونه‌های جنس درمنه، با گزارش‌های متعدد نشان داده شده است. جمیت‌های این جنس در مناطق غربی و مرکزی آسیا بیشترین تنوع را دارا می‌باشند (۲۲). مطالعات کروموزومی نیز نشان داده که در جمعیت‌های گونه *A.incana* در مناطق آذربایجان عدد کروموزومی *2n=2x=16* گزارش شده است (۲۳)، در حالیکه جمیت‌های جمع آوری شده از استان زنجان عدد کروموزومی *2n=2x=18* را نشان دادند (۲۴). همچنین در جمعیت‌های جمع آوری شده از برخی مناطق ایران و ارمنستان عدد کروموزومی *2n=2x=32-36* نیز گزارش شده است (۲۵). گزارشات فوق نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی (کروموزومی) بالا در بین جمعیت‌های این گونه است که با نتایج پژوهش حاضر همسویی دارد.

بر اساس نتایج این پژوهش، هر سه مارکر مورد استفاده (فلوریستیک، اکولوژیک و الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره بذر) توانستند تنوع بالایی را در جمعیت‌ها نشان دهند. به بیان دقیق‌تر گروه‌های جمعیتی معرفی شده با مارکر فلوریستیکی توسط مارکرهای اکولوژیکی و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نیز تا حدود زیادی تایید گردید. این تایید به معنای آن است که گروه‌بندی فلوریستیکی در مواردی به تنهایی می‌تواند به عنوان یک روش کم هزینه و کارآمد برای بررسی وجود تنوع جمعیت‌ها (تنوع درون گونه‌ای) به کار رود. بنابراین درستی و میزان دقت روش D.S.S. برای تعیین وجود تنوع و نیز تشخیص نوع و سطح تنوع آشکار می‌گردد. در واقع این امر منتج از دو مرحله جمع آوری داده‌ها و نیز آنالیز آن‌ها با استفاده از مارکر فلوریستیک (ترکیب رستنی‌های زیستگاه‌های ویژه) است. اگر چه در مورد استفاده از روش D.S.S. در تشخیص تنوع درون گونه‌ای گزارش‌های معدودی در دسترس است (۸و ۱۸)، اما نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین با یافته‌های پژوهش حاضر در مورد کارایی روش D.S.S. ، به عنوان یک روش کارامد و کم هزینه همسو و در تطابق است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که عوامل اکولوژیک نقش مهمی در ترکیب رستنی‌های هر منطقه ایفا می‌کند، به گونه‌ای که در شرایط مختلف اکولوژیک، وجود ترکیب عوامل اکولوژیک متفاوت باعث حضور ترکیب گونه‌ای متفاوت می‌شود و در نتیجه جمعیت‌های مختلف یک گونه در شرایط اکولوژیک متفاوت بر اساس سرشت اکولوژیک خود دارای پاسخ‌های متفاوت ژنوتیپیک هستند. به طوری‌که افراد گونه *A. incana* در زیستگاه‌های مختلف در استان آذربایجان شرقی و تحت شرایط اکولوژیک متفاوت نشان دهنده ۳ گروه پروتئینی مختلف می باشند که از نظر باندهای پروتئینی با یکدیگر اختلاف دارند. وجود تفاوت و تنوع در باندهای پروتئینی جمعیت‌های مشخص شده گیاه *A. incana* مبین وجود تنوع درون گونه‌ای در مناطق مورد بررسی است.

همچنین نتایج حاصل از این سه نوع مارکر (مارکرهای فلوریستیکی، اکولوژیکی و الگوی پروتئینی بذر) نشان داد که هر سه نوع مارکر مذکور توانایی تعیین تنوع درون گونه‌ای را در جمعیت‌های مورد بررسی گونه *A. incana* دارا است و می‌توان با توجه به زمان، هزینه، ضرورت‌های پیش روی و امکانات موجود یکی از این سه نوع مارکر را برای نیل به هدف تحقیقی مناسب آن انتخاب کرد. از آن جایی که روش .D.S.S، با صرف وقت و هزینه‌های کمتر، دسترسی به نتایج متعدد را فراهم می‌سازد می‌تواند به عنوان روشی کارآمد برای بررسی آسان‌تر، سریع‌تر، دقیق‌تر و مطمئن‌تر تعیین تنوع درون‌گونه‌ای و در مجموع در تاکسونومی به‌کار رود.

تشکر و قدردانی

از کارشناسان ارشد اداره منابع طبیعی استان‌های آذربایجان شرقی و همدان جناب آقایان مهندس طالب‌پور و مهندس کلوندی به دلیل راهنمایی‌ها و مساعدت‌های علمی‌شان در این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Rechinger KH. *Artemisia* in Flora Iranica. Compositae. Graz, Austria: Hedge, Akademische Druck and Verlagsanatalt. 1980. Vol. 154.

2. Mozaffarian, V.A. Dictionary of Iranian Plant Names. 5th Ed. Tehran: Farhang Moaser Publication; 2007.

3. Torrell M, Garcia-Jacas N, Susanna A, Valles J. Phylogeny in *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae) inferred from nuclear, ribosomal DNA (ITS) sequences. J Taxon. 1999; 48: 721-736.

4. Wright, C.W. Artemisia. 1th Ed. London, New York: Taylor & Francis; 2002; 344.

5. Tan R.X, Zheng W.F, Tang H.Q. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. J Plant Med. 1998; 64: 295-302.

6. Burrows, G, Tyrl, R.J. Toxic Plants of North America. 1th Ed. Ames, Iowa: Iowa State University; 2001.

7. Asgari Nematian M, Atri M, Nazem H. Flavonoid components variability of *Astragalusgossypinus* as a medicinal species in the west of Iran. J Peyke Noor. 2007; 1: 50-61.

8. Atri M. A new concept of ecological factors and their division in vegetation studies.J IJB. 1999; 8: 61-73.

9. Sadeghi B.Studyof nutritional valuebased onsomechemicalcompositions inknownspeciesofgenus *Artemisia*. M.Sc. Thesis. Tehran University.Faculty ofNatural Resources. 1992.

10. Atri, M. The study ofinterspecific diversity existence by using of DSS method.1thEd National plant taxonomy Conferenceof Iran.Research Institute of Forests and Rangelands; 2007.

11.Crawford D.J. Phylogenetic and systematic inferences from electerophoresis studies. In: Isozymes in Plant genetics and breeding, Part A., Tanksley SD and Orton TJ. (eds). Amsterdam: Elsevier science; 1983; 23: 257-287.

12. Boulter D, Thurman DA, Tutner BL. The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematic. J Taxon. 1966; 15:135-142.

13. Mohamed SA. Biodiversity of *Artemisia* species in Egypt. M. Sc. Thesis, Ain Shams University: Cairo, Egypt. 2004.

14. Cain SAO, Castro GM. Manual of vegetation analysis. NewYork: Harper and Brothers. 1959.

15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4 . J Nature.1970; 227: 680-685.

16.Hussain A, Mahmood S. Response flexibility in *Trifolium alexandrinum* L. aphenomenon of adaptation to spatial and temporal disturbed habitat. J Biol Sci. 2004; 4(3): 380-385.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Guinochet M. Phytosociology. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands. 1997.

18. Asgari MM, Atri A. Chehregani Rad. Chemical variation of *Astragalus verus* Olivier (Fabaceae) according to flavonoid pattern in the West of Iran. Iranian J Plant Biol. 2010; 2: 68-80.

19.Nadernejad N, Pourseyedi S. Numerical taxonomy of some populations of Iranian cumingenus *Cuminum*, *Buniumand**Carum*based on morphological and cytological traits.J Pajouhesh & Sazandegi.2003; 16: 10-15.

20.Sheidai M, Saeidi S, Atri M. Taxonomic applications of seed proteins in the genus *Bromus* L. (Poaceae)-Iran. J Bot. 2008; 14: 126-131.

21.Vural C, Servet O, Mikail A. New combination in Veronica (Scrophulariaceae) based on morphological characters and the seed storage protein polymorphism. J JSE. 2009; 47: 168-172.

22. Volkova SA, Boyko EV. Chromosome numbers in some species of Asteraceae from the southern part of the Soviet Far East. Bot. Z. 1986; 71: 16-93.

23. Saedi K, Jalili A, Azarnivand H, Ghamari Zare A. Karyotypic studies of *Artemisia* L. species in westAzarbaijan province, Iran. Pajouhesh & Sazandegi. 2006; 67: 2-10.

24. Chehregani A, Mehanfar N. New Chromosome Counts in the Tribe Anthemideae (Asteraceae) from Iran. Cytologia. 2008; 73: 189-196.

25. Torrell M, Vallès J. Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic evolutionary, and ecological implications. NRC Research Press. 2001; 44: 231-238.

Archive of SID

www.SID.ir