دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۲۸۷-۲۷۷ (۱۳۹۴)

مقایسه تنوع ژنتیکی درختان خشکیده و سالم گونه زربین در ارتفاعات مختلف با استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

رقیه ذوالفقاری*[۱]، رقیه دریکوند[۲]، رضا نقیها[۳] و پیام فیاض[۳]

۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، دانشگاه یاسوج

پست الکترونیک: zolfaghari@yu.ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه یاسوج

۳ - استادیار، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۲

چکیده

پروتئین‌ها به‌عنوان محصول‌های مستقیم ژن، نشانگرهای مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی پایه‌های مقاوم محسوب می‌شوند. برای بررسی پروتئین ذخیره‌ای بذر گونه زربین (*Cupressus sempervirens*) براساس فعالیت کیفی با استفاده از روش SDS-PAGE، از۴۰ پایه درخت زربین که شامل درختان خشکیده و سالم در دو طبقه ارتفاعی بودند، نمونه‌برداری صورت گرفت. نتایج نشان داد که وزن مولکولی باندهای ظاهر شده بر روی الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئینی بین ۱۸ تا ۱۲۵ کیلو دالتون متفاوت بود. نتایج تجزیه خوشه‌ای و تابع تشخیص نشان داد که درختان دو منطقه ارتفاعی بر اساس باندهای پروتئینی از یکدیگر جدا شدند اما درختان با درجات مختلف خشکیدگی نتوانستند از یکدیگر جدا شوند. نتایج پارامترهای تنوع ژنتیکی مانند شاخص شانون و نئی و درصد چندشکلی نیز نشان داد که درختان با خشکیدگی ضعیف بیشترین و درختان با خشکیدگی شدید کمترین تعداد بودند. همچنین درختان ارتفاع بالا از تنوع بیشتری نسبت به درختان ارتفاع پایین برخوردار بودند. تنوع درون جمعیتی در دو طبقه ارتفاعی بیشتر از تنوع بین جمعیتی بود و تفاوت بین جمعیت‌ها معادل ۰/۴۲ بود. با توجه به نتایج تحقیق می‌توان گفت که درختان زربین واقع در منطقه مورد مطالعه به‌خصوص در طبقه ارتفاعی بالا از تنوع بالایی برخوردار هستند. همچنین بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نمی‌توان درختان سالم و خشکیده را از یکدیگر تشخیص داد.

واژه‌های کلیدی: ذخیره‌گاه جنگلی، تنگ سولک، خشکیدگی، الکتروفورز، زربین.

مقدمه

زربین یک عنصر گیاهی شاخص اقلیم مدیترانه‌ای است که به سرو مدیترانه نیز معروف است. مناطق مدیترانه‌ای اروپا و شرایط اقلیمی مشابه آن در آسیای غربی از نقاط اصلی رویشگاه طبیعی آن محسوب می‌شود (Hafezi Shahroudian, 2010). سرو زربین در ایران بیشتر در نواحی شمالی قابل مشاهده است اما در ارسباران، بهبهان، فیروزآباد، دامنه کوه تفتان، در زوآب و امامزاده عبدالله (باغملک خوزستان) نیز به‌صورت خودرو یافت می‌شود (Jazirei, 2003). این درخت دیرزی است و قدرت

Archive of SID

www.SID.ir

تحمل شرایط سخت را دارد. این گونه مقاوم و با ریشه عمیق و قوی است که آن را قادر می‌سازد تا در میان تخته‌سنگ‌ها و شیب‌های تند و پرتگاهی به‌راحتی رشد کند. در سال‌های اخیر این گونه در ذخیره‌گاه جنگلی تنگ سولک دچار خشکیدگی شده است. از آنجایی که خشکیدگی سبب فرسایش ژنتیکی و از دست رفتن بسیاری از ذخایر ژنتیکی می‌شود، تعیین تشابه و یا تنوع ژنتیکی می‌تواند کمک شایانی جهت به‌کارگیری روش‌های مدیریتی متناسب به منظور حفاظت، احیاء و توسعه آن نماید. اگرچه امروزه نشانگرهای مولکولی به‌راحتی این امر را محقق می‌نمایند، اما نشانگرهای بیوشیمیایی نیز به‌دلیل ارزانی، تاثیرپذیری کم از شرایط محیطی و وجود چندشکلی پروتئینی واضح کاربرد بالایی در ژنتیک دارند (Gilliand *et al.*, 2000). پروتئین‌ها به‌عنوان محصول‌های مستقیم ژن‌ها، نشانگرهای مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی پایه‌های مقاوم محسوب می‌شوند (Mirhoseini *et al*, 2000). در حال حاضر تجزیه و تحلیل الکترفورزی از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌طور گسترده به‌عنوان یک روش برای شناسایی و پرورش گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Thanch, 1976). با فرض اینکه پروتئین‌ها محصولات مستقیم ژنها هستند، هر یک از نوارها بیانگر تظاهر یک صفت می‌باشند. بنابراین تفاوت در الگوهای پروتئینی نمایانگر اختلافات ژنتیکی معنی‌دار در بین افراد جمعیت می‌باشد (Bulter *et al.*, 1996).

بیشتر تحقیقات مربوط به پروتئین ذخیره‌ای بذر در مورد گونه‌های زراعی و علوفه‌ای انجام گرفته است (Bau *et al.*, 2007) و در مورد گونه‌های درختی اطلاعات کمتری وجود دارد (Mirzaie-Nodoushan, 2015). با این حال Martinet و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی گونه نراد با استفاده از روش SDS- PAGE را در اسپانیا مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد. همچنین Elena- Rossello (۱۹۹۶) با بررسی تنوع ژنتیکی گونه بلوط با استفاده از ایزوآنزیم‌ها، تنوع درون جمعیتی این گونه را بیشتر از تنوع بین جمعیتی برآورد کرد. همچنین Kermani و همکاران (۲۰۰۹) جریان ژن در بین رویشگاه‌های مورد بررسی ارس و Nuvascues و همکاران (۲۰۰۷) میانگین جریان ژن گونه *Pinus canariensis* را با استفاده از نشانگرهای مولکولی در دو طبقه ارتفاعی (۱۰۶۱– ۲۱۰۶) بالا بیان کردند. همچنین Westbrook و همکاران (۲۰۱۳) جریان ژن در درختان سالم کاج را با استفاده از روش SDS- PAGE بیشتر از درختان خشکیده بیان کرد. در همین رابطه Bengeston (۲۰۱۳) تنوع ژنتیکی درختان سالم راش و Rao (۱۹۹۹) تنوع ژنتیکی درختان سالم پسته را با استفاده از روش SDS_ PAGE بیشتر از درختان خشکیده بیان کردند. با توجه به آنچه گفته شد هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی در طبقات ارتفاعی و در درختان خشکیده و سالم زربین به‌منظور مدیریت و احیاء بهتر این گونه در منطقه مورد مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ابتدا ۴۰ پایه از درختان زربین واقع در محدوده ارتفاعی این گونه (۱۲۵۶ تا ۱۶۳۰ متر از سطح دریا) انتخاب شدند که در شیب ۵ تا ۴۵ درصد قرار داشتند. نمونه‌برداری از درختان خشکیده و سالم با حداقل فاصله ۱۰۰ متر از یک دیگر در جهت جنوب شرقی صورت گرفت تا از انتخاب درختان فامیل جلوگیری شود (Neophytou *et al.*, 2007). در این مطالعه به درختانی که در مقایسه با دیگر درختان سالم به‌نظر می‌رسیدند، کد ۱ و به‌ترتیب به‌تدریج افزایش خشکیدگی تاج درختان کد ۲، ۳ و ۴ داده شد. به این صورت که کد ۱ متعلق به درختانی با خشکیدگی کمتر از ۲۰٪، کد ۲ به درختان با خشکیدگی بین ۲۰ تا ۴۰٪، کد ۳ به درختان با خشکیدگی ۴۰ تا ۷۰٪ و کد ۴ درختان با خشکیدگی بیش از ۷۰٪ داده شد. برای طبقات ارتفاعی نیز به‌ترتیب از ارتفاع پایین از ۱۲۵۶ تا ۱۴۵۰ متر از سطح دریا و ارتفاع بالا نیز از ۱۴۵۰ تا ۱۶۳۰ متر از سطح دریا درنظر گرفته شد. سپس به‌منظور استخراج پروتئین بذر، ۰/۳ گرم بذر رسیده از هر ژنوتیپ به‌طور جداگانه در هاون چینی و به‌کمک

Archive of SID

www.SID.ir

ازت مایع ساییده و پودر شدند. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸، EDTA یک میلی‌مولار، PMSF یک میلی‌مولار، مرکاپتواتانول ۲٪) به نمونه اضافه شد. بعد از ورتکس، نمونه به‌مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن مایع رویی برداشته شد و به‌عنوان نمونه نهایی آزمایش شد (Giulian *et al.*, 1992). جهت جداسازی باندهای پروتئینی از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد جهت جداسازی باندهای پروتئینی استفاده شد. سپس برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌های الکتروفورز شده، ابتدا ژل در محلول تثبیت‌کننده به‌مدت ۳ ساعت قرار داده شد و سپس در محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو به‌مدت ۴ ساعت گذاشته شد. بعد از این مدت زمان محلول رنگ‌آمیزی تخلیه و به‌جای آن محلول رنگ‌بر (متانول، استیک‌اسید و آب) اضافه شد. رنگ‌بری تا هنگامی ادامه یافت که زمینه ژل روشن شده و باندهای پروتئینی به‌وضوح مشاهده شدند. بعد از رنگ آمیزی ژل، ژل مورد نظر اسکن و حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی با اعداد ۰ و ۱ در Excel وارد شدند. برای مشخص کردن دوری یا نزدیکی پایه‌های درختان زربین بر اساس چند شکلی حاصل از پروتئین ذخیره‌ای بذر در طبقه‌های ارتفاعی یا کلاسه‌های خشکیدگی درختان از تجزیه خوشه‌ای با روش Ward استفاده شد. با استفاده از تجزیه تابع تشخیص (Discriminant analysis) با روش Wilks Lambda، صحت طبقه‌بندی کلاسه‌های مختلف خشکیدگی و ارتفاعات و نیز باندهای معرف تعیین شدند. همه این تجزیه‌ها در نرم‌افزار SPSS,۱۹ انجام شد. برای تعیین تفاوت ژنتیکی بین و داخل جوامع ارتفاعی از نرم‌افزار ARLEQUIN 1,3 با استفاده از تجزیه واریانس AMOVA انجام شد. همچنین از نرم‌افزار Popgene 1.31 برای تعیین درصد الل‌های چندشکل، تعداد الل در هر مکان ژنی، شاخص شانون، تنوع ژنتیکی کل (نئی)، تنوع ژنتیکی داخل جمعیت و جریان ژن برای پروتئین ذخیره‌ای بذر استفاده شد.

نتایج

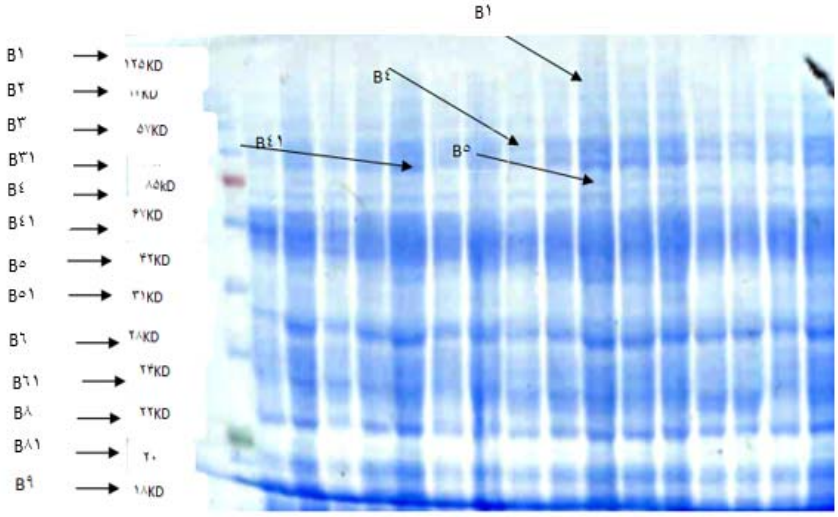
الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئینی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در (شکل ۱) نشان داده شده است. وزن مولکولی باندهای ظاهر شده در این شکل بین ۱۸ تا ۱۲۵ کیلو دالتون متفاوت بود. در این بررسی به‌وجود باند در ژل عدد یک و به‌عدم وجود باند عدد صفر داده شد. در مجموع برای نمونه‌های مورد مطالعه، ۳۹۵ باند مشاهده شد. بیشترین تعداد باندهای ظاهر شده در محدوده وزنی ۲۴ تا ۷۲ کیلودالتون یا باندهای سبک بود. تعداد باند ظاهر شده در ارتفاعات بالا بیشتر از ارتفاعات پایین بود. همچنین بیشترین تعداد باند در درختان سالم و کمترین باند در درختان با خشکیدگی شدید بود (جدول ۱).

جدول ۱- تعداد باندهای مشاهده شده در ارتفاعات و کلاسه‌های مختلف خشکیدگی

تعداد باند	کلاسه‌های خشکیدگی				طبقات ارتفاعی	
	شدید	متوسط	ضعیف	سالم	ارتفاع پایین	ارتفاع بالا
۱۶۵- ۷۲	۱۰	۴۲	۱۶	۵۵	۵۲	۷۵
۱۸-۷۲	۲۳	۷۹	۷۶	۹۵	۱۲۳	۱۴۵
تعدادکل باند	۳۳	۱۲۱	۹۲	۱۵۰	۱۷۵	۲۲۰

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- پروفیل پروتئین‌های ذخیره‌ای سرو زربین

نتایج تجزیه و تحلیل تابع تشخیص نشان داد که ۴ باند B۱، B۴، B۴۱ و B۵ در زمرهٔ باندهای اختصاصی بودند که توانستند باعث تفاوت بین دو منطقه ارتفاعی شوند (جدول ۲). اما این تجزیه نتوانست کلاسه‌های مختلف خشکیدگی را از یکدیگر جدا کند. همچنین نتایج تجزیه تشخیص نشان داد که درختان زربین براساس تابع تشخیص، ۱۰۰درصد توسط ارتفاع از سطح دریا از هم جدا شدند (جدول ۳). تعداد باندهای معرف بر اساس تجزیه تابع تشخیص در ناحیه سنگین تا متوسط (B۱، B۴، B۴۱) در طبقه ارتفاعی بالا بیشتر از طبقه ارتفاعی پایین و باند معرف B۵ (متوسط) نیز در طبقه ارتفاعی پایین بیشتر از طبقه ارتفاعی بالا بود (جدول ۴).

جدول ۲- همبستگی بین باندهای پروتئینی با توابع ارتفاع از سطح دریا با استفاده از تجزیه تابع تشخیص

	استاندارد شده	همبستگی با محور
B1	۱/۲۸	۰/۶۱۸
B4	۱/۱۲	۰/۰۱۹
B41	-۱/۶۲	-۰/۰۳۶
B5	-۰/۴۸	-۰/۴۲

جدول ۳- جدول صحت کلاسه‌بندی طبقات مختلف ارتفاعی بر اساس تجزیه تابع تشخیص

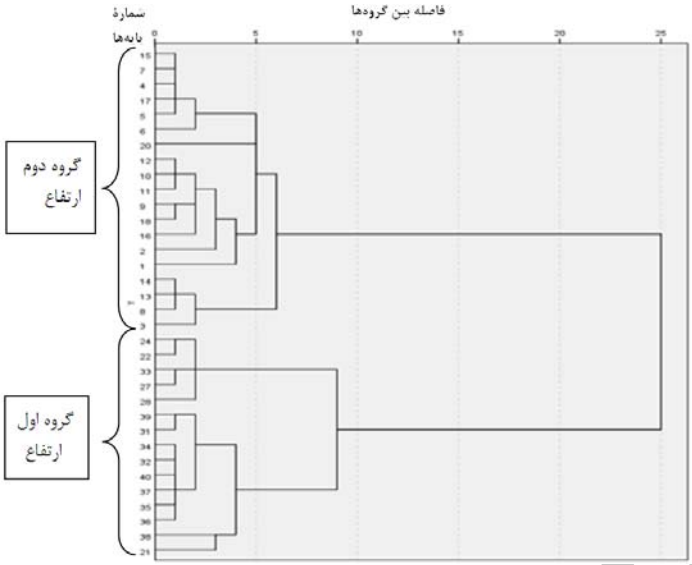
	کلاسه‌بندی در هر گروه		
طبقات ارتفاعی	ارتفاع پایین	ارتفاع بالا	کل
پایین	۱۸	۰	۱۸
بالا	۰	۱۶	۱۶

جدول ۴- تعداد باندهای معرف در طبقات ارتفاعی مختلف

باندهای معرف	ارتفاع پایین	ارتفاع بالا
B۱	۱۰	۱۵
B۴	۲۰	۳۳
B۴۱	۸	۱۸
B۵	۲۷	۱۶

نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که درختان (۴۰ پایه) در دو گروه مجزا قرار گرفتند، به‌طوری که درختان طبقه ارتفاعی پایین در گروه اول و درختان طبقات ارتفاعی بالا در گروه دوم بودند (شکل ۲) اما این تجزیه همانند تجزیه تابع تشخیص نتوانست کلاسه‌های مختلف خشکیدگی را از هم جدا کند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

نتایج تنوع ژنتیکی جوامع ارتفاعی و کلاسه‌های مختلف خشکیدگی هم نشان داد که شاخص شانون برای درختان با خشکیدگی ضعیف و متوسط بیشتر از درختان سالم و با خشکیدگی شدید بود. همچنین در درختان ارتفاع پایین کمتر از ارتفاع بالا بود. اما تنوع ژنتیکی کل در درختان با خشکیدگی شدید کمترین مقدار و در سایر کلاسه‌ها با هم تفاوت چندانی نداشت. بیشترین درصد چند شکلی نیز در درختان با خشکیدگی ضعیف مشاهده شد که معادل ۹۳/۷۵ بود و کمترین درصد چندشکلی هم در درختان با خشکیدگی شدید با مقدار ۶۲/۵۰ مشاهده شد. درصد چندشکلی مربوط به درختان در طبقه ارتفاعی بالا (۸۷/۵۰ درصد) نیز بیشتر از طبقه ارتفاعی پایین (۴۳/۷۵ درصد) بود (جدول ۵). میانگین میزان جریان ژن نیز در درختان با درجات مختلف خشکیدگی ۳/۳۶ اما در دو طبقه ارتفاعی بالاتر و به‌میزان ۶/۰۲ بود.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) (Hawija, 2009) نشان داد که تنوع درون جمعیتی در دو طبقه ارتفاعی بیشتر از تنوع بین جمعیتی است و تفاوت جمعیت معادل ۰/۴۲ بود (جدول ۶). اما این تجزیه بین جمعیت‌های مورد بررسی درختان در کلاسه‌های مختلف خشکیدگی تفاوتی را نشان نداد و برابر با صفر بود. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت سالم و خشکیدگی شدید (۰/۱۲۹) و کمترین فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت با خشکیدگی ضعیف و متوسط بود (۰/۰۷) (جدول۷). اما فاصله ژنتیکی درختان طبقه ارتفاعی بالا و طبقه ارتفاعی پایین ۰/۴۶ بود.

جدول ۵- پارامترهای ژنتیکی درختان واقع در طبقات خشکیدگی و ارتفاعات مختلف

	طبقات ارتفاعی		کلاسه‌های خشکیدگی			
	بالا	پایین	شدید	متوسط	ضعیف	سالم
تعداد چندشکلی	۱۴	۷	۱۰	۱۴	۱۵	۱۱
درصد چندشکلی	۸۷/۵۰	۴۳/۷۵	۶۲/۵۰	۸۷/۵۰	۹۳/۷۵	۶۸/۷۵
تنوع ژنتیکی کل (نئی)	۰/۳۱	۰/۱۹	۰/۲۷	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۳۸
شاخص شانون	۰/۴۶	۰/۲۸	۰/۳۹	۰/۵۵	۰/۵۷	۰/۴۰

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی داده‌های پروتئین بذرهای زربین در درختان دو طبقه ارتفاعی

منابع تغییر	مجموع مربعات	درصد تغییرات
تنوع بین جمعیتی	۲۳/۹۳	۴۲/۲۶
تنوع درون جمعیتی	۶۰/۰۳	۵۳/۷۳**

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۷- فاصله ژنتیکی با استفاده از تجزیه نی برای جمعیت درختان خشکیده و سالم

خشکیدگی	سالم	ضعیف	متوسط
ضعیف	۰/۱۲۰		
متوسط	۰/۰۸	۰/۰۷	
شدید	۰/۱۲۹	۰/۱۱	۰/۰۹

بحث

خشکیدگی می‌تواند بیان پروتئین را تغییر دهد و باعث تغییر در تعداد باندهای پروتئینی شود (Kakaei *et al.*, 2009). تعداد باندهای پروتئینی در این تحقیق در درختان سالم بیشتر از درختان خشکیده بود.

نتایج تحقیق Ahmadi Mosavi و Kalantari (۲۰۰۸) روی کلزا (*Brassica napus* L.) نشان داد که در شرایط تنش خشکی تعداد باندهای پروتئینی کمتر بودند که مطابق با نتایج این تحقیق بود. زیرا زمانی که گیاهان تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند، این تنش‌ها سبب تخریب آنزیم‌ها و آسیب به غشاها و پروتئین‌ها می‌شود (Agarawal & Pandy, 2004). همچنین گیاهان به‌دلیل عدم جنبش و بی‌حرکتی باید متابولیت‌های ضروری را بسازند تا بتوانند بر شرایط تنش تحمیل شده غلبه نمایند. تغییر در غلظت پروتئین‌ها موجب کاهش یا فرونشاندن سنتز برخی پروتئین‌های ساختاری یا آنزیمی دخیل در فعالیت‌های سوخت و ساز خاص می‌شود (Sanchez *et al.*, 2002). بررسی Raeisi و همکاران (۲۰۱۱) روی گونه بلندمازو نیز نشان داد که در ناحیه وزن مولکولی سبک باندی وجود ندارد و علت آن را گرم‌بودن هوا در فصل نمونه‌برداری بیان کردند. زیرا گرمای هوا مانع از فعالیت برخی آنزیم‌ها در محدوده وزن مولکولی سبک می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که شرایط محیطی نامناسب در ارتفاع پایین و نیز فیزیولوژی ضعیف‌تر درختان خشکیده باعث کمتر شدن باندهای پروتئینی آن‌ها شده است. همچنین وزن مولکولی باندهای ظاهر شده در این تحقیق بین ۱۸تا ۱۲۵ کیلو دالتون بود. نتایج Asadicorom و همکاران (۲۰۱۱) روی بذر دو گونه از گز روغنی (*M. oleifera, Moringa peregrina*) مطابق این تحقیق بود به گونه‌ای که باندهای مشاهده شده در بررسی آن‌ها نیز در محدوده ۱۸ تا ۱۲۵ کیلودالتون بود و بیشترین تعداد باندها در محدوده وزن مولکولی متوسط بود که نشان‌دهنده تفاوت کمی و کیفی بین باندهای پروتئینی بود. ضمن این که فواصل جغرافیایی در این توده‌ها تا اندازه‌ای موجب تمایز بین باندهای پروتئینی شده بود. اما نتایج Ehsanpour و همکاران (۲۰۱۱) روی ۴ جمعیت بذر پسته وحشی نشان داد که حضور باندهای پروتئینی بیشتر در محدوده ۴۵ تا ۹۰ کیلودالتون بود که نشان‌دهنده شباهت بسیار نزدیک ۴ جمعیت مورد مطالعه بود. بنابراین با توجه به‌محدوده زیاد باندهای پروتئینی می‌توان گفت که بذر درختان این منطقه چه از لحاظ ارتفاعی و چه از لحاظ خشکیدگی دارای تفاوت‌های پروتئینی زیادی هستند. تنوع ژنتیکی نئی و تنوع شانون شاخص‌هایی برای بررسی تنوع

Archive of SID

www.SID.ir

ژنتیکی هستند، بنابراین از این دو پارامتر می‌توان برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی براساس شاخص شانون و نئی در درختان با خشکیدگی ضعیف بیشترین (به‌ترتیب ۰/۵۷ و ۰/۴) و در درختان با خشکیدگی شدید کمترین مقدار (۰/۳۹ و ۰/۲۷) بود. همچنین تنوع ژنتیکی در درختان طبقات ارتفاع پایین کمتر از ارتفاع بالا بود. نتایج Ahmadi و همکاران (۲۰۰۳) در راستای نتایج این تحقیق بود، به‌طوری که تنوع ژنتیکی نئی و تنوع شانون در درختان نرمال انگور را بیشتر از درختان تحت تنش این گونه بیان کردند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا برای درختان نرمال بود. همچنین تحقیق Peng و همکاران (۲۰۰۷) روی گونه *Picea likiangensis* در دو طبقه ارتفاعی مشاهده کردند که شاخص شانون در محدوده ۰/۷ تا ۰/۵ و شاخص نئی در محدوده ۰/۵ تا ۰/۲ بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا برای این گونه بود. در ضمن Kohle وTandon (۱۹۹۸) نیز با بررسی تنوع ژنتیکی پروتئین ذخیره‌ای بذر در گونه *Pinus kesiya* به این نتیجه رسیدند که شاخص شانون در ارتفاعات بالا بیشتر از ارتفاعات پایین، در نتیجه تنوع ژنتیکی در ارتفاعات بالا بیشتر از ارتفاعات پایین بود. بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که تنوع ژنتیکی درختان زربین این منطقه بر اساس دو شاخص شانون و نئی بالا است و از تنوع ژنتیکی مطلوبی برخوردار هستند. همچنین از آنجایی که شاخص شانون و نئی در ارتفاعات بالا بیشتر از ارتفاعات پایین و در درختان با خشکیدگی ضعیف بیشتر از سایر کلاسه‌های خشکیدگی است، می‌توان گفت تنوع ژنتیکی در ارتفاعات بالا و در درختان با خشکیدگی ضعیف بیشتر بوده است. وجود تنوع بیشتر در ارتفاعات بالا می‌تواند به‌دلیل شرایط بهتر محیطی و بوم‌شناختی برای این گونه باشد (FAO, 2001). همچنین وجود تنوع بیشتر در درختان ضعیف طبق نتایج Fayyaz و همکاران (۲۰۱۳) می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت پروتئین بذر در این کلاسه خشکیدگی باشد. از طرف دیگر Tandon (۱۹۹۸) با بررسی تنوع ژنتیکی گونه *Pinus kesiya*، افزایش تنوع ژنتیکی در درختانی با خشکیدگی کم را به‌دلیل سنتز برخی آنزیم‌ها و پروتئین‌ها برای مقابله با تنش خشکیدگی بیان کردند. بنابراین می‌توان گفت که چون درخت تحت تنش است، برخی آنزیم‌ها و پروتئین‌ها برای مقابله با خشکیدگی بیان شده که در درختان سالم بیان این آنزیم‌ها و پروتئین‌ها کمتر است (Sergeant *et al*., 2009).

نتایج حاصل از درصد چندشکلی که مقیاسی دیگر برای بررسی تنوع ژنتیکی است در ارتفاعات و کلاسه‌های مختلف خشکیدگی نیز نتایج فوق را تایید می‌کند. از آنجایی که درصد چندشکلی در این تحقیق برای طبقه ارتفاعی بالا ۸۶/۵ و برای درختان با خشکیدگی ضعیف ۹۳/۷۵ بود، می‌توان گفت در مقایسه با دیگر تحقیقات درصد چندشکلی در این تحقیق بالا است. به‌طوری که مطالعات Ghandehari و Ahmadikhah (۲۰۱۴) روی بررسی تنوع ژنتیکی گونه شمشاد در سه منطقه بندر گز، سیسنگان نوشهر و قرن‌آباد گرگان نشان داد که درصد چندشکلی در منطقه بندر گز ۸۴/۵ بود و تنوع ژنتیکی بالایی را برای این منطقه بیان کردند.

جریان ژن بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها یک نیروی تکاملی به‌شمار می‌رود که ساختار و تنوع ژنتیکی را در مکان و زمان تعیین می‌کند. از آنجایی که جریان ژن معمولا با انتقال بذر و گرده اتفاق می‌افتد، بنابراین جریان ژن در گونه‌هایی که توسط باد گرده‌افشانی می‌کنند تا مسافت‌های بیشتری انتقال می‌یابد و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها را کم می‌کند (Gowidarjo, 1989). میانگین جریان ژن در دو طبقه ارتفاعی ۶/۰۲ و این عدد نشان‌دهنده بالا بودن جریان ژن در این دو طبقه ارتفاعی است، چون در واقع درختان واقع در دو طبقه ارتفاعی در یک گرادیان ارتفاعی قرار دارند و امکان تبادل مواد ژنتیکی بین آنها وجود دارد. نتایج Strack (۱۹۹۶) روی گونه راش شرقی و Nuvascues و همکاران (۲۰۰۷) روی گونه *Pinus canariensis* هم موافق نتایج این تحقیق بود. نتایج بررسی آنها نشان‌دهنده بالا بودن میانگین جریان ژن در طبقات ارتفاعی بود که علت این امر را گرده‌افشانی این گونه‌ها با باد و عدم وجود موانع بوم‌شناختی بیان کردند. اما نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

Alikhani و همکاران (۲۰۱۴) روی دو گونه *Quecus infectoria* و *Quercus libani* در جنگل‌های زاگرس شمالی مخالف نتایج این تحقیق بود. آنها علت پایین بودن جریان ژنی را پایین بودن نرخ جوانه‌زنی در جنگل‌های زاگرس شمالی بیان کردند. از طرف دیگر میانگین جریان ژن در کلاسه‌های مختلف خشکیدگی ۳/۳۶ بود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تنوع بین جمعیتی کمتر از تنوع درون جمعیتی است. نتایج بررسی Ellena- Roselo و همکاران (۱۹۹۶) روی تنوع ژنتیکی گونه بلوط با استفاده از ایزوآنزیم‌ها و Cawly و همکاران (۲۰۰۱) روی بذر گونه *Pinus ocarpa* موافق نتایج این تحقیق بود. آنها در طبقات ارتفاعی ۲۰۰– ۹۰۰ متر از سطح دریا مطالعه کردند و تنوع درون جمعیتی را بیشتر از تنوع بین جمعیتی مشاهده کردند. آن‌ها علت تنوع کمتر بین جمعیتی را گرده افشانی با باد بیان کردند. اما نتایج Seyedi و همکاران (۲۰۱۱) روی ژنوتیپ‌های بذر گونه پسته وحشی (*Pistacia atlantica* Desf) مخالف با نتایج این تحقیق بود. آنها علت تنوع کمتر درون جمعیتی نسبت به بین جمعیتی را فواصل جغرافیایی بین جمعیت‌ها بیان کردند. نتایج حاصل از فاصله ژنتیکی نیز نشان داد که درختان با خشکیدگی ضعیف، به دلیل اینکه در مراحل اولیه زوال بودند با درختان سالم فاصله ژنتیکی زیادی داشتند، زیرا این درختان با استفاده از فعالیت‌های آنزیمی و سنتز پروتئین توانستند با از بین رفتن پروتئین ذخیره‌ای مقابله کنند (Ayerza, 2009). همچنین در درختان با خشکیدگی شدید به‌دلیل اینکه میزان زوال پروتئین بذر به بالاترین مقدار رسیده است، در نتیجه فعالیت‌های متابولیکی کاهش و آنزیم‌های هیدرولیتیکی قادر به فرستادن مواد ذخیره‌ای به جنین نمی‌شود (Kohle & Tandon, 1998). در نتیجه فاصله ژنتیکی این درختان نیز با درختان سالم زیاد شد. اما با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای درختان دو طبقه ارتفاعی بر اساس باندهای پروتئینی از یکدیگر جدا شدند. در واقع به‌نظر می‌رسد که شرایط متفاوت اکولوژیکی و اقلیمی در دو طبقه ارتفاعی باعث ایجاد اختلاف در زمان گلدهی و گرده‌افشانی می‌شود و از طرف دیگر به‌دلیل اینکه پروتئین بذر تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد، بنابراین فاصله ژنتیکی بین آنها به‌وجود آید و در تجزیه خوشه‌ای دو کلاسه ارتفاعی در دو گروه جداگانه قرار گیرند. از طرف دیگر اگرچه تفاوت بین جمعیتی کمتر از تفاوت درون جمعیتی بود، اما FST دو جمعیت که به‌میزان ۰/۴۲ بود که برای جمعیت‌های گونه‌های درختی بالا بود. از آنجایی که به ازای هر ۱۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا به‌علت کاهش حرارت، بهار (فصل گلدهی) سه تا چهار روز دیرتر شروع می‌شود (Mohajer, 2014). بنابراین به‌نظر می‌رسد بیش از دو هفته اختلاف گرده‌افشانی در دو منطقه ارتفاعی وجود خواهد داشت، در نتیجه اختلاف زمانی در گرده‌افشانی دو منطقه ارتفاعی می‌تواند باعث کاهش تبادلات ژنی بین دو جمعیت ارتفاعی شود. همچنین از آنجایی که گونه زربین باد گرده‌افشان است و به‌خاطر محدود شدن طبقات پایین در درون دره و کاهش وزش بادهای مداوم در فصل گرده‌افشانی نسبت به ارتفاعات، تبادلات ژنتیکی در درون جمعیت‌ها نیز پایین می‌آید و عکس این قضیه در ارتفاعات بالا به‌علت وزش بادهای مداوم رخ می‌دهد. بنابراین با توجه به مجموع نتایج می‌توان گفت که توده زربین این منطقه از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. همچنین بین درختان خشکیده و سالم منطقه تفاوتی از لحاظ پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر وجود ندارد اما در بین درختان ارتفاعات مختلف از این نظر تفاوت وجود دارد. همچنین پیشنهاد می‌شود که از بذر درختان ارتفاع بالا که از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار هستند برای جنگلکاری به‌منظور افزایش تنوع ژنتیکی استفاده شود. همچنین می‌توان از بذر این درختان استفاده کرد و روی نهال‌های حاصل از این بذور تنش‌های سرما و خشکی و نظائر اینها اعمال شود و مقاومت نهالها نسبت به تنش‌های گفته شده ارزیابی شود.

منابع مورد استفاده

– Agarawal, P. and Pandy, M., 2004., Identification of cotton hybrid seed using PAGE. Seed Science and Technology, 16: 563-569.

Archive of SID
www.SID.ir

– FAO, 2001. Global Forest Resources Assessment, FAO Forestry Paper 140. Rome, Food and Agriculture Organization. http://www.fao.org/forestry/fo/fra/ [Geo-2-416]
– Fayyaz, P., Derikvand, R. and Zolfaghari, R., 2013. Relationship between physiology and dieback stems of *Cupressus sempervirens* L. var. horizontalis using seed storage protein in the Tang-e-soulak reserve. Second Iranian Conference on Natural Resources Research With Emphasis on Forest Sciences, Sanandaj, Iran.
– Ghandehari, V. and Ahmadikhah, A., 2014. Analysis of genetic diversity among populations of *Buxsus* using ISSR markers (in north). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 21(1): 1- 12.
– Gilliand, G., Ajio, D. and Graham. J., 2000. The electrophoretic separation of low molecular weight polypeptides in polyacrylamide gels. Hoefer Scientific Instruments Catalogue. Techniques and Exercises in Electrophoresis, San Francisco, 131-133.
– Gowidarjo, S., 1989. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. Heredity, 46: 407- 426.
– Hafezi Shahroudian. S., Azadfar, D., Soltanloo, H. and Ramezanpour, S., 2010. genetic variability in natural Iranian populations of *cupressus sempervirens L.* var. *horizontalis* in Caspian sea coastward assessed by SSR markers. Journal of Plant Omics, 41: 19- 24.
– Al-Hawija, B.N., Wanger, V., Partzsch, M. and Hansen, I., 2014. Genetic differences between natural and afforested populations of *Pinus brutia* and *Cupressus sempervirens* in Syria. Silva Fennica, 48- article online.
– Jazirei, M.H., 2003. Silviculture in Arid Biom. Tehran: University of Tehran Press, 150 p.
– Kakaei, M., Zabarjadi, E. and Mostafaei, E., 2009. Study of protein pattern in *Brassica napus* genotypes under non-stress and drought stress conditions. Agricultural Biotechnology, 9: 49- 57.
– Kermani, M., Marashi, S. and Safarnejad, E., 2009. Investigation of genetic variation within and among two species of *Cuminum sp.* using AFLP markers, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 199- 207.
– Kohle, R.K. and Tandon, P., 1998. Biochemical adaptations in *Pinus kesiy* Roylex Gord population growing at different altitudes. Journal Biochemical, 193: 265- 275.
– Martinet. M.A., Alvarez, J.B. and L.M. martin, 2010. Genetic diversity of Spanish fir (*Abies pinsapo*
– Ahmadi, A., Soltani, E. and Yarali, N., 2003. A comparison between understory phytodiversity of a natural forest and forest plantations (Case study: Langerud – Guilan**)**. Iranian Journal of Forest, 3: 157- 167.
– Ahmadi Mousavi, E. and Manouchehri Kalantari K.H., 2008. Effects of methyl jasmonate and their interaction on seed germination and seedlings of some biochemical factors Canola (*Brassica napus* L.). Iranian Biology, 21: 206- 215.
– Alikhani, L., Rahmani, M.Sh., Shabanian, N. and Badakhshan, H., 2014. Genetic diversity assessment of *Quercus infectoria* and *Q. libani* populations in North-Zagros forests based on ISSR and IRAP markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22: 79- 90.
– Asadicorom, F., Mirzaie-Nodoushan, H., Emam, M. and Bakhshi Khaniki, GH., 2011. Variation in seed storage proteins of two *Moringa* species (*Moringa peregrina* and *M. oleifera*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 18: 154-164.
– Ayerza, R., 2009. The seeds protein and oil content, fatty acids composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. Journal of Oleo Science, 58: 47-54.
– Bau, S.M.T., Mazzafera, P. and Santoro, L.G., 2007. Seed storage proteins in coffee. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13: 33-40.
– Bengeston, J., 2013. Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history. Forest Ecology and Management, 247:98-106.
– Bulter, M., Chodaparambil, S.V., Limin, A., Pecar, M., Fowler, B. and Chbar, R.N., 1996. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. Crop Science, 7: 53-68.
– Cawly, J.P., Svachulova, J., Smartt, J., Hadac, E., Turkova, V. and Hadacova, V., 2001. Comparative studies of seed proteins and enzymes of species and collections of *Pinus oocarpa* by gel electrophoresis. Biologia Plantarum, 25(4): 266-273.
– Ehsanpour, E., Shojaei, B. and Rostami, F., 2011. Using protein markers of embryo and seed storage proteins in identification of four *pistachio* cultivars, Taxonomy and Biosystematics, 3(4): 1- 10
– Elena- Rossello, J., de Rio, J., Garcia Valdecantos, J. and Santamaria, I., 1996. Ecological aspects of the floral phenology of the cork - oak (*Q. suber* L): why do annual and biennial biotypes appear? Annals of Forest Science, 50: 114- 121.

Archive of SID

www.SID.ir

storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 1043-1049.
– Sergeant. K., Renaut, J., Laukens, K., Witters, E., Samyn, B. and Devresee, B., 2009. Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. Mass Spectrometry Reviews, 27:354–377.
– Seyedi, N., Jalali, S.Gh., Moghaddam, M., Tabari, M. and Mohammadi, S.A., 2011. Application of seed storage protein in intra-specific variation in three populations of *Pistacia atlantica* Desf, Iranian Biology, 2: 1- 14.
– Strack, C.C., 1996. Experimental evolution of usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. Molecular Ecology, 9: 1517-1528.
– Tandon, P., 1998. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.), in Int. Congr. on Plant Tissue Cell Cult., held on 14-19 June.
– Thanch, S.S., Sathe, S.K., Peterson, W.R. and Roux, K.H. 1976. Characterization of the Soluble Allergenic Proteins of Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 6543- 6549.
– Westbrook, J.W., Resende, M.F.R., Munoz, P., Walker, A.R., Wegrzyn, J.L., Nelson, C.D. and Neale, D.B., 2013. Association genetics of oleoresin flow in loblolly *pine*: discovering genes and predicting phenotype for improved resistance to bark beetles and bioenergy potential. New Phytologist, 199: 89-100.

Boiss.) populations by means of megagametophyte storage proteins. Journal Forest Science, 67: 101-112.
– Mirhoseini, Z., Balvasi, A. and Nozari, J., 2002. Assessment of genetic diversity of native silkworm using microsatellite markers. Iranian Agricalture, 36: 54- 70.
– Mirzaie-Nodoushan, H., 2015. Forest Trees Seed Orchard. Tehran University Press, Tehran.
– Mohajer, M. R., 2014. Silviculture. Tehran: University of Tehran press, 418 pp.
– Neophytou, Ch., Palli, G., Douvani, A. and Aravanopoulos, F.A., 2007. Morphological differentiation and hybridization between *Quercus alnifolia* Poech and *Quercus coccifera* L. (*Fagaceae*) in Cyprus. Silvae Genetica, 56: 1-7.
– Nuvascues, M., Vendramin, G.G. and Emerson, B.C., 2007. The Effect of altitude on the pattern of gene flow in the endemic Canary island pine, *Pinus canariensis*. Ecological Monographs, 77:99-115.
– Peng, X.L., Zhao, C.M., Wu, G.L. and Liu, J.Q., 2007. Genetic variation and phylogeographic history of *Picea likiangensis* revealed by RAPD markers. Trees, 21: 457-464.
– Raeisi, Sh., Jalali, A. and Espahbodi, K., 2011. An investigation of genetic variation of (*Quercus*. *castaneafolia* C. A. Mey) in Neka and Noor forest of Mazandarn using peroxides activities. Taxonomy and Biosystematics, 7: 11- 22.
– Rao, E.V., 1999. Comparative assessment of SDS-PAGE techniques for genetic analysis of *(Pistacia vera* L.) accessions of India. Genome, 46: 362– 369.
– Sánchez-Romero, C., Perán-Quesada, R., Barceló-Muñoz, A. and Pliego-Alfaro, F., 2002. Variations in

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of genetic diversity of dieback and healthy Cypress (*Cupressus sempervirens* L. Var. *horizontalis*) at different altitudes using seed storage proteins

R. Zolfaghari[1*], R. Derikvand[2], R. Naghiha[3] and P. Fayyaz[3]

1*- Corresponding author, Assoc. Prof., Yasuj University, Yasuj, I.R.Iran
Email: zolfaghari@yu.ac.ir
2- M.Sc. Student, Yasuj University, Yasuj, I.R.Iran
3 - Assist. Prof., Yasuj University, Yasuj, I.R.Iran

Received: 16.02.2015 Accepted: 13.07.2015

Abstract

Proteins as direct products of genes are considered as the appropriate markers to assess genetic diversity and to identify resistant individuals. For investigation of Cypress (*Cupressus sempervirens*) seed storage protein based on quality activities by using SDS-PAGE method, 40 samples were taken on dried and healthy trees on two altitude classes. Results showed that weight of molecular bands on electrophoretic pattern of protein bands were between 18 and 125 KDa. Results of clustering and discriminant analysis also showed that trees from the two altitude classes could be distinguished by protein bands, but trees with different dried degrees could not be distinguished. Genetic diversity indices such as Shannon index and Nei, polymorphism percentage, showed trees with low and high dried degrees had the highest and lowest degree of the indices, respectively. Also trees from high altitudes had higher genetic diversity than trees from low altitudes. Diversity within the populations in the two altitude classes was more than variation between the populations. Also Genetic variation among altitudes in different populations (FST) was equal to 0.42. Therefore, results implied that Cypress trees in the studied region contain high genetic diversity, especially at high altitude. Also we could not distinguish dried and healthy trees by using seed storage protein.

Keywords: Tang-Solak, forest reservation, dieback, electrophoresis, cypress.

Archive of SID

www.SID.ir