تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره شانزدهم، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۵۵-۶۸
دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۲/۲۵

بررسی تنوع زیستی با روش تعیین زیستگاه ویژه و مقایسه الکتروفورزی پروتئین‌های بذر جمعیت‌های دو گونه بومادران (*Achillea* L.) در غرب ایران

هاجر صالحی، عبدالکریم چهرگانی راد *، مرتضی عطری و فریبا محسن‌زاده
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

چکیده

تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای از ذخایر مهم تنوع زیستی و منشأ مهم گونه‌زایی به شمار می‌روند. بنابراین، تعیین آنها در راستای شناخت تنوع زیستی حایز اهمیت است. این پژوهش، با هدف بررسی وجود تنوع زیستی و مقایسه الکترفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌هایی از جنس بومادران (*Achillea*) در استان‌های همدان و کردستان با روش تعیین زیستگاه ویژه (DSS) انجام شد. بدین منظور، با مراجعه به فلورها برای گونه‌های *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* به ترتیب ۱۲ و ۹ زیستگاه ویژه انتخاب و ترکیب فلورستیک گونه‌های هم‌باش همراه با شرایط بوم‌شناختی مطالعه شد. پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استخراج و با تکنیک الکتروفورز با روش SDS-PAGE بررسی گردید. در بررسی زیستگاه‌های ویژه، در مجموع ۱۲۰ گونه هم‌باش برای گونه‌های مورد بررسی شناسایی شد. نتایج حاصل از داده‌های تبارشناختی هر دو گونه به طور مجزا، به تشخیص شش گروه متمایز منجر شد که نشان‌دهنده تنوع بالای درون گونه‌ای در این گیاهان است. تحلیل داده‌های بوم‌شناختی و الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر دو گونه کاملاً منطبق بر نتایج تبارشناختی است و شش گروه پروتئینی کاملاً مشخص برای جمعیت‌های هر دو گونه به دست آمد. وجود نوارهای ۴، ۵، ۸، ۱۲ و ۱۳ که خاص زیستگاه‌های ویژه گونه *A. tenuifolia* است و نوارهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ که خاص زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii* است، دو گونه را از نظر پروتئین‌های بذر در دو گروه کاملاً مجزا قرار داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع درون گونه‌ای، تنوع بین گونه‌ای، نیم‌رُخ پروتئینی، تیره کاسنیان (Asteraceae)

مقدمه

تیره Asteraceae بزرگترین خانواده گیاهی (Bremer, 1994) شامل جنس‌ها و گونه‌های بسیاری است که در سراسر جهان پراکندگی دارند (Watanabe, 2002). Anthemideae جزو یکی از هفت تبار بزرگ این تیره با حدود ۱۰۹ جنس و حدود ۱۸۰۰ گونه در سطح جهان است (Tahir *et al.*, 2002). این تبار در ایران، دارای ۱۲ جنس و حدود

* chehregani@basu.ac.ir

۱۳۴ گونه است که از میان آنها *Achillea*، *Anthemis*، *Artemisia* و *Tanacetum* از مهم ترین جنس ها هستند (Rechinger, 1986). جنس *Achillea* یکی از جوان ترین جنس های تیره Asteraceae از نظر تکاملی است که در سراسر جهان حضور دارد و بیش از ۱۰۰ گونه در این جنس شناسایی شده است (Goli *et al*., 2008). این جنس، در مناطق مختلف ایران با ۱۹ گونه که ۷ گونه آن انحصاری ایران هستند پراکنش دارد (Mozaffarian, 2007).

تنوع زیستی، گوناگونی زندگی و فرآیندهای آن که شامل گوناگونی موجودات زنده، تفاوت‌های ژنتیکی میان آنها، اجتماعات و اکوسیستم‌هایی که در آن وجود دارند و فرآیندهای تکاملی و بوم‌شناختی است که آنها را فعال، در حال تغییر و سازگار نگه می‌دارند (Keystone Center, 1991). ایجاد تنوع درون و بین گونه‌ای منشأ اصلی و ذخیره‌گاه گونه‌زایی است و به غنای تاکسون‌ها در یک منطقه منجر می‌شود (Atri *et al*., 2007). تاکنون بررسی‌های گیاه‌شناسان نشان داده است که افراد متعلق به یک گونه گیاهی کاملاً مشابه یکدیگر نیستند. لینه این تنوعات را در رابطه با اثر محیط و عوامل محیطی تفسیر می‌کرد که به دو صورت تنوع ژنتیکی (منشأ ارثی) و فنوتیپی (منشأ غیر ارثی) ظاهر می‌شود (Maassoumi and Assadi, 2004). بنابراین، مطالعه معیارهای بوم‌شناختی در ایجاد تنوع در زیستگاه‌های متفاوت یک منطقه امری ضروری است. با توجه به اینکه هدف پژوهش حاضر بررسی تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای است سعی شد از روشی استفاده شود که هم معیار تبارشناختی و هم معیار بوم شناختی در مرحله جمع‌آوری داده‌ها مد نظر قرار دهد. بر همین اساس، از روش تعیین زیستگاه ویژه DSS (Determination of Special Station) استفاده شد که الهام گرفته از جامعه‌شناسی گیاهی است (Atri, 2006). Quike (۱۹۹۳) روش الکتروفورز پروتئین های بذر و کاربرد آن در سیستماتیک و شناسایی تاکسون‌ها را توضیح داد و نشان داد که این روش می تواند ابزاری قدرتمند برای جدا نمودن تاکسون‌ها، ارتباطات بین تاکسون های معین و همچنین مشخص نمودن گونه ها، جنس‌ها، بخش‌ها و تیره‌ها به کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

برای بررسی تنوع زیستی (درون گونه‌ای و بین گونه‌ای) ۲۱ جمعیت از گونه‌های *A. biebersteinii* و *A. tenuifolia* از مناطقی از غرب کشور (استان‌های همدان و کردستان) با روش DSS جمع آوری شد که مراحل جمع‌آوری به شرح ذیل است:

۱- انتخاب گونه‌های چند زیستگاهی

۲- تعیین محل‌های پراکنش گونه های بررسی شده با مراجعه به فلورها

۳- تعیین زیستگاه‌های عمومی

۴- تعیین زیستگاه ویژه که با محوریت فرد گونه مورد بررسی و با روش سطح حداقل یا روش Cain و de Oliveira (۱۹۵۹) تعیین می شود. شایان ذکر است که در روش DSS، زیستگاه ویژه عبارت است از سطحی از پوشش گیاهی که بر اساس حضور گونه مورد نظر تعیین می‌شود و از نظر تبارشناختی- بوم‌شناختی یکنواخت است.

۵- جمع‌آوری داده‌های فلوربستیک بوم‌شناختی از زیستگاه‌های ویژه که در این مرحله تمامی گونه‌های هم‌باش با فرد گونه مورد بررسی جمع‌آوری و

کدگذاری می‌شود. همچنین، داده‌های بوم‌شناختی (از جمله: ارتفاع، درصد شیب، جهت شیب، نوع بستر و ...) نیز ثبت شد.

۶- شناسایی نمونه‌های گیاهی

۷- کدگذاری و تحلیل داده‌های تبارشناختی- بوم‌شناختی بر اساس ترکیب گونه‌ای (به عنوان نشانگر تبارشناختی) با نرم‌افزار Anaphyto و روش FCA (Factoria Correspondence Analysis) انجام شد. داده‌های بوم‌شناختی نیز با نرم‌افزار MVSP با روش PCA (Principal Components Analysis) تحلیل شد.

۸- گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه بر اساس نشانگر تبارشناختی

۹- تعیین گونه یا گونه‌های تشخیصی

پس از تعیین و اثبات وجود تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای، به تعیین و تشخیص سطح و نوع تنوع با روش‌های مورفومتری، سیتولوژی، گرده‌شناسی، الکتروفورز و ... پرداخته می شود. در مطالعه حاضر، برای تعیین سطح تنوع و مقایسه گونه‌های مطالعه شده از الکتروفورز پروتئین های بذر روی ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد (Hames and Rickwood, 1990). برای استخراج پروتئین ها از بافر فسفات سدیم (اسیدیته=۷) استفاده شد. عصاره پروتئینی استخراج شده به نسبت مساوی با بافر نمونه مخلوط گردید و به مدت سه دقیقه در حمام آب گرم حرارت داده شد. ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها تزریق شد. پس از اتمام الکتروفورز، رنگ آمیزی با رنگ کوماسی بلو بریلیانت R_{250} انجام شد. سپس، موقعیت هر نوار روی ژل به صورت کدهای یک و صفر که نشان‌دهنده وجود و عدم وجود نوار مربوط است مشخص گردید. کدهای به دست آمده با نرم‌افزار NTSYS روش complete lonkage و نرم‌افزار MVSP روش PCA تحلیل شد.

نتایج

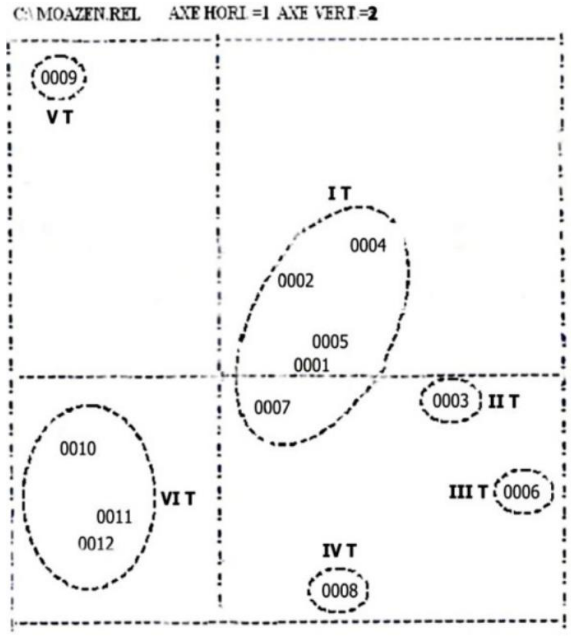
نتایج بررسی‌های تبارشناختی

با مراجعه به زیستگاه‌های عمومی در استان‌های کردستان و همدان ۲۱ زیستگاه ویژه، برای گونه های *A. tenuifolia* (۱۲ زیستگاه ویژه) و *A. biebersteinii* (۹ زیستگاه ویژه) تعیین شد (جدول ۱) و در مجموع، تعداد ۱۲۰ گونه گیاهی به عنوان گونه‌های هم‌باش از ۲۱ زیستگاه ویژه به عنوان ترکیب رُستنی‌ها شناسایی شد که فهرست کامل این گونه ها به صورت حضور (۱) و عدم حضور (۰) در هر یک از زیستگاه های ویژه در جدول ویژه‌ای وارد شد.

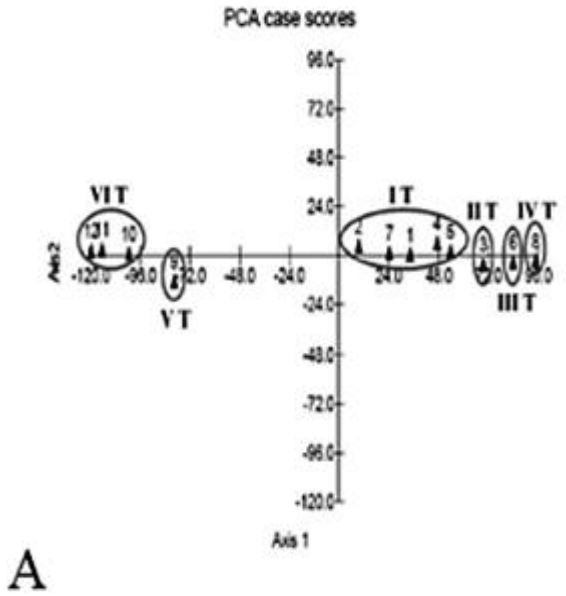
نتایج حاصل از تنوع درون گونه‌ای در *A. tenuifolia*

تحلیل زیستگاه‌های ویژه *A. tenuifolia* با نرم‌افزار Anaphyto با روش FCA بر اساس ترکیب رُستنی ها (به عنوان نشانگر تبارشناختی) به گروه‌بندی زیستگاه‌ها در شش گروه متمایز منجر شد (شکل ۱). گروه I شامل زیستگاه‌های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۷، گروه II شامل زیستگاه ۳، گروه III شامل زیستگاه ۶، گروه IV شامل زیستگاه ۸، گروه V شامل زیستگاه ۹ و گروه VI شامل زیستگاه‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ است.

عوامل بوم شناختی نظیر: ارتفاع، جهت شیب، نوع بستر و ...) در هر زیستگاه ویژه بررسی و با نرم‌افزار MVSP با روش PCA تحلیل گردید (شکل ۲، جدول ۲) که زیستگاه های ویژه این گونه را در شش گروه متمایز قرار داد.



شکل ۱- گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه گونه *A. tenuifolia* بر اساس ترکیب رُستنی‌ها با روش FCA



شکل ۲- گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه *A. tenuifolia* بر اساس عوامل بوم‌شناختی با روش PCA

جدول ۱- مشخصات مناطق جمع‌آوری گونه‌های *A. tenuifolia* (۱۲۱) و بقیه *A. biebersteinii*

کد زیستگاه ویژه	محل جمع‌آوری	تاریخ جمع‌آوری	شماره هرباریومی
۱	همدان، اسدآباد، دو راهی جاده خاکی راهدارخانه	۱۳۸۹/۰۳/۲۰	۲۸۵۳۵
۲	همدان، ۴۰ کیلومتری اسدآباد، روستای تاج‌آباد	۱۳۸۹/۰۳/۲۰	۲۸۵۳۴
۳	همدان، کبودرآهنگ، منطقه سوباشی	۱۳۸۹/۰۳/۱۹	۲۸۵۳۷
۴	همدان، روستای مرویل، دامنه کوه ملوک	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۳۹
۵	همدان، جاده اراک، روستای مرویل، کوه ملوک	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۳۶
۶	همدان، کبودر آهنگ، قلی‌آباد	۱۳۸۹/۰۳/۱۹	۲۸۵۴۱
۷	همدان، جاده اراک، روستای مرویل، داخل باغ	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۳۸
۸	همدان، رزن، کوه‌های بقاطی	۱۳۸۹/۰۳/۱۹	۲۸۵۴۰
۹	سنندج، گردنه مروارید	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۴۴
۱۰	سنندج، کامیاران، بایسپرنه	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۴۳
۱۱	سنندج، نران، نسار گوره	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۴۲
۱۲	سنندج، نران، نسار گوره	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۴۵
۱۳	همدان، گنج‌نامه، کنارجاده، حاشیه باغ	۱۳۸۹/۰۳/۲۲	۲۸۵۵۲
۱۴	همدان، گنج‌نامه، سمت راست آبشار	۱۳۸۹/۰۳/۲۲	۲۸۵۵۱
۱۵	همدان، روستای حیدره	۱۳۸۹/۰۳/۲۱	۲۸۵۵۰
۱۶	همدان، گنج‌نامه، اردوگاه کیوارستان	۱۳۸۹/۰۳/۲۲	۲۸۵۴۹
۱۷	همدان، دره مرادبیک، داخل باغ	۱۳۸۹/۰۳/۲۱	۲۸۵۴۸
۱۸	همدان، کوه الوند، تخت نادر	۱۳۸۹/۰۳/۲۲	۲۸۵۴۷
۱۹	همدان، کوه الوند، تپه میشان	۱۳۸۹/۰۳/۲۲	۲۸۵۴۶
۲۰	سنندج، کامیاران، گردنه مروارید	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۵۳
۲۱	سنندج، دهگلان-قروه، کاظم‌آباد	۱۳۸۹/۰۳/۱۸	۲۸۵۵۴

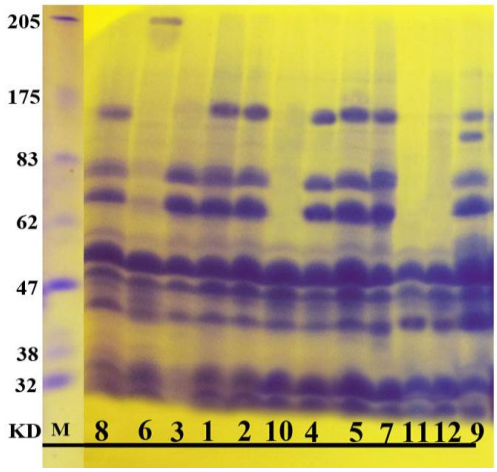
جدول ۲- داده‌های بوم‌شناختی بررسی شده زیستگاه‌های ویژه گونه *A. tenuifolia*

کد زیستگاه ویژه	ارتفاع (متر)	جهت شیب	درصد شیب	نوع بستر
۱	۲۱۸۰	شمال‌شرقی	۴۵	سنگریزه
۲	۲۱۰۰	شرقی	۵۰	شنی
۳	۲۲۹۵	جنوب‌شرقی	۲۰	سنگریزه
۴	۲۲۲۵	شرقی	۵۵	شنی
۵	۲۲۴۵	شمال‌شرقی	۴۵	سنگریزه
۶	۲۳۴۵	جنوب‌غربی	۲۰	واریزه‌ای
۷	۲۱۴۸	شمال‌شرقی	۵۰	سنگریزه
۸	۲۳۸۰	جنوبی	۲۰	واریزه‌ای
۹	۱۸۰۱	شمالی	۳۰	سنگلاخ
۱۰	۱۷۳۲	شمال‌غربی	۸۰	خاک‌درشت
۱۱	۱۶۹۰	جنوب‌غربی	۹۰	سنگی
۱۲	۱۶۷۲	جنوب‌غربی	۹۰	سنگی

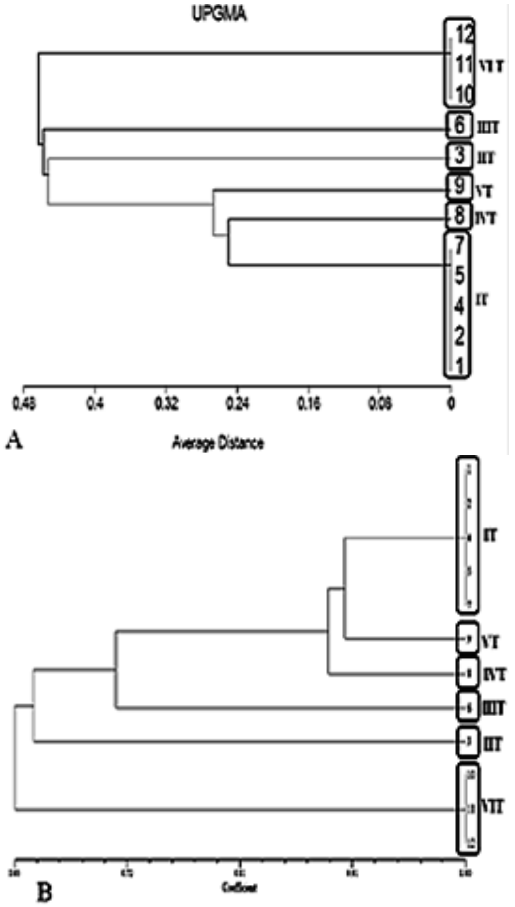
برای تعیین نوع و سطح تنوع درون گونه‌ای از مطالعات الکتروفورزی استفاده شد. بدین منظور، پروتئین‌های بذر ۱۲ جمعیت گونه *A. tenuifoila* بررسی و در مجموع، ۱۳ نوار شناسایی شد (شکل ۳ و جدول ۳). در دندروگرام‌های حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی با دو روش UPGMA و Complete نشان داد که زیستگاه‌های ویژه این گونه در شش گروه قرار گرفته‌اند (شکل ۴). گروه I شامل زیستگاه‌های ۱، ۲، ۴، ۵ و ۷، گروه II شامل زیستگاه ۳، گروه III شامل زیستگاه ۶، گروه IV شامل زیستگاه ۸، گروه V شامل زیستگاه ۹ و گروه VI شامل زیستگاه ۱۰، ۱۱ و ۱۲ است. هر گروه دارای نوارهای خاص خود است که از گروه دیگر متمایز شده است. بنابراین، در بررسی الکتروفورزی گونه *A. tenuifolia* می‌توان شش گروه پروتئینی معرفی کرد. کمترین تعداد نوار در زیستگاه‌های ۳، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ و بیشترین تعداد آن در زیستگاه‌های ۶، ۸ و ۹ مشاهده گردید. نوارهای ۳، ۶، ۷ و ۸ در تمام زیستگاه‌ها مشترک هستند که مربوط به پروتئین‌های ویژه گونه *A. tenuifolia* هستند. نوارهای ۱، ۲، ۴، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ در بین جمعیت‌ها تنوع را نشان می‌دهد.

جدول ۳- داده‌های الکتروفورزی SDS-PAGE در جمعیت‌های بررسی شده *A. tenuifolia*

شماره زیستگاه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
شماره نوار												
۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۴	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰
۱۱	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰
۱۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
۱۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی نوارهای پروتئینی بذر جمعیت های گونه *A. tenuifolia*. اعداد هر ستون نشان‌دهنده کد زیستگاه ویژه است؛ M، نشانگر.

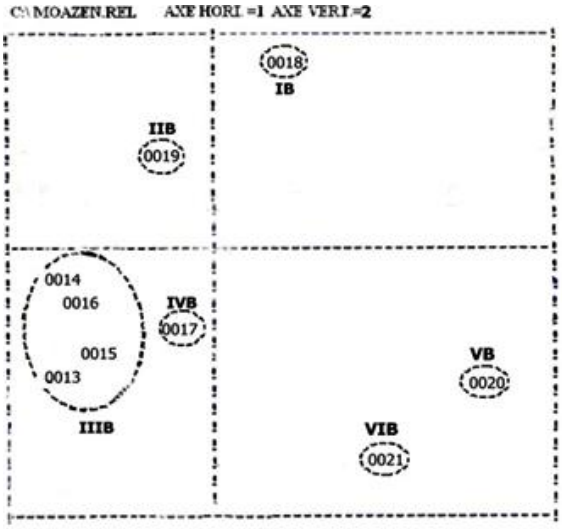


شکل ۴- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی زیستگاه‌های ویژه گونه *A. tenuifolia* با روش UPGMA (A) و Complete (B).

نتایج حاصل از تنوع درون گونه‌ای در *A. biebersteinii*

برای تشخیص وجود تنوع درون گونه‌ای گیاه *A. biebersteinii* با نرم‌افزار Anaphyto و روش FCA داده‌های فلوریستیکی به عنوان نشانگر فلوریستیک تحلیل شد و زیستگاه های ویژه این گونه گیاهی در شش گروه قرار گرفتند (شکل ۵). گروه IB شامل زیستگاه ۱۸، گروه IIB شامل زیستگاه ۱۹، گروه IIIB شامل زیستگاه های ۱۳،۱۵، ۱۴ و ۱۶، گروه IVB شامل زیستگاه ۱۷، گروه VB شامل زیستگاه ۲۰ و گروه VIB شامل زیستگاه ۲۱ هستند. جدول ۴ داده های بوم شناختی بررسی شده زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii* را نشان می دهد. تحلیل داده‌های بوم‌شناختی مطالعه شده زیستگاه‌های ویژه گونه گیاهی *A. biebersteinii* با روش PCA در شکل ۶ نشان داده شده است. با توجه به این شکل مشخص می‌شود که گروه‌بندی حاصل از تحلیل داده‌های بوم‌شناختی مطابق با گروه‌بندی حاصل از تحلیل داده‌های فلوریستیک است. الگوی نوارهای پروتئینی حاصل از مطالعات الکتروفورزی ۹ جمعیت از گونه *A. biebersteinii* در شکل ۷ ارائه شده است.

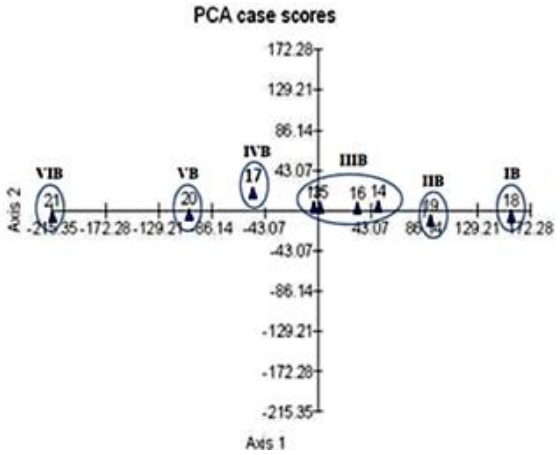
همچنین، نتایج حاصل به صورت کدهای صفر و یک در جدول ۵ و نمودار خوشه ای حاصل از تحلیل داده‌ها با روش UPGMA و Complete در شکل ۸ نمایش داده شده است. زیستگاه‌های این گونه دارای ۱۱ نوار پروتئینی است که کمترین تعداد نوار مربوط به زیستگاه ۱۸ و بیشترین تعداد در جمعیت‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ مشاهده شد. نوارهای شماره ۷ و ۱۴ در تمام زیستگاه‌های ویژه حضور دارند که به عنوان نوارهای اختصاصی این گونه معرفی می شوند. بنابراین، وجود شش گروه پروتئینی برای این گونه گیاهی مشخص شد.



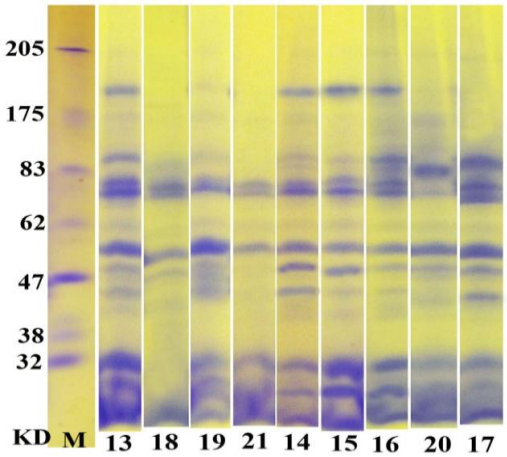
شکل ۵- گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii* بر اساس ترکیب رُستنی‌ها با روش FCA

جدول ۴- داده‌های بوم‌شناختی بررسی شده حاکم بر زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii*

کد زیستگاه ویژه	ارتفاع (متر)	جهت شیب	شیب (درصد)	نوع بستر
۱۳	۲۱۰۰	شرقی	۵۵	خاک مرطوب
۱۴	۲۲۴۸	شرقی	۵۰	خاک مرطوب
۱۵	۲۱۱۴	شرقی	۵۵	خاک مرطوب
۱۶	۲۲۰۰	شرقی	۵۰	خاک مرطوب
۱۷	۲۰۸۹	شرقی	۲۰	خاک معمولی
۱۸	۲۵۵۲	شرقی	۷۰	برون‌زدگی سنگی
۱۹	۲۳۶۷	غربی	۶۵	برون‌زدگی سنگی
۲۰	۱۸۱۴	شمال‌غربی	۴۰	خاک مرطوب
۲۱	۱۵۰۰	شرقی	۴۰	خاک نرم



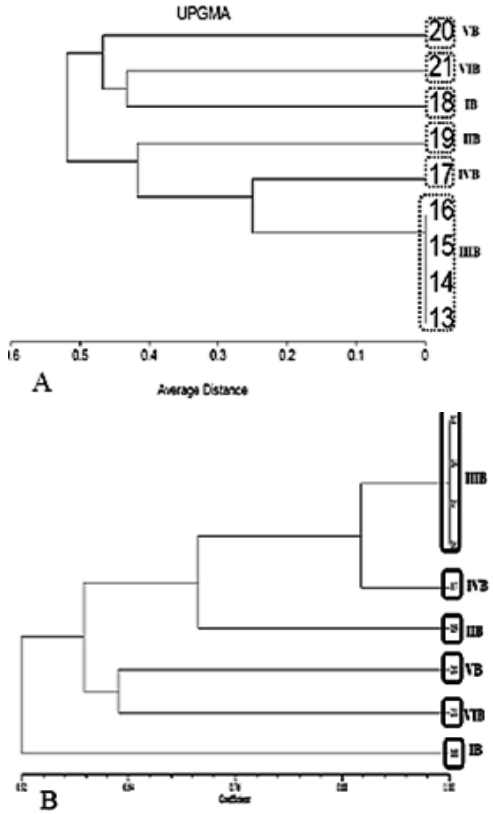
شکل ۶- نتایج حاصل از تحلیل داده‌های بوم‌شناختی زیستگاه‌های ویژه *A. biebersteinii* با روش PCA



شکل ۷- الگوی نوارهای پروتئینی عصاره بذر زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii*

جدول ۵- داده‌های الکتروفورزی SDS-PAGE در جمعیت‌های بررسی شده *A. biebersteinii*

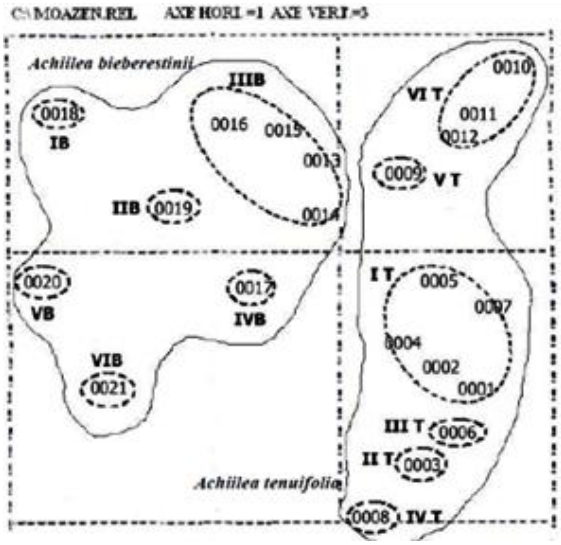
شماره زیستگاه	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
شماره نوار									
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰
۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰
۱۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰
۱۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰



شکل ۸- داده‌های الکتروفورزی حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii* با روش UPGMA (A) و روش Complete (B). نخستین شاخه‌بندی در هر دو تحلیل در سطح فاصله ۰/۵ مشاهده شد.

نتایج حاصل از تنوع بین گونه‌ای در *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii*

تحلیل و بررسی ۲۱ زیستگاه ویژه شامل ۱۲ زیستگاه ویژه برای *A. tenuifolia* و ۹ زیستگاه ویژه برای *A. biebersteinii* بر اساس ترکیب رُستنی‌ها به عنوان نشانگر فلوریستیک با روش FCA، به گروه بندی این زیستگاه ها به دو گروه اصلی مجزا منجر شد. همان طور که مشاهده می‌شود زیستگاه های این دو گونه از نظر ترکیب فلوریستیک از یکدیگر جدا شده‌اند (شکل ۹).



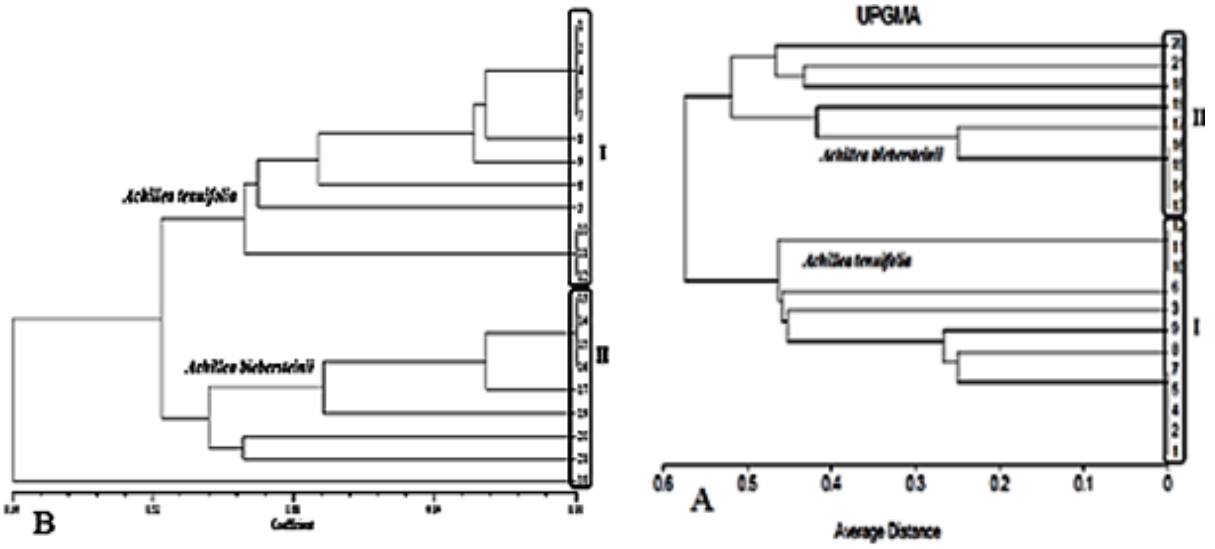
شکل ۹- گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه گونه‌های *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* بر اساس ترکیب رُستنی‌ها با روش FCA

مقایسه عوامل بوم‌شناختی زیستگاه‌های ویژه این دو گونه نشان داد که از نظر ارتفاع، هر دو گونه در ارتفاعات مختلفی رشد می‌کنند و گونه *A. biebersteinii* در محدوده ارتفاع بیشتری نسبت به گونه *A. tenuifolia* دیده می‌شود. *A. tenuifolia* تقریباً در تمامی جهات شیب رویش دارد، در حالی که گونه *A. biebersteinii* در جهت‌های شرقی، غربی و شمال‌غرب می‌روید. از نظر بستر نیز دو گونه از یکدیگر متمایز می‌شوند، گونه *A. biebersteinii* بیشتر در خاک‌های معمولی و مرطوب و به ندرت سنگی حضور دارد، اما گونه *A. tenuifolia* در بسترهای سنگی، سنگلاخی و شنی رویش دارد و از این نظر کاملاً با هم متفاوتند.

برای بررسی تنوع بین گونه‌ای دو گونه *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* نوارهای پروتئینی زیستگاه‌های ویژه هر دو گونه به طور همزمان با نرم‌افزار NTSYS روش Complete و نرم‌افزار MVSP روش UPGMA تحلیل شدند. نوارهای پروتئینی هر دو گونه در جدول ۶ مشاهده می شود. نوار شماره ۷ در تمام زیستگاه‌های بررسی شده دو گونه، مشترک است که نشان‌دهنده پروتئین یکسان در دو گونه و احتمالاً پروتئین اختصاصی جنس *Achillea* است. دندروگرام حاصل از تحلیل داده های الکتروفورزی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. که در آن، گروه I و II به ترتیب نشان‌دهنده زیستگاه‌های ویژه گونه *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* است. بررسی نتایج حاصل از مطالعات الکتروفورزی پروتئین های بذر نیز وجود تنوع بین گونه‌ای را نشان می‌دهد. وجود نوارهای ۴، ۵، ۸، ۱۲ و ۱۳ که خاص زیستگاه‌های ویژه گونه *A. tenuifolia* است و نوارهای ۱۴، ۱۵ و ۱۶ که خاص زیستگاه‌های ویژه گونه *A. biebersteinii* است، این دو گونه را از نظر پروتئین های بذر در دو گروه مجزا قرار داده است. گروه I شامل زیستگاه‌های ویژه *A. tenuifolia* و گروه II شامل زیستگاه‌های ویژه *A. biebersteinii*.

جدول ۶- داده‌های الکتروفورزی SDS-PAGE در جمعیت‌های گونه‌های *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii*

کد زیستگاه / شماره نوار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰
۴	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰
۱۱	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰
۱۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰



شکل ۱۰- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی پروتئین‌های بذر دو گونه *A. tenuifolia* و *A. bieberestinii* با روش UPGMA (A) و روش Complete (B).

بحث

تنوع زیستی که حاصل تنوع عوامل بوم‌شناختی زیستگاه های مختلف است، نشان دهنده توان زیستی هر منطقه است. تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای که به تنوع زیستی منجر می‌شود، منشأ مهم گونه‌زایی است. بر این اساس، تشخیص و تعیین تنوع درون گونه ای و بین گونه ای در راستای شناخت تنوع زیستی دارای اهمیت است (Atri *et al.*, 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد گونه‌هایی که می‌توانند در زیستگاه‌های مختلف با شرایط بوم‌شناختی و فلوریستیک متفاوت حضور داشته باشند، پراکنش وسیعی دارند. بنابراین، حضور این گونه ها در چنین شرایطی نشان دهنده خوپذیری یا تطابق بالای این گیاهان نسبت به شرایط متفاوت بوم‌شناختی است (Fakhre Tabatabaei, 2005). در بررسی گونه‌های گیاهی باید در نظر داشت که هیچ گونه گیاهی در هیچ زیستگاهی به طور تصادفی بقا نمی‌یابد. با توجه به این که هر زیستگاهی دارای ترکیبی از عوامل بوم‌شناختی ویژه خود است، در اثر عوامل بوم شناختی خاص حاکم بر آن، ترکیب گونه ای ویژه‌ای را می‌پذیرد. بنابراین، نقش و اهمیت عوامل بوم‌شناختی بر ترکیب رُستنی‌ها و روابط دو جانبه آنها در یک زیستگاه مشخص می شود. بر این اساس، تنوع عوامل بوم‌شناختی و تأثیر پدیده‌هایی چون برهم‌کنش و جایگزینی عوامل بوم‌شناختی، باعث به وجود آمدن شرایط بوم‌شناختی مختلف و در نتیجه ایجاد زیستگاه‌های متفاوت در یک منطقه می‌شود. پس برای بررسی و پی بردن به وجود تنوع در زیستگاه های متفاوت یک منطقه لازم است، به طور همزمان معیارهای بوم‌شناختی فلوریستیک به کار برده شود (Atri, 2006).

در این بررسی، برای تعیین تنوع درون و بین گونه‌ای در *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* از روش DSS مبتنی بر نشانگر فلوریستیک استفاده شد. سپس، تحلیل داده‌های بوم‌شناختی انجام شد. نتایج حاصل با گروه‌بندی‌های حاصل از تحلیل داده‌های فلوریستیک مقایسه گردید. در نهایت، بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین های ذخیره بذر، وجود تنوع در سطح نوارهای پروتئینی هر یک از گروه های تعیین شده را مشخص نمود. هر سه نشانگر استفاده شده وجود تنوع را در جمعیت های مورد مطالعه نشان دادند. به بیان دقیق‌تر، گروه‌های جمعیتی معرفی شده با نشانگر فلوریستیکی توسط نشانگرهای بوم‌شناختی و الگوی نوارهای پروتئین های ذخیره‌ای بذر نیز تأیید گردید. این تأیید به معنای آن است که گروه‌بندی فلوریستیکی در مواردی به تنهایی می تواند به عنوان روشی کم هزینه و کارآمد برای بررسی وجود تنوع جمعیت‌ها (تنوع درون گونه‌ای) استفاده شود. بنابراین، درستی و میزان دقت روش DSS برای تعیین وجود تنوع و نیز تشخیص نوع و سطح تنوع آشکار می‌گردد. در واقع، این امر منتج از دو مرحله: جمع آوری داده ها و تحلیل آنها با استفاده از نشانگر فلوریستیک (ترکیب رُستنی‌های زیستگاه‌های ویژه) است.

بر اساس نتایج به دست آمده، گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* بر اساس عوامل بوم‌شناختی با روش PCA با گروه‌بندی زیستگاه‌های ویژه این گیاهان بر اساس ترکیب تبارشناختی کاملاً منطبق است. همچنین، مقایسه عوامل بوم شناختی و تبارشناختی دو گونه بررسی شده مؤید وجود تنوع بین گونه‌ای در جمعیت‌های دو گونه است و کاملاً از هم مجزا هستند. نتایج مشابهی توسط محققان پیشین که تنوع درون گونه‌ای *Artemisia incana* L. (Chehregani Rad *et al.*, 2011) را از نظر

تبارشناختی بوم‌شناختی و الکتروفورز پروتئین‌های بذر با روش DSS مطالعه و مقایسه کرده‌اند، به دست آمده است که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. بنابراین، مطالعه گروه های گیاهی می تواند نتایج مفیدی برای شناخت محیط به دست دهد (Asri, 2007) و داده‌های فلوریستیکی که معمولاً از نمونه‌های انتخابی منطقه مورد بررسی جمع آوری می‌شوند، ابزاری پایه برای آگاهی یافتن از تنوع زیستی منطقه مورد مطالعه هستند (Chiarucci and Bonini, 2005).

بررسی و تحلیل الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های بذر نیز به تعیین گروه‌هایی منجر شد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی در جمعیت های مختلف دو گونه است و با گروه‌بندی مبتنی بر نشانگر تبارشناختی بوم‌شناختی مطابقت دارد. به ترتیب ۱۳ و ۱۱ نوار برای گروه‌های تفکیک شده در گونه‌های *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* به دست آمد که بیشتر نوارها به ترتیب در محدوده وزنی ۳۸-۸۳ و ۴۷-۸۳ کیلو دالتون قرار دارند. لذا، می‌توان گفت که وزن مولکولی بیشتر پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در جنس *Achillea* در حدود ۳۸-۸۳ کیلو دالتون است. نوار شماره ۱۳ در زیستگاه ویژه ۶ در گونه *A. tenuifolia* دارای بیشترین وزن مولکولی (۲۰۵ کیلو دالتون) در بین جمعیت های مطالعه شده است. بنابراین، تفاوت در تعداد نوارها و وزن مولکولی گروه های تفکیک شده را می توان به متفاوت بودن شرایط بوم‌شناختی و تبارشناختی زیستگاه‌ها دانست. در این پژوهش، نوارهای انحصاری برای تفکیک جمعیت‌های مختلف گونه *A. tenuifolia* و جمعیت‌های *A. biebersteinii* و همچنین تفکیک بین گونه‌ای دو گونه مورد بررسی شناسایی شدند. بنابراین، می توان بیان کرد که افراد هر گروه، الگوی پروتئینی مشابهی دارند، اما الگوی نوارهای پروتئینی مربوط به گروه‌های مختلف تبارشناختی-اکولوژیک از یکدیگر متفاوت است، به طوری که شش گروه تفکیک شده مربوط به دو گونه، هر کدام شش باند پروتئینی بارز ارائه دادند.

پروتئین‌ها به عنوان محصولات مستقیم ژن‌ها، نشانگرهای مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند (Mirzaei Nadoushan *et al*., 2002). در مورد گیاهان چوبی و غیر چوبی، مطالعه الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر بیشتر برای تفکیک گونه‌ها، ارقام و کولتیوارها صورت گرفته است (Espahbodi *et al*., 2007). در پژوهش حاضر، روش الکتروفورز قادر به جداسازی کامل جمعیت ها از یکدیگر بود و نتایج ارزنده‌ای نیز در زمینه وزن مولکولی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌های مورد بررسی به دست آمد که نشان می‌دهد این روش می تواند ابزاری مفید و قدرتمند برای تفکیک و جدایی تاکسون ها در سطح گونه و پایین‌تر از آن باشد. این نتایج از آن جهت با اهمیت است که در زمینه الکتروفورز پروتئین‌های بذر گونه های مورد بررسی، تاکنون گزارشی منتشر نشده است. اگر چه پژوهش‌های متعدد نشان داده است که مطالعه نیم‌رُخ نوارهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر روشی مناسب برای شناسایی تنوع و اختلافات بین تاکسون های گیاهی است. Crawford (۱۹۹۰) از بررسی جمعیت‌های سه گونه از جنس *Solanum* (*S. americanum*، *S. nigrum* و *S. villosum*) به این نتیجه رسید که جمعیت‌های هر گونه با وجود شباهت زیاد ریخت‌شناسی، از نظر نوارهای پروتئینی تفاوت داشته، ضریب تشابه پایینی را نشان دادند و چنین نتیجه‌گیری شد که الگوی نوارهای پروتئینی در جدایی

جمعیت‌های یک گونه می‌تواند با ارزش باشد. همچنین، تنوع درون گونه‌ای از نظر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در گونه *Chenopodium fremontii* نیز مطالعه شده است و این نتیجه به دست آمده است که تنوع درون‌گونه‌ای پیش از مقایسه بین گونه‌ها بررسی شود. Quike (۱۹۹۳) نشان داد که مطالعه الگوی نیم رخ پروتئینی می تواند ابزاری قدرتمند برای جدا نمودن تاکسون ها در سطوح پایین‌تر از گونه باشد. Vural و همکاران (۲۰۰۹) از پروتئین های ذخیره‌ای بذر با روش الکتروفورز و مطالعات ریخت‌شناسی برای مشخص کردن سطح رده‌بندی *Veronica pusilla* و *V. erciyasdagi* در سطح گونه یا واریته استفاده کردند و *V. erciyasdagi* را به عنوان گونه‌ای مستقل معرفی کردند، در صورتی که پیش از آن، هر دو به عنوان واریته‌های *V. pusilla* در نظر گرفته شده بودند.

جمع‌بندی

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد جمعیت های مختلف یک گونه در شرایط بوم شناختی متفاوت بر اساس سرشت بوم‌شناختی خود دارای پاسخ‌های متفاوت ژنوتیپیک هستند، به طوری که افراد گونه‌های *A. tenuifolia* و *A. biebersteinii* در مناطق بررسی شده با شرایط بوم‌شناختی متفاوت نشان‌دهنده دو گروه پروتئینی مختلف هستند که از نظر نوارهای پروتئینی با یکدیگر اختلاف دارند. وجود تفاوت و تنوع در نوارهای پروتئینی جمعیت‌های مشخص شده در گونه‌های مورد مطالعه مبین وجود تنوع درون گونه‌ای در مناطق مورد بررسی است. همچنین، نتایج حاصل از این سه نوع نشانگر (نشانگرهای فلوریستیکی، بوم‌شناختی و الگوی پروتئینی بذر) نشان می دهد که هر سه نوع نشانگر توانایی تعیین تنوع درون گونه ای در جمعیت‌های مورد بررسی را دارا بوده، می‌توان با توجه به زمان، هزینه، ضرورت‌های پیش روی و امکانات موجود یکی از این سه نوع نشانگر را برای نیل به هدف تحقیقی مناسب انتخاب کرد و از آن جا که روش DSS، با صرف وقت و هزینه کمتر، دسترسی به نتایج متعدد را فراهم می‌سازد، می‌تواند به روشی کارآمد برای بررسی آسان‌تر، سریع‌تر، دقیق‌تر و مطمئن‌تر تعیین تنوع درون گونه‌ای و در مجموع سیستماتیک گیاهی به کار رود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است.

منابع

Asri, Y. (2007) Ecology of plant vegetation. Payam Noor University Press, Tehran, Iran (In Persian).

Atri, M. (2006) Study on interspecific variation using DSS method. 1st National Congress of Plant Systematic, Tehran, Iran (in Persian).

Atri, M., Asgari Nematian, M. and Shahgolzari, M. (2007) Determination and discrimination of intraspecific diversity of *Astragalus gossypinus* by eco-phytosociological method from west of Iran. Pakistan Journal of Biological Sceince 10: 1947-1955.

Bremer, K. (1994) Asteraceae, cladistics and classification. Timber Press, Portland.

Cain, S. A. O. and de Oliveira Castro, G. M. (1959) Manual of vegetation analysis. Harper and Brothers, NewYork.

Chehregani Rad, A., Atri, M. and Yousefi, S. (2011) Study of intraspecific diversity of *Artemisia incana* (L.) Druce in East Azerbaijan. Journal of Cell and Tissue 2: 245-256 (in Persian).

Chiarucci, A. and Bonini, I. (2005) Quantitive floristics as a tool for the assessment of plant diversity in Tuscan forests. Forest ecology and management 212: 160-170.

Crawford, D. J. (1990) Plant molecular systematic and molecular approaches. John Wiley & Sons. New York.

Espahbodi, K., Mirzaii, H. and Dehghan Shooraki, Y. (2007) Investigation of genetic variation of wild service (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz), using morphological analysis of fruits and leaves. Pajouhesh and Sazandegi 72: 44-57 (in Persian).

Fakhre Tabatabaei, S. M. (2005) Study on populations of *Triticum boeoticum* Boiss in Iran. PhD Thesis. University of Tehran, Tehran, Iran (in Persian).

Goli, S. A. H., Rahimmalek, M. and Sayed Tabatabaei, B. E. (2008) Characteristics and fatty acid profile of yarrow (*Achillea tenuifolia*) seed oil. International Journal of Agriculture and Biology 10: 355-357.

Hames, B. D. and Rickwood, D. (1990) Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. 3rd edition. Oxford University Press, New York.

Maassoumi, A. and Assadi, M. (2004) Papilionaceae: The genus *Astragalus* I. Research Institute of Rangelands and Forests, Tehran (in Persian).

Mirzaei Nadoushan, H., Shariat, A. and Asadi Corom, F. (2002) Evaluation of genetic variation in different population of *Haloxylon* spp. using electrophoresis. Iranian Journal of Rangeland Forests Plant Breeding and Genetic Research 7: 99-117 (in Persian).

Mozaffarian, V. (2007) A dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser Publishers, Tehran, Iran.

Quike, D. L. J. (1993) Principles and techniques of contemporary taxonomy. Blackie Academic Professional, London.

Rechinger, K. H. (1986) Artemisia. In: Flora Iranica, Compositae (Eds. Rechinger, K. H. and Hedge, I. C.) 158-214. Akademische Druck and Verlasantalt, Graz.

Tahir, M. H. N., Sadaghat, H. A. and Bashir, S. (2002) Correlation and path coefficient analysis of morphological traits in sunflower. International Journal of Agriculture and Biology 4: 341-344.

Vural, C., Servet, O. and Mikail, A. (2009) New combination in Veronica (Scrophulariaceae) based on morphological characters and the seed storage protein polymorphism. Journal of Systematic and Evolution 47: 168-172.

Watanabe, W. (2002) Index to chromosome numbers in Asteraceae. Retrieved from http://www.asteraceae.cla.kobeu ac.jp/index.html. On: 20 September 2011.

A study of biodiversity using DSS method and seed storage protein comparison of populations in two species of *Achillea* L. in the west of Iran

Hajar Salehi, Abdolkarim Chehragani Rad *, Morteza Atri and Fariba Mohsenzadeh

Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

Intarspecific and interspecific variations are the main reserves of biodiversity and both are important sources of speciation. On this basis, identifing and recognizing the intra and interspecific variations is important in order to recognition of biodiversity. This research was done to study biodiversity and electrophoresis comparison of seed storage proteins in the populations of the two species of the genus *Achillea* in Hamadan and Kurdistan provinces using of the method of determination of special station (DSS). For this purpose, 12 and 9 special stations were selected for the species *A. tenuifolia* and *A. biebresteinii* using the data published in the related flora. Seed storage proteins were extracted and then studied using electrophoresis techniques (SDS-PAGE). In survey of all special stations, 120 plant species were distinguished as associated species. The results of the floristic data for the both species determined six distinctive groups that indicated the existence of intraspecific diversity in this species. The result of analysis of ecological data and seed storage proteins for the two species was in accordance with the floristic data and showed six distinctive groups. The existence of the bands of no. 4, 5, 8, 12 and 13 in the special stations of *A. tenuifolia* and the bands of 14, 15 and 16 in the special stations of *A. biebresteinii* o separated the populations of the species in two quite different and distinctive groups.

Key words: Intraspecific diversity, Interspecific diversity, Protein profile, Asteraceae

* chehregani@basu.ac.ir