ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیتهای مختلف تاغ (*Haloxylon* spp.) با استفاده از الکتروفورز.

حسین میرزایی ندوشن[1]، آناهیتا شریعت[2] و فرشته اسدی کرم[3]

چکیده

بذر بیست و سه پایه از دو گونه تاغ که از نقاط مختلف کشور جمع آوری شده بودند در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. پس از استخراج پروتئینهای ذخیره‌ای بذرهای این ژنوتیپها، با الکتروفورز به روش SDS-PAGE اقدام به بررسی و ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود میان پایه‌های مذکور در سطح ماکروملکولهای پروتئینی گردید. پس از اجرای الکتروفورز و تثبیت و رنگ آمیزی باندهای پروتئینی، حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی مورد توجه و مطالعه قرار گرفت.

اگر چه از نظر باندهای پروتئینی، تفاوت زیادی میان ژنوتیپهای مختلف از هر گونه مشاهده نگردید که بتواند مبنای تفکیک و تمایز بین ژنوتیپها قرار گیرد، ولی تفاوتهای قابل توجهی بین دو گونه مورد مطالعه مشاهده شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز گونه‌های *Haloxylon persicum* و *H. aphyllum* را به خوبی از هم تفکیک نمود.

واژه‌های کلیدی: زرد تاغ، سیاه تاغ، تنوع ژنتیکی، الکتروفورز و روش SDS-PAGE.

---

۱ - عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵

۲ - کارشناس ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵

۳ - دانشجوی دانشگاه پیام نور، تهران.

مقدمه

تاغ دارای گونه‌های ارزشمندی است که در بسیاری از نقاط مرکزی و خشک کویری کشور ما که کمتر گونه‌ای قادر به رویش می‌باشد گسترش یافته‌اند. به عبارت دیگر گونه‌های تاغ، بسیار سازش پذیر هستند. به‌طوری‌که در سخت‌ترین شرایط محیط خشک بیابانی و در مناطقی که درجهٔ حرارت تابستان به ۵۰°C و در زمستان گاهی به حدود ۲۵°C- می‌رسد و در نواحی با بارندگی سالیانه حدود ۱۷۰-۳۰ میلیمتر مستقر شده و رشد مناسبی دارد (امانی و پرویزی، ۱۳۷۵). مهمترین ارزش و کاربرد این گیاه، همان تثبیت شنهای روان و مهار طوفانهای شن و ایجاد فضای سبز در حاشیهٔ کویرهاست. اما پس از استقرار توده‌های تاغ در عرصه‌های عاری از هر نوع پوشش، به دلیل مناسب شدن شرایط محیط بیابان گیاهان یک ساله و در بعضی موارد چند ساله مانند گرامینه‌ها، درمنه، خارشتر و غیره که بیشتر دارای ارزش علوفه‌ای هستند در زیر اشکوب درختان تاغ رشد می‌کنند. از سرشاخه‌های جوان و نیز از بوته‌های خشک این گیاه نیز به عنوان علوفهٔ دام استفاده می‌شود (جوانشیر و همکاران، ۱۳۷۵).

میرزایی ندوشن و همکاران (۱۳۷۹) در گزارشی اهمیت گونه‌های مختلف تاغ و دلایل ضرورت انجام مطالعات وسیع در سطوح مختلف را در مورد این گونه‌ها یاد آور شدند. از جمله مسائلی که باید در گونه‌های مختلف تاغ مورد توجه قرار گیرد، کم و کیف تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های مختلف و امکان به کار گیری این تنوع در اصلاح این گونه‌های ارزشمند می‌باشد. اقدامات به نسبت مناسبی در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع در دست انجام است تا ضمن ارزیابی توانمندی ژنتیکی گونه‌های مختلف تاغ در سطوح مختلف، راهکارهای مناسب اصلاح و گسترش این گونه‌ها را در عرصه‌های بیابانی بدست دهد. در چهارچوب این تحقیقات مطالعه و ارزیابی تنوع ژنتیکی در تعدادی از پایه‌های تاغ از رویشگاههای مختلف کشور با استفاده از الکتروفورز از جمله اقداماتی است که صورت گرفته و شرح مختصری از نتایج آن در این مجموعه خواهد

آمد.

وجود آللهای مختلف از یک ژن در یک جمعیت گیاهی یا حیوانی به مفهوم وجود تنوع ژنتیکی می‌باشد. آللهای مختلف یک ژن اغلب با فراوانیهای متفاوت در جوامع مختلف وجود دارند. از این رو تنوع ژنتیکی در یک گونه گیاهی می‌تواند هم درون یک جمعیت مشاهده شود (به صورت ترکیبهای مختلف آللی در افراد مختلف از جامعه) و هم بین چند جمعیت از آن گونه (به صورت تفاوت در فراوانی آللی بین جوامع). ارزیابی این دو نوع تنوع و استفاده از آنها از هنرهای یک به‌نژادگر گیاهی است.

ارزیابی روابط و خویشاوندی ژنتیکی پایه‌ها و جمعیتهای مختلف گیاهی در اجرای صحیح برنامه های اصلاحی از جمله گامهای اولیه‌ای است که باید برداشته شود. همین‌طور اطلاعات کافی در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیتهای گیاهی از جمله ملزومات یک برنامه اصلاحی موفق می‌باشد. مارکرهای ملکولی یکی از بهترین ابزار موجود در رسیدن به دو هدف فوق الذکر می‌باشند. به همین دلیل تا کنون مارکرهای مختلف ملکولی ابداع و در این راستا به کار گرفته شده‌اند. از جمله این مارکرها علاوه بر روشهای مختلف الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر و ایزو آنزیمها، می‌توان به RFLP[1]، SSR[2]، RAPD[3]، (Williams و همکاران، ۱۹۹۰، Karp و همکاران، ۱۹۹۷) و AFLP[4]، (Vos و همکاران، ۱۹۹۵) اشاره کرد. هریک از این روشها دارای اصول خاص خود بوده و ضمن داشتن پیش نیازهایی مشخص، اطلاعات متنوعی را نیز تولید می‌نمایند. با این حال، هر یک از روشهای RFLP، SSR، RAPD و AFLP به نوعی

1 - Restriction Fragment Length Polymorphism

2 - Simple Sequence Repeats

3 - Random Amplification of Polymorphic DNA

4 - Amplified Fragment Length Polymorphism

زمان بر و پر هزینه بوده و در مراحل مقدماتی طرحهای اصلاحی کاربرد کمتری دارند. به همین منظور از روشهای مختلف الکتروفورز و با استفاده از ایزو آنزیمها یا پروتئینهای ذخیره‌ای بذر در رسیدن به اهداف فوق استفاده گسترده‌ای شده است. از این روش در شناسایی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتهای گیاهی (Masood و همکاران، ۱۹۹۴، Lawrence و Shepherd، ۱۹۸۰، Payne و همکاران، ۱۹۸۳، Shewry و همکاران، ۱۹۸۶، Garvin و Weeden، ۱۹۹۴) و حیوانی (Garcia-Marin و همکاران، Grant، ۱۹۸۷، Nei، ۱۹۸۷، Mork و همکاران، ۱۹۸۵، Ryman و همکاران، ۱۹۸۴) استفاده گسترده‌ای شده است. همچنین از الکتروفورز جهت ارزیابی اثرات تنشهای محیطی نظیر خشکی و شوری بر کم و کیف پروتئینهای ذخیره‌ای بذر و گیاه استفاده قابل توجهی صورت گرفته است (Yen و همکاران، ۱۹۹۷، Saitou و همکاران، ۱۹۹۴، Zhao و همکاران، ۱۹۸۹، Leymarie و همکاران، ۱۹۹۶، Cheng و همکاران، ۱۹۹۳، King و همکاران، ۱۹۹۲).

در این تحقیق نیز با استفاده از روش SDS-PAGE تفاوتهای موجود بین دو گونه مورد نظر و نیز میان ژنوتیپهای مختلف دو گونه مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند. به طور کلی اهداف این تحقیق را می‌توان به شرح زیر بیان نمود:

- شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود میان پایه‌های مختلف در جوامع مختلف تاغ در رویشگاه های مختلف در سطح ملکولی، با استفاده از الکتروفورز.
- شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیک در سطح ملکولی میان جمعیتهای مختلف سیاه تاغ.
- شناسایی و ارزیابی تفاوتهای موجود بین دو گونه مختلف زرد تاغ و سیاه تاغ در سطح ملکولی با استفاده از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر.

مواد و روشها

جمعیتها و گونه های مورد مطالعه

بذر ۲۱ پایه سیاه تاغ (*H. aphyllum*) و دو پایه زرد تاغ (*H. persicum*) که از استانهای مختلف کشور جمع آوری شده بودند جهت استخراج پروتئین و مطالعه تنوع الکتروفورتیک در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱:گونه، استان محل جمع آوری وکد اختصاری پایه‌های مورد مطالعه تاغ.

ردیف	گونه	استان محل جمع آوری	کد اختصاری
۱	*H. persicum*	یزد	HP1
۲	*H. persicum*	یزد	HP2
۳	*H. aphyllum*	یزد	HA1
۴	*H. aphyllum*	یزد	HA2
۵	*H. aphyllum*	یزد	HA3
۶	*H. aphyllum*	یزد	HA4
۷	*H. aphyllum*	یزد	HA5
۸	*H. aphyllum*	یزد	HA6
۹	*H. aphyllum*	یزد	HA7
۱۰	*H. aphyllum*	یزد	HA8
۱۱	*H. aphyllum*	یزد	HA9
۱۲	*H. aphyllum*	سمنان	HA10
۱۳	*H. aphyllum*	سمنان	HA11
۱۴	*H. aphyllum*	سمنان	HA12
۱۵	*H. aphyllum*	سمنان	HA13
۱۶	*H. aphyllum*	سمنان	HA14
۱۷	*H. aphyllum*	سمنان	HA15
۱۸	*H. aphyllum*	سمنان	HA16
۲۹	*H. aphyllum*	سمنان	HA17
۲۰	*H. aphyllum*	سمنان	HA18
۲۱	*H. aphyllum*	سیستان و بلوچستان	HA19
۲۲	*H. aphyllum*	سیستان و بلوچستان	HA20
۲۳	*H. aphyllum*	کرمان	HA21

مطالعات الکتروفورزی

روش SDS-PAGE از الکتروفورز در این تحقیق به کار گرفته شد. استخراج پروتئین، تهیه بافرهای مورد نیاز و ساخت ژل به شرح زیر صورت گرفت:

تهیه بافرهای مورد نیاز

۱ – بافر استخراج: ۲/۹۴ گرم گلیسین را در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و ۵/۶ گرم تریس به آن اضافه گردید. پس از حل شدن تریس، با HCl نرمال pH محلول به ۸/۳ رسانده شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. در ادامه ۱۰ میلی‌لیتر گلیسیرین به محلول اضافه شده و محلول حاصل تا زمان مصرف، دور از نور در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

۲ – بافر نمونه: ۰/۳ گرم تریس، ۰/۸ گرم SDS، ۲ میلی‌لیتر بتا–مرکاپتواتانول و ۲ میلیگرم برومونفل بلو را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و pH محلول با HCl دو نرمال به ۶/۸ رسید. حجم نهایی این محلول با آب مقطر به ۲۰ میلی لیتر رسید.

۳ – بافر الکترود: ۶ گرم تریس، ۲۸/۸ گرم گلیسین و ۲ گرم SDS را در کمتر از ۲ لیتر آب مقطر حل کرده و با مقدار کمی‌اسید کلریدریک، pH ان به ۸/۳ رسید. حجم نهایی این محلول با آب مقطر به ۲ لیتر رسیده و تا زمان مصرف در جای خنک نگهداری گردید.

۴ – بافر ژل جداکننده: ۲۲/۷ گرم تریس، ۰/۵ گرم SDS، و ۰/۱۲۵ میلی لیتر تمد را در ۱۰۰ میل لیتر آب مقطر حل کرده و pH آن را با اسید دو نرمال به ۸/۸ رسانده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۲۵ میلی لیتر رسید. این محلول نیز تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید.

۵ – بافر ژل توده کننده (ژل بالایی): ۰/۳ گرم تریس، ۰/۰۵ میلی لیتر تمد، و ۰/۲ گرم SDS را در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و pH آن به ۶/۸ رسید. حجم محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسیده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید.

تهیه سایر محلولهای مورد نیاز

۱ – محلول ژل جداکننده یا ژل زیرین: ۱/۶ گرم بیس آکریل آمید در مقدار کمی آب مقطر حل شده و ۴۰ گرم آکریل آمید به آن اضافه گردید. حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسید و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید. باید توجه نمود که این محلول در زمان مصرف فاقد حباب هوا باشد. در غیر این صورت باید با استفاده از کاغذ صافی یا دستگاه ایجاد خلاء، حبابها را از محلول خارج نمود.

۲ – محلول ژل توده کننده یا ژل بالایی: ۰/۱۵ گرم بیس آکریل آمید را در مقدار حدود ۱۵ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و ۴ گرم آکریل آمید به آن اضافه گردید. در ادامه با آب مقطر حجم این محلول به ۲۵ میلی لیتر رسانده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید.

۳ – محلول آمونیم پر سولفات: این محلول باید در زمان مصرف و به صورت تازه تهیه شده و دور از نور نگهداری شود. از این رو ۰/۱۴ گرم آمونیم پر سولفات در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و مورد استفاده قرار گرفت.

۴ – محلول رنگ آمیزی ژل: ۰/۱ گرم پودر رنگ خالص کماسی بلو را در ۳۵ میلی لیتر متانول حل کرده، ۷/۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به آن اضافه گردید. حجم نهایی این محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۵ – محلول رنگ بر ژل: ۳۵۰ میلی لیتر متانول با ۷۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شده و با آب مقطر حجم محلول به ۱ لیتر رسید.

۶ – محلول تثبیت کننده ژل:

۲۰ گرم TCA را در مقداری آب مقطر حل کرده و حجم نهایی محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

استخراج پروتئین

مقدار ۰/۳ گرم از بذرهای تاغ که باله‌های آنها جدا شده بودند را در هاون چینی ساییده و در زمان سایش به تدریج بافر استخراج تا حجم نهایی ۲/۵ سی‌سی به پودر حاصل از سایش اضافه گردید. در ادامه، مخلوط حاصل تا سه بار و در هر بار به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. در نهایت پروتئین حاصل (محلول بالایی) به لوله‌های اپندورف منتقل گردیده و تا زمان مصرف در فریزر نگهداری گردیدند.

آماده سازی ژلها

صفحات شیشه‌ای مربوط به دستگاه الکتروفورز پس از شستشوی لازم با فاصله گذارها روی پایه مربوطه نصب گردید. لازم به توضیح است که فاصله گذارها باید به وسیله سیلیکاژل، وازلین یا آگار آغشته شوند تا به طور کامل فواصل بین فاصله گذارها و شیشه‌ها گرفته شده و مانع از خروج محلولهای ژل گردد. در صورت استفاده از آگار می‌توان مقدار کمی آگار را در آب مقطر جوشانده و قبل از سرد شدن در درون فضای بین دو شیشه دستگاه ریخته و با چرخاندن آن، محلول را به کلیه فضاهای احتمالی باقی مانده جهت درزگیری رساند. بعد از این باید اجازه داد تا آگار سرد شده و منجمد گردد. جهت اطمینان از مسدود شدن همه درزهای موجود بین دو شیشه، می‌توان ابتدا مقدار کمی محلول ژل پایینی را بین دو شیشه ریخته و در صورتی که نشت نکرد اقدام به مخلوط کردن محلولهای ژل نمود.

جهت ساخت ژل زیرین، ۱۵ میلی لیتر محلول ژل زیرین یا جداکننده را با ۱۵ میلی لیتر بافر ژل جداکننده مخلوط کرده و ۳۰ میلی‌لیتر آمونیوم پر سولفات به آن اضافه گردید. در ادامه ۲۰ میکرو لیتر تمد به مجموعه فوق اضافه شده و بلافاصله بین دو شیشه دستگاه ریخته شد و به آن فرصت داده شد تا بسته و به ژل تبدیل شود. این محلول باید

تا ارتفاع ۴ تا ۴/۵ سانتیمتری لبه بالایی شیشه دستگاه را پر کند. به منظور پلیمریزاسیون بهتر ژل، بهتر است در معرض نور قرار گیرد و قبل از اینکه این ژل به طور کامل بسته نشده است نباید اقدام به مخلوط کردن مواد ژل زیرین نمود.

جهت ساخت ژل بالایی، ۶ میلی لیتر محلول ژل بالایی را با ۶ میلی لیتر بافر ژل بالایی مخلوط کرده و ۱۲ میلی لیتر آمونیوم پر سولفات و ۱۵ میکرو لیتر تمد به آن اضافه گردید. بلافاصله پس از اضافه شدن تمد، این محلول نیز به روی ژل قبلی ریخته شد و جهت ایجاد چاهکهای بارگیری پروتئین، شانه مخصوص نیز در محل خود در فضای بین دو شیشه قرار داده شده و به آن فرصت داده شد تا ببندد.

آماده سازی عصاره پروتئین

به منظور بارگیری عصاره پروتئین در دستگاه الکتروفورز، ابتدا مقدار ۳۰ میکرو لیتر از عصاره پروتئینی بدست آمده از هر یک از نمونه‌ها را با ۳۰ میکرو لیتر بافر نمونه حاوی SDS و بتا مرکاپتواتانول مخلوط کرده و به مدت سه دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. در ادامه، نمونه‌ها در دمای محیط قرار داده شدند تا سرد شوند.

بارکردن پروتئینها روی ژل

ابتدا جهت جلوگیری از نشت بافر بالایی الکترود، فضای بین شیشه و دستگاه الکتروفورز با سیلیکاژل آغشته گردید. فاصله گذار پایینی شیشه دستگاه حامل ژل، خارج شده و شیشه‌ها با گیره در محل خود در دستگاه ثابت شدند. پس از اطمینان از بسته شدن منافذ عبور بافر از مخزن بالایی به مخزن بافر پایین، مخزن بالا و پایین دستگاه از بافر الکترود پر گردید.

مقدار ۲۵ میکرو لیتر از عصاره پروتئینی هر نمونه در درون یکی از چاهکها تزریق گردید. پس از بارکردن تمامی چاهکها، جریان آب خنک کننده دستگاه وصل شده و

جریان برق نیز با شدت جریان ۸۰ میلی آمپر، وصل گردید. بعد از رسیدن سطح ابتدایی رنگ نمونه‌ها به انتهای ژل، جریان برق دستگاه قطع گردیده و جهت رنگ آمیزی، ژل از بین دو شیشه خارج گردید.

تثبیت و رنگ آمیزی باندها

پس از خارج شدن ژل از دستگاه هیچ‌گونه باندی بر روی ژل قابل مشاهده نیست، از این رو باید باندها تثبیت و رنگ آمیزی می‌شدند. بدین منظور ابتدا جهت تثبیت ژل، در یک تشتک حاوی TCA به مدت ۳۰ دقیقه روی همزنی با دور متوسط قرار گرفت. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه نیز با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت یک شب در فضای آزمایشگاه در محلول رنگ کماسی بلو قرار گرفت.

محلول رنگ تمام ژل را رنگ نمود، از این رو باید فضاهای بین باندها رنگ بری می‌شد تا باندها با وضوح کافی قابل رؤیت گردند. بدین منظور، ژل رنگ شده در محلول رنگ بر قرار داده شد تا فضاهای بین باندها به طور کامل بی رنگ شوند. بعد از رنگ بری می‌توان آن را در آب مقطر و در سردخانه یا یخچال نگهداری نمود.

در ادامه پس از گرفتن عکس از ژلهای تهیه شده به روش مذکور، باندهای حاصل مورد مطالعه و اندازه‌گیری فاصله از مبدا قرار گرفتند.

مطالعه باندهای پروتئینی

ابتدا تعداد مقرهای باندهای موجود در ژلها شناسایی گردیده و حضور یا عدم حضور این باندها در هر نمونه پروتئینی مشخص گردید. حضور باندهای مشترک میان چندین ژنوتیپ می‌تواند موجب تلقی منشأ ژنتیکی مشترک میان آن ژنوتیپها گردد. در ادامه حضور هر باند با عدد یک و عدم حضور آن در آن محل با عدد صفر مشخص گردید. به این ترتیب ماتریس عددی بدست آمد که سطرهای آن را ژنوتیپها و ستونهای

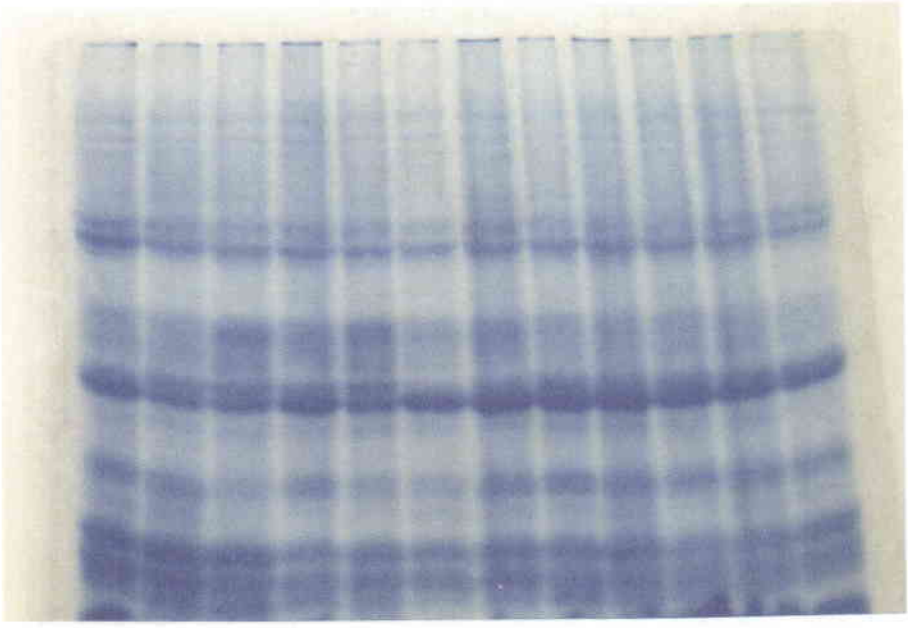
آن را متغیرهای حاصل از محل‌های مختلف باندهای پروتئینی تشکیل می‌دادند. از این ماتریس عددی جهت تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA استفاده گردید. از نرم‌افزار JMP در تجزیه خوشه‌ای استفاده گردید.

نتایج و بحث

لازم به ذکر است که تاکنون مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیتهای مختلف تاغ با استفاده از الکتروفورز در منابع موجود گزارش نگردیده است. اصولا اطلاعات علمی در زمینه مسائل ژنتیک و اصلاح گونه هایی نظیر تاغ در منابع داخلی و بین المللی ناچیز می‌باشد. از این رو یافته‌های این تحقیق می‌تواند مرجع سایر محققان در این زمینه قرار گیرد. ژلهای تهیه شده در شکلهای شماره ۱ و ۲ ارائه گردیده‌اند. اگر باندها به سه ناحیه بالایی، میانی و پائینی تقسیم شوند می‌توان به ترتیب زیر تفاوتهای موجود را مورد توجه قرار داد. در نگاه اول اختلاف زیادی بین باندهای حاصل از ژنوتیپهای مختلف مشاهده نمی‌شود و تعداد باندهای حاصل نیز زیاد می‌باشد. ولی از نظر جزییات، تفاوتهایی میان ژنوتیپهای مختلف قابل مشاهده می‌باشد. از جمله تفاوتهای بارزی است که از نظر تعداد و تراکم باندها بین دو گونه در شکل شماره دو مشاهده می‌گردد. ستونهایی که در شکل شماره دو HP1 و HP2 نام گرفته‌اند متعلق به دو ژنوتیپ از گونه *Haloxylon persicum* می‌باشند که منشأ آنها یزد است و از نظر تراکم باندهای ناحیه میانی و نیز عدم حضور باند مشخص در بخشی از ناحیه پائینی با تمام ژنوتیپهای گونه *H. aphyllum* تفاوت قابل توجهی نشان می‌دهند. از این رو با توجه به این نکته که تشخیص ظاهری دو گونه مورد نظر به طور عملی گاهی مشکل می‌باشد، این معیار می‌تواند در رفع تردید در تمایز دو گونه، کمک شایان توجهی بنماید. لازم به ذکر است که در میان ژنوتیپهای مختلف سیاه تاغ که در شکلها با HA1 تا HA21 نامگذاری شده‌اند در مواردی تنوع و تفاوت جزئی قابل مشاهده می‌باشد. به طوری که در شکل شماره ۲ دیده می‌شود ژنوتیپ HA5 از

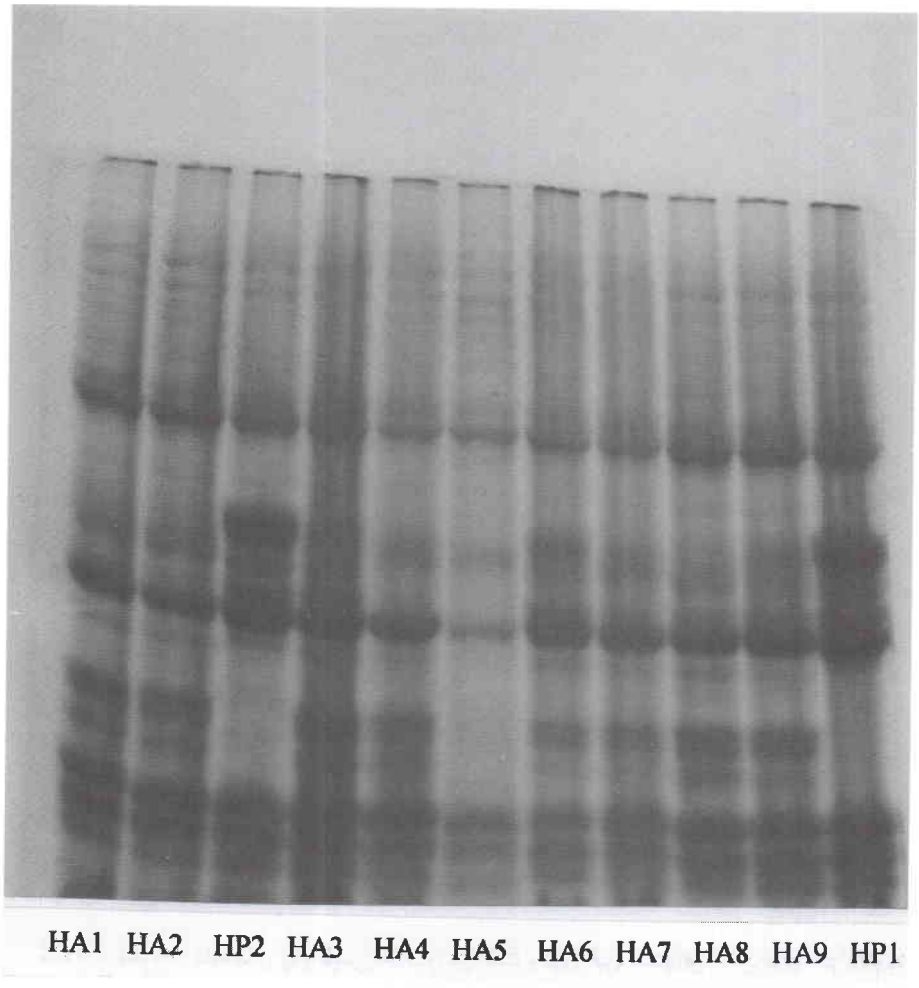
نظر تراکم باندها و نیز عدم حضور مشخص تعدادی باند در ناحیه میانی تفاوتهایی را با سایرین نشان می‌دهد. صرف نظر از این تفاوتهای جزیی میان ژنوتیپهای مختلف این گونه، تفاوت آشکاری میان ژنوتیپهای مختلفی از استانهای یزد، سمنان، کرمان و سیستان و بلوچستان جمع آوری شده‌اند به چشم نمی‌خورد. با توجه به اینکه ژنوتیپهای مورد مطالعه اغلب از توده‌های دست کاشت تاغ نمونه‌گیری شده بودند، این تصور که بذر اولیه این توده‌ها دارای منشأ مشترکی می‌باشند، بجا می‌باشد. از این رو توصیه می‌شود که در تاغ کاریها و گسترش مصنوعی تاغ در عرصه‌های بیابانی کشور از جمعیتهایی با تباعد و تنوع ژنتیکی بیشتر بذرگیری شود.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز در شکل شماره ۳ ارائه شده‌اند. در این تجزیه آماری نیز دو ژنوتیپ زرد تاغ مورد مطالعه در نزدیکی هم و در یک دسته قرار گرفته‌اند. لازم به ذکر است که در این بخش از تجزیه داده‌ها، تنها حضور یا عدم حضور باندها ملاک نمره دهی به مقرهای باندی مورد نظر قرار گرفتند. در حالی که بیشترین تفاوت بین دو گونه از نظر تراکم باندها به ویژه در ناحیه میانی بود که در این تجزیه لحاظ نگردید. نکته قابل توجه دیگر اینکه بیشتر ژنوتیپهای جمع آوری شده از استان یزد در دندروگرام در کنار یکدیگر و در دستجات مجاور قرار گرفته‌اند که حاکی از اثر نسبی محیط بر جمعیتها می‌باشد.

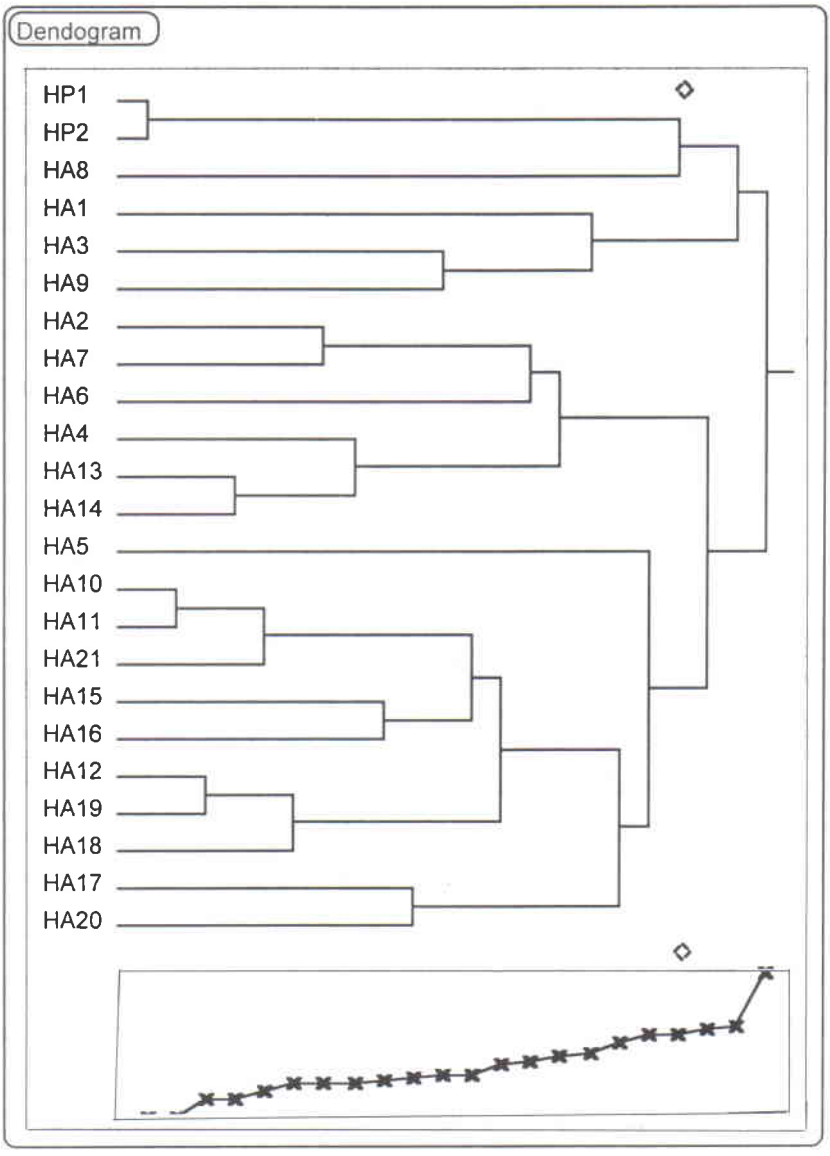


HA10 HA11 HA12 HA13 HA14 HA15 HA16 HA17 HA18 HA19 HA20 HA21

شکل شماره ۱: باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر تاغ به روش SDS-PAGE در ۱۲ ژنوتیپ مختلف. کدهای ارائه شده در ذیل باندها در جدول شماره یک معرفی شده‌اند.



شکل شماره ۲: باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر تاغ به روش SDS-PAGE در ۱۱ ژنوتیپ مختلف. کدهای ارائه شده در ذیل باندها در جدول شماره یک معرفی شده‌اند.



شکل شماره ۳: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی ژنوتیپهای مختلف دوگونه تاغ، به روش UPGMA. پلات پایین دندروگرام برای هر کلاستر یا خوشه دارای یک علامت می‌باشد و فاصله میان علامتها و انحنای خطوط بین علامتها بیانگر فاصله میان ژنوتیپها می‌باشد.

منابع

امانی، منوچهر، آذرنوش پرویزی ۱۳۷۵. جنگلشناسی و پرورش جنگل تاغ (سیلویکولتور). مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

جوانشیر، کریم، حسین دستمالچی، عقیل عمارتی ۱۳۷۵. بررسی اکولوژیک و اکوفیزیولوژیک گونه‌های تاغ، پده و گز در بیابانها ایران - مجله بیابان شماره‌های ۲، ۳ و ۴. صفحات ۸۱-۶۷.

میرزایی ندوشن، حسین، فرشته اسدی کرم، و علی میر حسینی، ۱۳۷۹. بررسی عوامل مؤثر بر جوانه زنی بذر تاغ (*Haloxylon* spp.). در: تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، شماره ۴: ۲۳-۲.

Cheng, Y., J. Weng, C.P. Joshi, and H.T. Nguyen, 1993. Dehydration stress-induced changes in translatable RNAs in sorghum. Crop Science, 33: 1397-1400.

Garcia-Marin, J.L., P.E. Jorde, N. Ryman, F. Utter, and C. Pla, 1991. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. Aquaculture, 95: 235-249.

Garvin, D.F., and N.F. Weeden, 1994. Isozyme evidence supporting a single geographic origin for domesticated tepary bean. Crop Science, 34: 1390-1395.

Grant, W.S., 1987. Genetic divergence between congeneric Atlantic and Pacific Ocean fishes. In: Ryman, N., and F. Utter, Population Genetics and Fishery Management. 225-246.

Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad, and T. Hodgkin, 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies; in IPGRI Technical Bulletin, No. 2, Rome Italy.

King, S.W., R.A. Vierling, and H.T. Nguyen, 1992. Changes in mRNA species during drought stress in winter wheat. Crop Science, 32: 822-825.

Lawrence, G.L. and K.W. Shepherd, 1980. Variation in glutenin protein subunits of wheat. Australian Journal of Biology, 33: 221-233.

Leymarie, J., C. Damerval, L. Marcotte, V. Combes, and N. Vartanian, 1996. Two-dimensional protein patterns of Arabidopsis wild-type and auxin insensitive mutants, axr1, axr2, reveal interactions between drought and hormonal responses. Plant and Cell Physiology, 37: 966-975.

Masood, M.S., K. Oikuno and R. Anwar, 1994. Inter and Intra-specific variation in SDS-PAGE electrophoregrams of total seed protein in wheat, barley, and their wild relatives. In: A.A. Jaradat, Genetic resources of cereals and their utilization in Pakistan, Proceeding of a national seminar, Islamabad, 125-135.

Mork, J., N. Ryman, G. Stahl, F. Utter, and G. Sundnes, 1985. Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. Canadian Journal of Fish Aquatory Science, 42: 1580-1587.

Nei, M., 1987. Genetic distance and molecular phylogeny. In: Ryman, N., and F. Utter, Population Genetics and Fishery Management. 193-223

Payne, P.I., L.M. Holt, R.D. Thompson, D. Bartles, N.P. Harberd, P.A. Harris, and C.N. Law, 1983. The high molecular weight subunits of glutenins classica genetic molecular genetics and the relationship to bread making quality. Proceeding of the 6th International wheat genetics symposium, Kyoto, Japan, 827-834.

Ryman, N., U. Lagercrantz, L. Andersson, R. Chakraborty, and R. Rosenberg, 1984. Lack of correspondence between genetic and

morphologic variability patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus*). Heredity, 53: 687-704.

Saitou, K., W. Agata, Y. Masui, M. Asakura, and F. Kubota, 1994. Isoforms of NADP-malic enzyme from *Mesembryanthemum crystallinum* L. that are involved in C3 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism. Plant and Cell Physiology, 35: 1165-1171.

Shewry, P.R., A.S. Tatham, J. Forde, M. Kreis, and B.J. Miflin, 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassesment. Cereals Science, 4: 97-106.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Freijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau, 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting; Nucleic Acids Res., 23: 4407-4414.

Williams, G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey, 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers,. Nucleic Acids Res., 18: 6531-6535.

Yen, H.E., D. Zhang, J. H. Lin, G.E. Edwards, and M.S.B. Ku, 1997. Salt-induced changes in protein composition in light-grown callus of Mesembryanthemum crystallinum. Physiologia Plantarum, 101: 526-532.

Zhao Z.F., J.W. Heyser, and H.J. Bohnert, 1989. Gene expression in suspension culture cells of the halophyte Distichlis spicata during adaptation to high salt. Plant and Cell Physiology, 30: 861-867.

Evaluation of existing genetic variation in different populations of *Haloxylon* spp. using electrophoresis technique

Mirzaie-Nodoushan[1], *H., Shariat*[1], *A., and Asadi-Corom*[2], *F.*

Abstract

Seed collected from twenty three single trees from different parts of the country were used in this study. After seed storage protein extraction, SDS-PAGE method of electrophoresis was used to investigate existing genetic variation between the mentioned genotypes, in protein's macromolecule level. Performing electrophoresis, fixing and staining the electrophoresis gel and protein bands, presence and absence of the particular bands along the gel was studied.

Although, significant differences were not observed between the genotypes of each species based on the protein bands to be used for genotype classification within the species, but significant differences were observed between the two species, *Haloxylon persicum, H. aphyllum*.

Key Words: *Haloxylon persicum, H. aphyllum,* Genetic variation, Electrophoresis, and SDS-PAGE method.

1 - Research Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran, Iran.

2 - Graduate student, Payam Noor University, Tehran, Iran.