"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد هفتم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
(ص ۱۵-۱)

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 7, No.: 2, Autumn and Winter 2018
(pp: 1-15)
DOI: 10.22034/ijsst.2019.107982.1002

ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف شمشاد خزری برای حفاظت *ex situ* در بانک ژن منابع طبیعی ایران

پروین صالحی شانجانی[1*]، حمیده جوادی[1]، لیلا رسول‌زاده[2]، محمود امیرخانی[2]

۱. عضو هیات علمی، بانک ژن منابع طبیعی ایران، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.
۲. کارشناس ، بانک ژن منابع طبیعی ایران، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸)

چکیده

ارزیابی تعداد جمعیت لازم و کافی در برنامه جمع‌آوری بذر هر گونه گیاهی، نیازمند اطلاعات دقیقی در مورد تنوع و تمایز ژنتیکی گونه است. در این پژوهش تنوع و تمایز ژنتیکی ۱۱ جمعیت شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark) توسط ویژگی‌های مورفولوژی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مطالعه شد. نتایج نشان دادند که ویژگی‌های مورفولوژیکی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌های مورد مطالعه تنوع قابل ملاحظه‌ای داشته ولی تنوع آنها از الگوی جغرافیایی تبعیت نمی‌کنند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای UPGMA با استفاده از هر دو نشانگر مورفولوژی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، نشان داد جمعیت‌های دور از هم سمندکیش (گیلان) و بندرگز (گلستان) در یک گروه قرار گرفتند و برعکس جمعیت‌های مجاور نمک‌آبرود۱ و ۲ در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. این نتایج می‌تواند ناشی از پدیده قطعه قطعه شدن جمعیت‌های شمشاد باشد. بدین ترتیب جمع‌آوری انتخابی بذر، از بعضی جمعیت‌ها می‌تواند باعث از دست رفتن برخی ژن‌ها شده و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را تغییر دهد که نشان دهنده اهمیت جمع‌آوری بذر از اکوتیپ‌های محلی است. به عبارت دیگر جمع‌آوری بذر صرفاً از یک جمعیت در هر منطقه اکوجغرافیایی کافی نیست و غالبا جمعیت‌هایی که حتی در یک منطقه اکوجغرافیایی قراردارند ممکن است ساختار ژنتیکی متفاوتی داشته باشند. این داده‌ها نشان می‌دهد که بانک ژن منابع طبیعی ایران برای جلوگیری از فرسایش ژنتیکی شمشاد، می‌بایست از تعداد جمعیت بیشتری در هر منطقه اکوجغرافیایی بذر جمع‌آوری نماید.

کلمات کلیدی: بانک ژن، تنوع ژنتیکی، جمع‌آوری بذر، شمشاد

Assessment of genetic diversity of different Hircanian Boxwood populations for ex situ conservation in Natural Resources Gene Bank of Iran

P. Salehi Shanjani[1*], H. Javadi[1], L. Rasoulzadeh[2], M. Amirkhani[2]

1. Researcher, Natural Resources Gene Bank, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
2. B. Sc., Natural Resources Gene Bank, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
(Received: Oct. 15, 2016 – Accepted: Nov. 29, 2017)

Abstract

Evaluation of necessary and sufficient population number of a species in seed collection program requires knowledge of genetic diversity and differentiation. This study evaluated seed morphology and seed storage proteins profiles of 11 boxwood (*Buxus hyrcana*) populations, to determine the extent of genetic diversity. Seed morphology and seed storage proteins analysis of variance showed considerable variation with no geographical clines among populations. Hierarchical cluster analysis (UPGMA) of both markers showed that populations sampled from far-west (samandkish, Gilan province) and far-East (Bandargaz, Glestan province) of Hyrcanian forests were grouped together, however neighbor populations, Namakabrud1 and 2, grouped separately. The results could be due to the phenomenon of fragmentation of boxwood populations. Therefore seed collection from selective populations can lead to the loss of some genes and change genetic structure, indicating the importance of collecting seeds from local ecotypes. In other word seed collection only from a population in each Eco-geoghraphial region is not sufficient and often the populations that located in a same Eco-geoghraphial region may have different genetic structure. These results showed that to avoid genetic erosion of boxwood germplasm, Natural Resources Gene Bank of Iran needs to collect seed from more populations in each Eco-geographical region.

Key words: boxwood, gene bank, genetic diversity, seed collection.

* Email: psalehi1@gmail.com

مقدمه

جنگل مهمترین ذخیره‌گاه تنوع گونه‌های چوبی روی کره زمین است. پوشش گیاهی جنگل‌ها بقاء گستره وسیعی از موجودات را حمایت می‌نمایند. درختان به علت طول عمر زیاد، دگرگشنی، ناهمگونی زیاد و گسترش در محیط‌های بسیار متغیر، مکانیسم‌های پیچیده‌ای را توسعه داده‌اند تا بتوانند گوناگونی درون گونه‌ای را در سطح بالایی حفظ نمایند. تنوع در جنگل‌ها و گوناگونی ژنتیکی در درختان و درختچه‌ها برای سازگاری گونه‌ها به شرایط محیطی ضروری می‌باشند. توانایی درختان جنگلی برای حمایت از عملکرد اکوسیستم و تأمین کالاها و خدمات مورد نیاز انسان، وابسته به حفاظت از تنوع زیستی و مدیریت صحیح منابع ژنتیکی جنگل است (FAO, 2001).

اولین گام در طراحی یک برنامه حفاظتی تعیین اهدافی است که به واسطه آن میزان بذری که باید جمع‌آوری شود و سطحی از تنوع ژنتیکی که باید حفاظت شود مشخص می‌شود. اطلاعات مورد نیاز برای جمع‌آوری مؤثر بذر در هر دو برنامه‌های حفاظت در عرصه (*in situ*) وخارج از عرصه (*ex situ*) یکسان است. اگرچه در هر دو روش، حفظ بیشترین تنوع ژنتیکی، اساس برنامه را تشکیل میدهد ولی در نهایت محدودیت‌های ساختاری و مالی تعیین‌کننده سطح حفاظت هستند (Amaral *et al.*, 2004; Van der Niet *et al.*, 2014).

برای ارائه استراتژی‌های جمع‌آوری بذر در حفاظت *ex situ*، تعیین گستره پراکنش و شناسایی جمعیت‌ها و توده‌های گونه هدف، بسیار مهم است. زیرا با جمع‌آوری بذر از جمعیت‌ها و توده‌های مختلف، می‌توان امکان احیای جمعیت‌های جنگلی محلی را که تخریب شده‌اند و یا برای حفاظت *in situ* در نظر گرفته شده‌اند را بالا برد. زیرا مهمترین اصل در عملیات جنگلکاری استفاده از توده‌های محلی است (Amaral *et al.*, 2004). در جمع‌آوری بذر از گونه‌های درختی، لازم است در انتخاب محل و تعداد جمعیتی که می‌بایست در برنامه حفاظت قرار گیرند و نیز انتخاب درختانی که ارجحیت بیشتری برای بذرگیری دارند دقت کافی به عمل آید. وجود اطلاعاتی شامل ۱) تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌ها، ۲) ارزش بالقوه آنها (برای مثال جمعیت‌هایی که از ویژگی متمایزی برخوردار هستند)، ۳) سطح آسیب‌پذیری جمعیت‌ها و نیز ۴) امکانات و محدودیت‌های جمع‌آوری و ذخیره بذر، برای اجرای صحیح برنامه جمع‌آوری بذر بسیار کارآمد است (Amaral *et al.*, 2004).

شمشاد خزری با نام علمی *Buxus hyrcana* Pojark درخت/درختچه‌ای همیشه سبز در جنگل‌های هیرکانی شمال ایران است که نقش مهمی در حفظ اکوسیستم بازی می‌کند. این گونه با ارزش در فهرست گونه‌های گیاهی در خطر انقراض اتحادیه بین‌المللی حفظ طبیعت (IUCN) قرار دارد. مشاهدات حاکی از بروز خشکیدگی این درخت در بسیاری از رویشگاهای آن در اثر حمله قارچ عامل بلایت *Cylindrocladium buxicola* است. تا کنون حفاظت از شمشاد خزری در مناطق حفاظت شده (به صورت حفاظت *in situ*) صورت می‌گرفته است. ولی خشکیدگی گسترده شمشاد، ضرورت حفاظت *ex situ* این گونه را توجیه می‌نماید. نگهداری بلند مدت در دمای ۱۸°C- به عنوان روش کارامدی در حفاظت از گونه‌های شمشاد (ازجمله گونه درخطر انقراض شمشاد *B. colchica*) گزارش شده است (Mikatadze-Pantsulaia *et al.*, 2013).

برای حفاظت از شمشاد، بانک ژن منابع طبیعی ایران اقدام به جمع‌آوری و حفاظت از بذر این گونه با ارزش نموده است. مهمترین چالش بانک ژن منابع طبیعی ایران برای حفاظت از بیشترین میزان تنوع ژنتیکی شمشاد، تعداد جمعیتی است که می‌بایست در برنامه جمع‌آوری بذر قرار گیرد. ارزیابی تعداد جمعیت لازم و کافی برنامه‌های حفاظت *ex situ*، نیازمند اطلاعاتی در مورد تنوع و تمایز ژنتیکی است. در حدود سه دهه است که از نشانگرهای ژنتیکی خنثی و سازگاری برای طراحی برنامه‌های حفاظت *in situ* و *ex situ* استفاده می‌شود (Sjogren and Wyoni, 1994; Petit *et al.*, 1998; Ritland *et al.*, 2002; Austerlitz *et al.*, 2004; Cavers *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2007; Ohsawa *et al.*, 2007;

(Huang *etal*., 2008; Miyamoto *et al*., 2008; این نتایج نشان داده‌اند که جمع‌آوری بذر صرفاً از جمعیت‌هایی که در مناطق اکوجغرافیایی مختلف قرار داشته و تاریخچه تکاملی متفاوتی دارند (Brown, 1989a, b)، در برخی از گونه‌های گیاهی کافی است. در این پژوهش برای کسب اطلاعات مورد نیاز در برنامه‌های حفاظتی *ex situ* شمشاد، اقدام به مطالعه ۱۱ جمعیت شمشاد در طول گستره آن در جنگل‌های خزری توسط ویژگی‌های مورفولوژیکی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر شد. جمعیت‌ها به گونه‌ای انتخاب شدند که تا حد امکان به این سوال پاسخ داده شود که آیا جمع‌آوری بذر صرفاً از جمعیت‌هایی که در مناطق اکوجغرافیایی مختلف قرار دارند حفاظت از این گونه در خطر را تامین می‌نماید؟

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از بذر ۱۱ جمعیت شمشاد برای مطالعه مورفولوژی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استفاده شد. جدول ۱ منشاء و مشخصات جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به خشکیدگی شمشاد در بسیاری از رویشگاهها، انتخاب محل جمع‌آوری بسیار دشوار بود، زیرا می‌بایست بذر از جمعیت‌هایی جمع‌آوری شود که حداقل ۵۰ درخت سالم دارای بذر، در محل موجود باشد تا نمونه بذر جمع‌آوری شده نماینده ساختار ژنتیکی جمعیت باشد. بعلاوه نه‌تنها از مناطق جغرافیایی مختلف، بلکه در برخی مناطق از توده‌ها و جمعیت‌های مجاور نیز نمونه‌برداری شد.

با کاشت بذور در گلدان و گذراندن فصول گرم و سرد متوالی، خواب‌شکنی و جوانه‌زنی بذور انجام گردید. جوانه زنی بذور ۳±۹۰ درصد برآورد گردید که تفاوت در میان جمعیت‌ها مشاهده نشد. ویژگی‌های مورفولوژی بذر شامل وزن بذر (g)، طول بذر (mm)، قطر بزرگ (mm) و قطر کوچک (mm)، در قالب طرح کامل تصادفی در ۱۱ جمعیت و ۳۰ تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. داده‌های بدست آمده هر جمعیت به‌صورت جداگانه تجزیه واریانس یک‌طرفه شد و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. برای تعیین روابط درونی بین صفات و گروه‌بندی صفات از تجزیه به مولفه‌های اصلی و جهت مشخص کردن فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی از تجزیه خوشه‌ای به روش وارد (ward) از نرم‌افزار Minitab 16 استفاده گردید.

الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای ۲۲۰ بذر از ۱۱ جمعیت مورد مطالعه (هر جمعیت ۲۰ بذر) به روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید دودسیل سولفات) انجام شد (Laemmli, 1970). بذرهای هر جمعیت به صورت جداگانه با نسبت یک بذر به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج پس از جدا نمودن پوسته بذر، همگن شدند. اطلاعات حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای به صورت نوارهای مجزای پروتئینی برای هر ژنوتیپ روی ژل پلی‌اکریل آمید نمایان شد. برای تعیین وزن مولکولی نوارهای پروتئینی از نشانگر پروتئینی با وزن‌های مولکولی ۲۵، ۴۶، ۷۷، ۱۰۰ و ۱۲۵ کیلودالتون استفاده شد.

جایگاه هر یک از نوارها بر روی ژل از طریق حرکت نسبی آنها مشخص و به صورت اعداد کمی بیان گردید. بر اساس وجود (عدد یک) یا عدم وجود هر نوار(عدد صفر) در فواصل مختلف، نسبت به تشکیل ماتریس داده‌ها اقدام شد. فراوانی نوارها، نسبت تعداد نوارهای پلی‌مورف به تعداد کل نوارها، و پلی‌مورفیسم نوارها با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2004) محاسبه شد. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان گروهی توسط آزمون واریانس ملکولی (AMOVA؛ Excoffier *et al.*, 1992) و برنامه نرم‌افزاری ARLEQUIN 1.1 (Schnieder *et al*., 1997؛) تعیین شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون permutation (Excoffier *et a.* ,1992) مطالعه شد. فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها بر اساس معادله Nei (Nei, 1978) برآورد شد. از آزمون Neighbor-Joining با نرم‌افزار MEGA (Tamura *et al*., 2007) و روش تجزیه به مولفه‌های اصلی (Gower, 1966) برای تفسیر ماتریکس فاصله ژنتیکی استفاده شد. برای بررسی رابطه بین عوامل ژنتیکی و

اکولوژیکی از نرم‌افزار SPSS و معادله کارل - پیرسون استفاده گردید. همچنین بررسی همبستگی فاصله صفات با یکدیگر از تست مانتل (Mantel, 1967) نیز استفاده گردید.

نتایج و بحث

مورفولوژی بذر

نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که صفات وزن بذر، طول بذر، قطر بزرگ و قطر کوچک بذر در بین جمعیت‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری (سطح احتمال ۵٪ و۱٪) نشان دادند (جدول ۲). به منظور ارزیابی صفات جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از میانگین تصحیح شده جمعیت‌ها، مقایسه میانگین با روش دانکن در سطح ۵٪ انجام شد (جدول ۳). جمعیت توسکاتک و نمک‌آبرود۲؛ دارای بذر سنگین‌تر و بزرگ‌تر و جمعیت کلارآباد بذر سبک‌تر و کوچکتری می‌باشند.

ضرایب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی بذر در ۱۱ جمعیت شمشاد نشان داد که وزن بذر با صفات ارتفاع بذر، قطر بزرگ و قطر کوچک همبستگی مثبت و معنی داری در سطح ۵٪ داشتند (جدول ۴). ضرایب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی بذر و ویژگی‌های جغرافیایی ۱۱ جمعیت شمشاد معنی دار نشد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ۱۱ جمعیت شمشاد بر اساس صفات مورفولوژیکی بذر نشان دادند که با برش دندروگرام در فاصله ۴/۲۲ واحد، جمعیت‌های شمشاد در چهارگروه مجزا قرار گرفتند (شکل ۱).

جدول ۱- منشأ و مشخصات جمعیت‌های *B. hyrcana* مورد بررسی

Table 1- Location characteristics of studied *B. hyrcana* populations

نام جمعیت Population	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)	عرض جغرافیایی Latitude (E)	طول جغرافیایی Longitude (N)
کلارآباد[1] Celarabad[1]	54	36° 42'	51° 13'
چیسا پارک[1] Chisapark[1]	55	36° 40'	51° 08'
نمک‌آبرود[1] Namakabrood1[1]	56	36° 41'	51° 17'
نمک‌آبرود۲[1] Namakabrood2[1]	56	36° 41'	51° 17'
پاسند[1] Pasand[1]	57	36° 43'	51° 37'
سی سنگان۱[1] Sisangan1[1]	58	36° 34'	51° 47'
سی سنگان۲[1] Sisangan2[1]	59	36° 34'	51° 47'
توسکا تک[1] Tuscatec[1]	60	36° 34'	51° 44'
سمند کیش[2] Samandkish[2]	4	36° 39'	51° 58'
پیر هرات[2] Pireharat[2]	4	36° 40'	51° 57'
بندرگز[3] Bandargaz[3]	174	36° 42'	51° 52'

[1] استان مازندران؛ [2] استان گیلان؛ [3] استان گلستان

[1] Province Mazandaran; [2] Province Guilan; [3] Province Golestan

جدول ۲ - تجزیه واریانس میانگین مربعات برای صفات مورد بررسی بذر در ۱۱ جمعیت *B. hyrcana*

Table 2- Mean square for analysis of variance for the studied characteristics in 11 populations of *B. hyrcana*

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی d.f.	وزن بذر Seed weight	طول بذر Seed length	قطر بزرگ Big diameter	قطر کوچک Small diameter
جمعیت Pop.	10	0.0001*	0.021**	0.0036**	0.0043**
تکرار Rep.	29	0.000008	0.0021	0.0003	0.0002
خطا Err.	290	0.000005	0.0023	0.00026	0.00028
ضریب تغییرات CV		14.344	8.2	7.271	7.659

* و **: معنی داری به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

*, **: Significant at 5% and 1% level of probability, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورفولوژی بذر در ۱۱ جمعیت *B. hyrcana*

Table 3- Mean comparison of seed morphological characteristics in 11 populations of *B. hyrcana*.

نام جمعیت Population	وزن بذر Seed weight (gr)	طول بذر Seed length (mm)	قطر بزرگ Big diameter (mm)	قطر کوچک Small diameter (mm)
کلارآباد Celarabad	**0.11d**	**5.75c**	**2.07c**	**1.72d**
چیسا پارک Chisapark	0.015c	5.74c	2.16b	1.91c
نمک‌آبرود۱ Namakabrood1	0.015c	5.63d	2.32a	2.09b
نمک‌آبرود۲ Namakabrood2	0.019a	6.44a	2.24b	2.03b
پاسند Pasand	0.015c	5.81c	2.26b	2.07b
سی سنگان۱ Sisangan1	0.018b	5.78c	2.24b	2.09b
سی سنگان۲ Sisangan2	0.016c	5.58d	2.28b	2.06b
توسکا تک Tuscatec	**0.02a**	**6.24a**	**2.40a**	**2.15a**
سمند کیش Samandkish	0.015c	6.07b	2.18b	1.95c
پیر هرات Pireharat	0.018b	6.07b	2.17b	1.92c
بندرگز Bandargaz	0.015c	6.05b	2.19b	1.98c

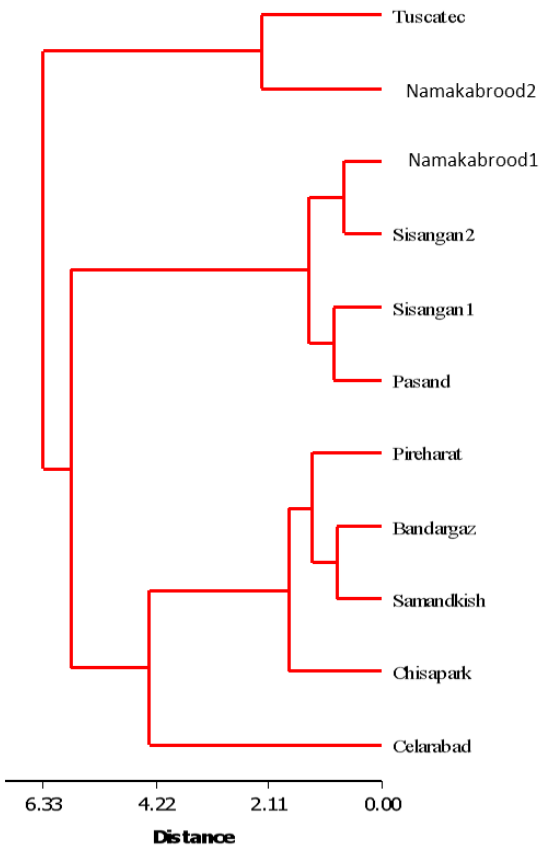
جدول ۴- ضرایب همبستگی بین صفات مورفولوژیکی در ۱۱ جمعیت شمشاد بر اساس میانگین داده‌ها

Table 4- Correlation coefficients among the studied characteristics in 11 populations of *B. hyrcana*

	وزن بذر Seed weight	ارتفاع بذر Seed length	قطر بزرگ Big diameter
ارتفاع بذر Seed length	0.622*		
قطر بزرگ Big diameter	0.682*	0.176	
قطر کوچک Small diameter	0.733*	0.119	0.906**

* و **: معنی‌داری به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

*, **: Significant at 5% and 1% level of probability, respectively.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش UPGMA ۱۱ جمعیت *B. hyrcana* بر اساس داده‌های مورفولوژی بذر

Fig. 1- Dendrogram of 11 Iranian populations of *B. hyrcana* produced by the UPGMA clustering method using seed morphological data

توسکاتک و نمک‌آبرود۲ در گروه اول؛ نمک‌آبرود۱، سیسنگان۲، سیسنگان۱ و پاسند در گروه دوم؛ پیرهرات، بندرگز، سمندکیش و چیساپارک در گروه سوم؛ و کلارآباد در گروه چهارم قرار گرفتند. اگرچه تفاوت در

ویژگی‌های مورفولوژی بذر جمعیت‌های مختلف محسوس بود ولی گروه‌بندی آنها از الگو جغرافیایی پیروی نمی‌کرد به طوریکه بذور بندرگز (شرقی‌ترین جمعیت) و پیرهرات (غربی‌ترین جمعیت) در یک گروه قرار گرفتند. ویژگی‌های بذور جمعیت‌های نمک‌آبرود۱ و ۲ که در فاصله نزدیکی از یکدیگر قرار دارند متفاوت بود. این نتایج حاکی از وجود تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌های مختلف شمشاد است. پاسخ گیاهان به گوناگونی عوامل اکولوژیکی حاکی از سازگاری گیاهان به شرایط محیطی (Maliníková *et al.*, 2013)، جریان ژن و انتخاب طبیعی (McLean *et al.*, 2015) است. مطالعات نشان داده که مورفولوژی و اندازه بذر نقش مهمی در استقرار نهال‌های گونه‌های چوبی داشته و غالباً از شیب جغرافیایی پیروی می‌کند (Karimi *et al.*, 2012; Tilki *et al.*, 2009). درحالیکه نتایج این پژوهش نشان داد که ویژگی‌های مورفولوژی بذر جمعیت‌های شمشاد فاقد شیب در گوناگونی جغرافیایی است. یکی از عوامل مهم در گوناگونی موزائیکی جمعیت‌های شمشاد، قطعه قطعه شدن (fragmentation) جمعیت‌های شمشاد است.

پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

در کل ۵۵ نوار در الگوی الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای ۱۱ جمعیت شمشاد مشاهده شد (شکل ۲). وزن ملکولی نوارها از ۲۳/۹۸۸ تا ۱۴/۵۴۳ کیلودالتون متغیر بود. بررسی الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ۱۱ جمعیت شمشاد نشان داد که در هر جمعیت تعداد متفاوتی از نوارهای پلی‌مورفیسم وجود دارد (جدول ۵). جمعیت چیساپارک، با ۴۰ نوار کمترین تعداد و جمعیت کلارآباد، با ۵۲ نوار بیشترین تعداد نوار را نشان دادند. درصد پلی مورفیسم از ۵۰/۹۱ درصد (جمعیت چیساپارک) تا ۸۷/۲۷ درصد (جمعیت توسکاتک)، با میانگین ۷۳/۲۳ درصد متغیر بود (جدول ۳). نتایج مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر حاکی از وجود تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مختلف شمشاد است. براساس یافته‌های گاردینر و فورد (Gardiner and Forde, 1988) اختلاف موجود در فراوانی نوارها در افراد و به تبع آن در جمعیت‌های مختلف ناشی از تفاوت در تعداد ژن‌ها و فراورده‌های آنها (پروتئین‌ها) است. اگرچه تحقیقی در مورد بررسی تنوع جمعیت‌های شمشاد بوسیله نشانگر پروتئینی انجام نشده ولی پژوهش‌های قبلی که بر اساس ویژگی‌های مختلف ملکولی در برخی جمعیت‌های شمشاد صورت گرفته حاکی از تنوع ژنتیکی شمشاد در جمعیت‌های خزری است (*Ghandehari et al.*, 2013a, b). مشاهده تنوع در ویژگی‌های مختلف این گیاه احتمالاً به علت هتروزیگوتی ناشی از دگرگشنی در شمشاد است (SagÆso *et al.*, 1996). سیستم گرده‌افشانی شمشاد بوسیله باد و حشرات انجام می‌گیرد، تا حفظ بقاء گیاه تضمین گردد (Lazaro and Travest, 2005).

برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس برآورد نااریب فاصله ژنتیکی Nei در بذور جمعیت‌های مناطق مختلف محاسبه شد (جدول ۶). میزان فاصله ژنتیکی از ۰/۰۶۵ (بین جمعیت‌های سمندکیش و بندرگز) تا ۰/۲۶۳ (بین جمعیت‌های کلارآباد و پاسند) با میانگین ۰/۱۵۸ متغیر بود. از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی(PCoA) استفاده شد (۷۰/۹۱ درصد گوناگونی در میان سه مولفه اصلی اول قرار داشت). جمعیت‌های مختلف، فاصله ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای از یکدیگر داشتند، بطوریکه توسط مولفه اصلی اول که ۳۶ درصد از گوناگونی کل را به خود اختصاص می‌دهد از یکدیگر جدا شدند (شکل ۳). بر این اساس کلیه جمعیت‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند که گروه اول شامل جمعیت‌های پاسند، پیرهرات، سیسنگان۱، سیسنگان۲، چیساپارک و نمک‌آبرود۲ و گروه دوم شامل جمعیت‌های کلارآباد، توسکاتک، بندرگز، سمندکیش و نمک‌آبرود۱ می‌باشند. مولفه اصلی دوم که ۲۰ درصد از گوناگونی کل را به خود اختصاص می‌دهد جمعیت‌های جمعیت‌های پاسند، پیرهرات، سیسنگان۱، کلارآباد و توسکاتک را از جمعیت‌های سیسنگان۲، چیساپارک، نمک‌آبرود۱، بندر

گز، سمندکیش و نمک‌آبرود۲ جدا کرد (شکل ۳). برای تشریح الگوی تمایز از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ازروش NJ نیز استفاده شد. نحوه گروه‌بندی جمعیت‌ها در دندروگرام حاصل تا حدود زیادی مطابق با گروه‌بندی جمعیت‌ها توسط مولفه اصلی اول و دوم در پلات PCoA بود (شکل ۴). بر اساس دندروگرام NJ و پلات PCoA ساختار جغرافیایی خاصی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. به طوریکه بندرگز و سمندکیش که جزء شرقی‌ترین و غربی‌ترین جمعیت‌های شمشاد هستند در یک خوشه نزدیک هم قرار گرفتند. جمعیت‌های نمک‌آبرود۱ و ۲ (توسط مولفه اصلی اول) و سیسنگان۱ و ۲ (توسط مولفه اصلی دوم) که از لحاظ جغرافیایی بسیار نزدیک بودند از هم جدا شدند. در همین ارتباط ضرایب همبستگی جفت ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌های شمشاد با استفاده از آزمون مانتل محاسبه شد. همبستگی بین ماتریس‌های فاصله پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌های مختلف و جغرافیایی از لحاظ آماری نیز معنی دار نبود (R=۰/۰۲ ، ρ =۰/۲۸۰). پس در نتیجه گیری کلی مشاهده می‌شود که رابطه جغرافیایی با ویژگی‌های نوارهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مناطق مختلف به وسیلهٔ آزمون مانتل ثابت نشد. نتیجه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نیز سطح نسبت بالایی از تنوع ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۷۸٪) نشان داد و فقط ۲۲٪ از گوناگونی، میان جمعیت‌های مختلف قرار داشت (جدول ۷). بنابراین اختصاص الگوی پروتئینی خاصی به هر یک از جمعیت‌ها و یا برخی جمعیت‌ها امکانپذیر نشد. شناسایی جمعیت‌ها و اختصاص الگوی پروتئینی خاصی به جمعیت‌های مختلف گیاهی موضوعی است که بر اساس نوع گونه نتایج ضد و نقیضی در مورد آن منتشر گردیده است. الگوی پروتئینی بذر گیاهان بسیاری تا کنون با اهدافی مثل مطالعه تنوع ژنتیکی و جداسازی جمعیت‌های گیاهی مطالعه شده است که می‌توان برای نمونه از مطالعاتی که بر روی شمشاد *Ricinus communis*، (Ghandehari *et al.*, 2013) *Capsicum* spp.، (Sathaiah and Reddy, 1985) *Arachis* spp.، (Panda *et al.*, 1986) (Bianchi-hal *et al.*, 1993) انجام شده نام برد که عموماً حاکی از کاربرد بالای نشانگر پروتئین در شناسایی گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف یک گونه است. برعکس نتایج بسیاری نیز وجود دارد که حاکی از عدم جداسازی جمعیت‌های مختلف توسط پروتئینهای ذخیره‌ای بذر در زیتون (Wang *et al.*, 2001)، قهوه (Bau *et al.*, 2001)، زربین (Zolfaghari *et al.*, 2015)، پسته (Seyedi *et al.*, 2010) و نمدار (Yousefzadeh *et al.*, 2012) است. از آنجاییکه جمعیت‌های مورد مطالعه اختلاف قابل ملاحظه‌ای از نظر الگو پروتئینی نشان دادند، پیدا کردن ارتباطی بین منشاء جمعیت‌ها و الگوی گروه‌بندی، بسیار دشوار بود. بطوریکه ساختار جغرافیایی در ویژگی‌های نوارهای پروتئین‌های ذخیره‌ای جمعیت‌های مختلف به وسیله آزمون مانتل مشاهده نگردید و ضریب همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و جغرافیایی از نظر آماری معنی‌دار نگردید (R^2=۰/۰۲ ، ρ =۰/۲۸۰). این نتایج با گزارش‌هایی که در گیاهان مختلف وجود دارد مطابقت دارد (Alipour *et al.*, 2002; Javaid *et al.*, 2004; Sihag *et al.*, 2004; Malik *et al.*, 2009).

عدم شباهت الگوی پروتئینی و مورفولوژیکی جمعیت‌های نزدیک (سیسنگان ۱ و ۲) و یا شباهت الگوی پروتئینی جمعیت‌های دور از هم (بندرگز و سمندکیش) می‌تواند ناشی از قطعه قطعه شدن رویشگاه شمشاد باشد. بروز خشکیدگی شمشاد در بسیاری از رویشگاه‌های آن منجر به قطعه قطعه شدن رویشگاه این گونه شده است. قطعه قطعه شدن زیستگاه یک گونه با کاهش تعداد افرادی که در تولید مثل شرکت می‌کنند، جریان ژن بین جمعیتی و کارایی گرده‌افشانی را کاهش می‌دهد (Dudash and Fenster, 2000; Duncan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008). در چنین جمعیت‌هایی تنوع ژنتیکی کاهش و تمایز ژنتیکی افزایش می‌یابد (Lazaro and Travest, 2006). مطالعه بر روی درختچه در خطر *Buxus balearica* نشان داد که قطعه قطعه شدن

زیستگاه یک گونه در خطر که رویشگاه گسترده‌ای ندارد می‌تواند حیات گونه را تهدید نماید. در چنین وضعیتی جمع‌آوری بذر از تعداد محدودی درخت در یک توده جنگلی و یا تعداد محدودی جمعیت که با هدف حفاظت *ex situ* و یا جنگلکاری صورت می‌گیرد به علت کاهش اندازه جمعیت و یا ترجیح جمع‌آوری بذر از برخی جمعیت‌ها می‌تواند ساختار ژنتیکی جمعیت آینده را تغییر دهد (Kätzel *et al.*, 2001). برای جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی باید به جمعیت‌های موجود از نظر حفاظت ژنتیکی توجه بیشتری شود تا به مرور زمان از تنوع ژنتیکی بین و درون آنها کاسته نشود، زیرا از دست دادن تنوع ژنتیکی ممکن است به کاهش توانایی گونه نسبت به تحمل تغییرات محیطی و تغییرات جمعیت‌ها در کوتاه و بلند مدت منجر شود (Reed and Frankham, 2003; Ellstrand and Elam, 1993).

جدول ۵ - برخی پارامترهای تنوع ژنتیکی ۱۱ جمعیت *B. hyrcana*

Table 5- Some genetic diversity characteristics of 11 Iranian population of *B. hyrcana*

نام جمعیت Population	تعداد نوارها No. Bands	نوارهایی به فراوانی ≥۵۰ درصد No. LComm Bands (<=50%)	هتروزیگوسیتی نوارها Mean Heterozygosity	درصد پلی‌مورفیسم %P
کلارآباد Celarabad	52	3	0.303	0.84
چیسا پارک Chisapark	40	1	0.193	0.51
نمک‌آبرود۱ Namakabrood1	46	1	0.255	0.69
نمک‌آبرود۲ Namakabrood2	48	2	0.321	0.85
پاسند Pasand	44	2	0.262	0.60
سی سنگان۱ Sisangan1	48	1	0.326	0.80
سی سنگان۲ Sisangan2	50	1	0.280	0.78
توسکا تک Tuscatec	51	4	0.308	0.87
سمند کیش Samandkish	49	3	0.278	0.75
پیر هرات Pireharat	41	3	0.236	0.62
بندرگز Bandargaz	49	1	0.299	0.75

جدول ۶- ماتریس برآورد ناریب فاصله‌های ژنتیکی ۱۱ جمعیت *B. hyrcana*

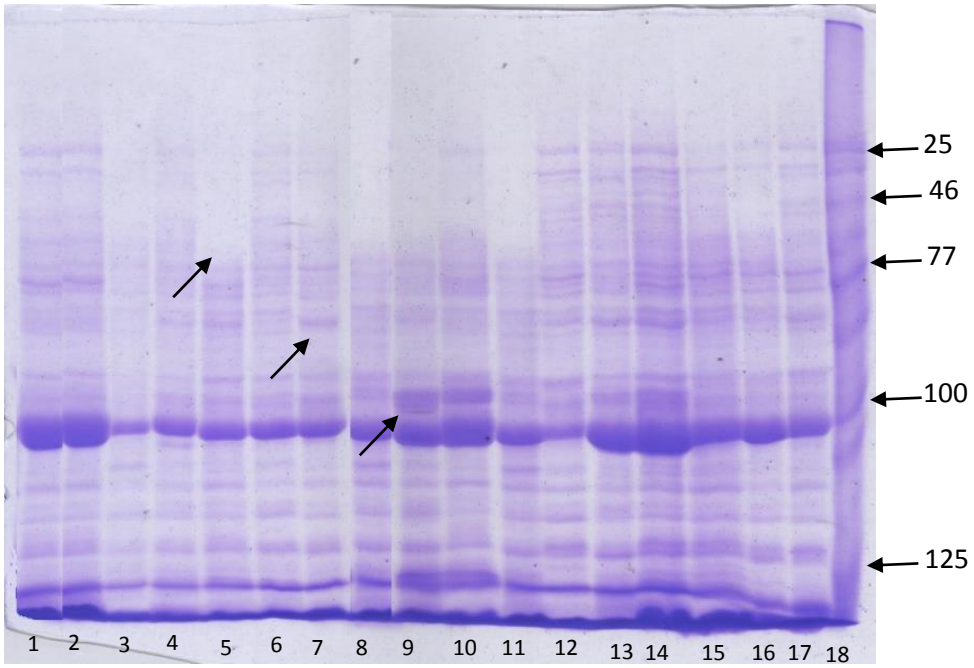
Table 6- Pairwise values for Nei's genetic distances of 11 Iranian population of *B. hyrcana*

نام جمعیت Population	کلارآباد Celarabad	چیساپارک Chisapark	نمک‌آبرود۱ Namakabrood1	نمک‌آبرود۲ Namakabrood2	پاسند Pasand	سیسنگان۱ Sisangan1	سیسنگان۲ Sisangan2	توسکاتک Tuscatec	سمند کیش Samandkish	پیرهرات Pireharat	بندرگز Bandargaz
کلارآباد Celarabad	0.000										
چیسا پارک Chisapark	0.251	0.000									
نمک‌آبرود۱ Namakabrood1	0.179	0.106	0.000								
نمک‌آبرود۲ Namakabrood2	0.236	0.138	0.102	0.000							
پاسند Pasand	0.263	0.160	0.188	0.180	0.000						
سی سنگان۱ Sisangan1	0.148	0.146	0.154	0.121	0.070	0.000					
سی سنگان۲ Sisangan2	0.171	0.086	0.120	0.131	0.125	0.089	0.000				
توسکا تک Tuscatec	0.131	0.255	0.129	0.195	0.239	0.188	0.218	0.000			
سمند کیش Samandkish	0.116	0.202	0.096	0.152	0.238	0.177	0.162	0.111	0.000		
پیر هرات Pireharat	0.217	0.142	0.144	0.196	0.104	0.137	0.149	0.186	0.196	0.000	
بندرگز Bandargaz	0.112	0.202	0.094	0.141	0.188	0.131	0.168	0.151	0.065	0.170	0.000

جدول ۷-نتایج تجزیه آنالیز ملکولی داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ۱۱ جمعیت *B. hyrcana*

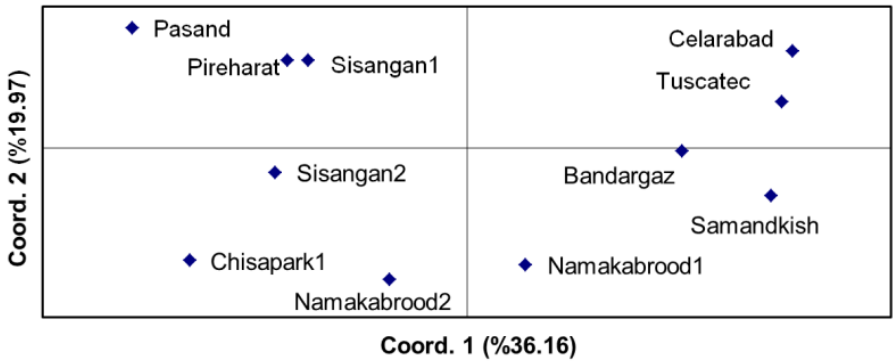
Table 7- Analysis of molecular variance of 21 Iranian population of *B. hyrcana* using seed storage proteins data

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	درصد واریانس %	احتمال Prob.
بین مناطق Among Regions	3	22.577	0%	1.000
بین جمعیت‌های هر منطقه Among Pops/Regions	7	32.231	22%	0.001
درون جمعیت‌ها Within Pops	99	8.271	78%	0.001
کل Total	109	63.078		



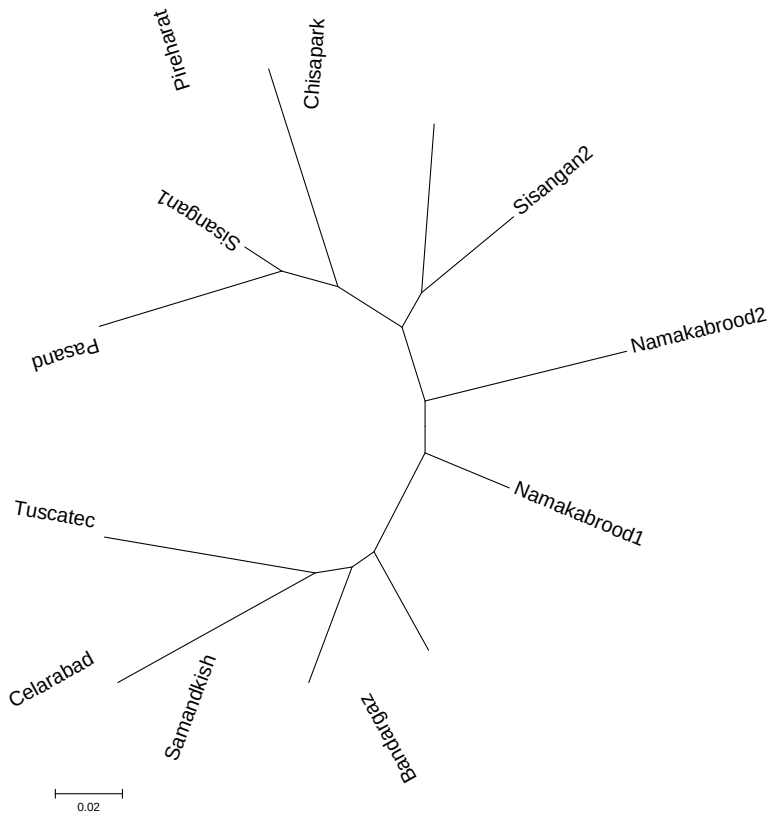
شکل ۲ - ژل الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر *B. hyrcana* جمعیت چیساپارک (نمونه‌های ۱ تا ۱۰)، و جمعیت سیسنگان۲ (نمونه‌های ۱۱ تا ۱۷) و نمونه نشانگر با درج وزن نوارها در واحد کیلودالتون (۱۸). فلش‌ها نشان‌دهنده برخی نوارهای‌های چندشکل هستند.

Fig. 2– Gel electrophoresis of seed storage proteins of *B. hyrcana* in populations Chisapark (Samples 1 to 10), Sisangan2 (samples 11 to 17) and Lader (18). The arrows represent some polymorphic bands.



شکل ۳- نمودار رسته بندی (PCA) ۱۱ جمعیت *B. hyrcana* بر اساس فاصله ژنتیکی با استفاده از دو مؤلفه ی اصلی (مؤلفه اول ۳۶/۱۶٪ و مؤلفه ی دوم ۱۹/۹۷٪.) بر اساس داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

Fig. 3- Two-dimensional graph of *B. hyrcana* based on the ordination scores of the principal coordinate analysis (PCoA) using Nei's unbiased genetic distances using seed storage proteins data



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به روش NJ بر روی ۱۱ جمعیت *B. hyrcana* بر اساس داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

Fig. 4 -Dendrogram of 21 Iranian populations of *B. hyrcana* produced by the neighbour-joining clustering method using seed storage proteins data

نتیجه‌گیری

در این پژوهش گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف شمشاد به عنوان ضرورتی اجتناب ناپذیر برای برنامه‌های حفاظتی مطالعه شد. داده‌ها نشان می‌دهند که علی‌رغم خشکیدگی بخش‌های وسیعی از شمشاد، جمعیت‌های مختلف شمشاد از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردارند که می‌بایست در هر دو برنامه‌های حفاظتی *in situ* و *ex situ*، مورد توجه قرار گیرد.

نتایج این پژوهش به وضوح نشان می‌دهد که ویژگی‌های مورفولوژیکی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌های مورد مطالعه از الگو جغرافیایی تبعیت نمی‌کنند. چنانچه در هر دو نشانگر مورفولوژی و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، جمعیت‌های دور از هم سمندکیش (گیلان) و بندرگز (گلستان) در یک گروه قرار گرفتند و برعکس جمعیت‌های نمک‌آبرود۱ و ۲ در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. این نتایج می‌تواند ناشی از قطعه قطعه شدن جمعیت‌های شمشاد باشد بدین ترتیب جمع‌آوری انتخابی بذر، از بعضی جمعیت‌ها می‌تواند باعث از دست رفتن برخی ژن‌ها شده و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را تغییر دهد که نشان دهنده اهمیت جمع‌آوری بذر از اکوتیپ‌های محلی است. حذف ژن‌ها از سیستمهای جنگلی در طی برنامه‌های جمع‌آوری بذر، بوسیله تغییر ساختار ژنتیکی و سطح تنوع ژنتیکی، روی حاصلخیزی، پایداری اکوسیستم، استمرار طویل مدت و تکامل جمعیت‌ها تأثیر می‌گذارد

(Howley *et al.*, 2005). بنابراین انتخاب تعداد محدود جمعیت برای بذرگیری یا برای تجدید حیات در آینده می‌تواند در دراز مدت منجر به فرسایش ژنتیکی جمعیت‌ها شود. این داده‌ها نشان می‌دهد که جمع‌آوری بذر صرفاً از یک جمعیت در هر منطقه اکوجغرافیایی کافی نیست و غالبا جمعیت‌هایی که حتی در یک منطقه اکوجغرافیایی قراردارند ممکن است ساختار ژنتیکی متفاوتی داشته باشند. بانک ژن منابع طبیعی ایران برای جلوگیری از فرسایش ژنتیکی می‌بایست از تعداد جمعیت بیشتری در هر منطقه اکوجغرافیایی بذر جمع‌آوری نماید.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشورتحت عنوان "جمع‌آوری و حفاظت بذر شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark) بمنظور تکمیل بانک ژن گونه‌های جنگلی در معرض خطر" است.

منابع

References

Alipour, H., A. Rezai, S.A.M. Meibodi, and M. Taheri. 2002. Evaluation of genetic variation in soybean lines using seed protein electrophoresis. J. Sci. Tech. Agric. Nat. Res. 5: 85-96.

Amaral, W., A. Yanchuk,and E. Kjaer. 2004. Methodologies for *ex situ* conservation. Forest genetic resources conservation and management: in plantation and genebank, Volme 3, Chapter 2. IPGRI.

Austerlitz, F., C.W. Dick, C. Dutech, E.K. Klein, S. Oddou-Muratorio, P.E. Smouse, and V.L. Sork. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. Mol. Ecol. 13: 937–954.

Baraloto, C., and P. M. Forget.2007.Seed size, seedling morphology, and response to deep shade and damage in neo-tropical rain forest trees. Am. J. Bot. 94: 901–911.

Bau, S. M. T., P. Mazzafera, and L.G.Santoro.2001. Seed storage protein in coffee. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 13: 110–123.

Bianchi-hall, C.M., R.D. Keys, H.T. Stalker, and J.P. Murphy. 1993. Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (*Arachis*, Fabaceae) species. Plant Syst. Evolution. 186: 1-15.

Carlson, J. E., and K. E. Holsinger. 2010. Natural selection on inflorescence color polymorphisms in wild Protea populations: the role of pollinators, seed predators and inter-trait correlations. Am. J. Bot. 97: 934–944.

Carlson, J. E., and K. E. Holsinger. 2015. Extrapolating from local ecological processes to genus-wide patterns in colour polymorphism in South African Protea. Proc. R. Soc. B. 282: 20150583.

Cavers, S., B. Degen, H. Caron, M.R. Lemes, R. Margis, F. Salgueiro, and A.J. Lowe. 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. Heredity 95: 281–289.

Dudash, M. R., and C. B. Fenster. 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: A. Young and G. Clarke (eds.) Genetics, demography and viability of fragmented populations. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 35–53.

Duncan D. H., A. B., Nicotra, J.T. Wood, and S. A. Cunningham. 2004. Plant isolation reduces outcross pollen receipt in a partially self-compatible herb. J. Ecol. 92: 977–985.

Ellstrand, N. C., and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size. J. Ecol. Syst. 24: 217-242.

Excoffier, L., P. Smouse, and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variances among DNA restriction data. Genet. 131: 479-491.

FAO. 2001. Global forest resources assessment, FAO Forestry Paper 140. Rome, Food and Agriculture Organization[Online]. Available at www.fao.org/forestry/fo/fra/[Geo-2-416].

Gardiner, S.E., and M.B. Forde. 1988. Identification of cultivars and species of pasture legumes by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel genetic diversity in Black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). Field Crops Res. 69: 183–190.

Ghandehari, V., A. Ahmadikhah, and V. Payamnoor. 2013a. Genetic diversity of *Buxus hyrcana* populations in north of Iran using ISSR markers. Iranian J. Rangelands Forests Plant Breed. Genet. Res. 21: 1-12.

Ghandehari V., V. Payamnoor, A. Ahmadikhah, and M.H. Pahlevani. 2013b. Investigation of inter-and intra-population genetic diversity of *Buxus hyrcana* in forests of north of Iran using RAPD molecular markers. Iranian J. Forest 5: 207-2018

Gower, J. G. 1966. Some distance properties of latent root and rector methods used in multivariate analysis. Biometrika 53: 325-338

Hawley, G.J., P.G. Schaberg, D.H. DeHayes, and J.C. Brissette. 2005. Silviculture alters the genetic structure of an eastern hemlock forest in Maine, USA. Can. J. Forest Res. 35:143–150.

Huang, Y., K. Ji, Z. Jiang, and G. Tan. 2008. Genetic structure of *Buxus sinica* var. parvifolia, rare and endangered plant. Scientia Horticulturae 116: 324-329.

Javaid, A., A. Ghafoor, and R. Anwar. 2004. Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan J. Bot. 30: 25-29.

Kalinowski, S.T., M.L. Taper, and T.C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16: 1099–1106.

Karimi, Kh., R. Zolfaghari, and P. Fayyaz. 2012. The effect of seed morphology and different altitude origins of Persian oak (*Quercus brantii*) on germination and growth of one year old seedlings. J. Wood Forest Sci. Tech. 19: 127-141.

Kätzel, R., B. Nordt, and J. Schmitt. 2001. Untersuchungen zum Einfluß der Durch forstungs intensitaät auf die genetische Struktur von Kiefernbeständen in den Berliner Forsten auf der Grundlage von Isoenzym- und DNA-Markern. In: H. Wolf (Ed.). Nachhaltige Nutzung forstgenetischer Ressourcen. Tagungsbericht zur 24. Internationalen Tagung der Arbeitsgem. f. Forstgenetik u. Forstpflanzenzüchtung. Sächsische Landesanstalt für Forsten, Pirna, Germany. pp. 159–170.

La´zaro, A., and A. Traveset. 2006. Reproductive success of the endangered shrub *Buxus balearica* Lam. (Buxaceae): Pollen limitation, and inbreeding and outbreeding depression. Plant Syst. Evolution. 261: 117–128.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nat. 227: 680-685.

Malik, M.F.A., A.S. Qureshi, M. Ashraf, M.R. Khan, and A. Javed.2009. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis. Aus. J. Crop Sci. 3: 107-112.

Maliníková, E., J. Kukla, M. Kuklová, and M. Balážová. 2013. Altitudinal variation of plant traits: morphological characteristics in *Fragaria vesca* L. (Rosaceae). Ann. For. Res. 56: 79-89.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.

McLean, C.A., D. Stuart-Fox, and A. Moussalli. 2015. Environment, but not genetic divergence, influences geographic variation in color morph frequencies in a lizard. BMC. Evolution Biol. 15:156.

Mikatadze-Pantsulaia, T., L. Kobakhidze, M. Eristavi, M. Khutsishvili, and T. Barblishvili. 2013. Ex-situ conservation of several threatened tree and shrub species of Georgia's flora. International Caucasian Forestry Symposium. October, Artvin, Turkey

Miyamoto, N., J.F. Fern´andez-Manjarr´es, M.E. Morand-prieur, P. Bertolino,and N. Frascaria-Lacoste. 2008. What sampling is needed for reliable estimations of genetic diversity in *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae)? Ann. Forestry Sci. 65: 403-410.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genet. 89: 583-590.

Ohsawa, T., Y. Tsuda, Y. Saito, H. Sawada, and Y. Ide. 2007. Steep slopes promote downhill dispersal of *Quercus crispula* seeds and weaken the fine-scale genetic structure of seedling populations. Ann. Forestry Sci. 64: 405–412.

Panda, R.C., O.A. Kumar, and K.G.R. Rao. 1986. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationship in Chile pepper (*Capsicum*). Theor. Appl. Genet. 7: 665-670.

Petit, R.J., A. El Mousadik, and O. Pons. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conserv. Biol. 12: 844–855.

Reed, D.H., and R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conserve. Biol. 17: 230-237.

Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using independent loci. Heredity 88: 221–228.

Rohlf, J.F. 2004. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.11. Exeter, Setauket, NY.

SagÆso, z., M. Tosun, and I. Akgun. 1996. Determination of some phenological, morphological and biological characteristics of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) collected from different locations. Turkiy III. C¸ ayõr-Mer'a ve Yembitkileri Kongresi, 17–19 Haziran 1996, Erzurum, pp. 527–534.

Sathaiah, V., and T.P. Reddy. 1985. Seed protein profile of caster (*Ricinus communis* L.) and some *Jatropa* species. Genet. Agric. 39: 35-43.

Schneider, S., J. Kuffer, D. Roessli, and L. Excoffier. 1997. Arlequin ver.1.1: software for population genetic data analysis, Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva.

Seyedi, N. S., G. A. Jalali, M. Moghaddam, M. Tabari, and S.A. Mohammadi. 2010. Application of seed storage protein in intra-specific variation in three population of *Pistacia atlantica*. J. Plant Biol. 2: 1-14.

Sihag, R., J.S. Hooda, R.D. Vashishtha, and B.P.S. Malik. 2004. Genetic divergence in soybean *Glycine max*. Ann. Biol. 20: 17-21.

Sjogren, P.,and P.I. Wyoni. 1994. Conservation genetics and detection of rare alleles in Finite populations. Conserv. Biol. 8: 267–270.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. kumar. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics nalysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evolution. 24: 1596-1599.

Tilki, F., F.T. Yuksek, and S. Guner. 2009. The Effect of undercutting on growth and morphology of bare root sessile oak seedlings in relation to acorn size. Aus. J. Basic Appl. Sci. 3: 3900-3905.

Valente, L. M., G. Reeves, J. Schnitzler, I.P. Mason, M.F. Fay, A.G. Rebelo, M.W. Chase, and T.G. Barraclough. 2010. Diversification in the African genus *Protea* (Proteaceae) in the cape biodiversity hotspot and beyond: equal rates in different biomes. Evolution. 64: 745–760

Van der Niet, T., M.D. Pirie, A. Shuttleworth, S.D. Johnson, and J.J. Midgley. 2014. Do pollinator distributions underlie the evolution of pollination ecotypes in the Cape shrub Erica plukenetii? Ann. Bot. 113: 301–316

Van Laere, K., D. Hermans, L. Leus,and J. Van Huylenbroeck. 2011. Genetic relationships in European and Asiatic *Buxus* species based on AFLP markers, genome sizes and chromosome numbers. Plant Syst. Evolution. 293: 1-11.

Wang, W., J. De-Dios-Alché, A. J. Castro, and M. I. Rodríguez-García.2001. Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in *Olea europaea*. Int. J. Dev. Biol. 45: S63-S64.

Yousefzadeh, H., A.Hosseinzadeh Colagar, M. Tabari,A. Sattarian, and M. Assadi, 2012. Genetic diversity of the *Tilia* sp. using seed protein electrophoresis. Iranian J. Range. Forests Plant Breed. Genet. Res. 19: 337-344.

Zolfaghari, R., R. Derikvand, R. Naghiha, and P. Fayyaz. 2015. Comparison of genetic diversity of dieback and healthy Cypress (*Cupressus sempervirens* L. Var. horizontalis) at different altitudes using seed storage proteins. Iranian J. Range. Forests Plant Breed. Genet. Res. 23: 277-287.