ارزیابی اکوسیستم‌های جنگلی به کمک مطالعات آنزیمی خاک با استفاده ازدرخت ملج به عنوان شاخص زیستی

• **انوشیروان شیروانی**، دانشجوی دکتری جنگلداری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران
• **سودابه علی احمد کروری**، دانشیار پژوهش موسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
• **هوشنگ سبحانی**، دانشیار گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران
• **محمد رضا مروی مهاجر**، دانشیار گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۳

Email: Shirvany@yahoo.com

چکیده

درخت ملج یکی از ارزشمندترین درختان صنعتی جنگل‌های شمال کشور است که از گرگان تا ارسباران انتشار دارد. متاسفانه به دلیل شیوع بیماری مرگ نارون در رویشگاه‌های این گونه، تعداد بیشماری از درختان ملج نابود شده و نسل این گونهٔ ارزشمند در معرض خطر جدی قرار گرفته است. به همین دلیل تلاش‌های زیادی در راه شناخت و حفظ این گونهٔ ارزشمند شده است که یکی از آنها ارزیابی اکوسیستم‌های دارای درختان سالم و بیمار به منظور مطالعهٔ رابطهٔ تعادل طبیعی اکوسیستم با سلامت فیزیولوژیک درختان است. یکی از روش‌هایی که امروزه برای ارزیابی اکوسیستم به کار می‌رود استفاده از مطالعات کمی آنزیم‌های میکروارگانیسم‌های خاک است. به دلیل کاهش شرایط زیستی از سطح به عمق خاک و نیز افزایش محدودیت‌های زیستی در عمق‌های پایین‌تر، فراوانی میکرو و ماکروارگانیسم‌های موجود در افق‌های زیرین خاک کاهش می‌یابد. به همین دلیل فعالیت آنزیم‌های خاک که تابعی از فعالیت موجودات خاکزی هستند از سطح به سمت عمق روندی کاهشی دارد. اما بروز اختلالات مختلف ممکن است منجر به بر هم خوردن تعادل طبیعی اکوسیستم شده و در نهایت این امر به مهاجرت موجودات به افق‌های پایین‌تر بیانجامد. در نتیجهٔ این امر روند کاهشی فعالیت آنزیم‌های خاک از سطح تا عمق مختل شده و منحنی مربوطه از حالت کاهنده به حالت نوسانی تغییر می‌کند. در این پژوهش با استفاده از این پدیده و نیز به کمک مطالعهٔ تغییرات آنزیم فسفو مونواستراز در خاک‌های مناطق جنگلی در چهار رویشگاه مختلف گرگان، نوشهر، اسالم و ارسباران، اکوسیستم‌های مورد نظر ارزیابی شدند. نمونه‌برداریها در اوایل سال ۱۳۸۳ در ابتدای فصل رویش انجام شد. هدف از انجام این مطالعه، آزمون فرضیهٔ تاثیر تعادل طبیعی اکوسیستم در حضور پایه‌های سالم و نیز وجود پایه‌های بیمار در اکوسیستم‌های نامتعادل است. نتایج با روش GLM (General Linear Model) با استفاده از آزمون توکی مقایسه شدند. نتایج این بررسی حاکی از آن است که به جز یک مورد تمامی اکوسیستم‌های دارای پایه‌های سالم از اکوسیستم‌های متعادل و تمامی اکوسیستم‌های دارای پایه‌های بیمار در زمرهٔ اکوسیستم‌های نامتعادل هستند. علاوه براین مقایسهٔ میانگین فعالیت آنزیم در هر یک از افق‌های مطالعه شده در این دو گروه اکوسیستم، نشان‌دهندهٔ افت چشمگیر فعالیت موجودات خاکزی در اکوسیستم‌های دارای درختان ملج بیمار است. در واقع با استناد به این نتایج می توان اظهار داشت که برای نجات این گونهٔ ارزشمند جنگل‌های شمال کشور ردیابی فنوتیپ‌ها و در نهایت ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری مرگ نارون به تنهایی کافی نیست. به بیان دیگر بر هم کنش عوامل مختلف زیستی و وجود تعادل طبیعی اکوسیستم نقش به سزایی در حفظ سلامت پایه‌های ملج و یا عدم شیوع بیماری در این اکوسیستم‌ها دارد. با توجه به نتایج فوق لازم است برای حفظ ذخائر ژنتیکی ارزشمند اکوسیستم‌های بکر مدیریت ویژه‌ای در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: ملج، *Ulmus glabra*، آنزیم خاک، ،فعالیت آنزیمی، تعادل اکوسیستم، ارزیابی اکوسیستم

Pajouhesh & Sazandegi No 66 pp: 96-103

Evaluation of forest ecosystems by means of soil enzyme studies with usage of Ulmus glabra as an bioindicator

By: Shirvany, A. Ph.D. Student of Natural Resources Faculty. University of Tehran
Korori, S. A. A. Associate Professor of Research Institute of Forests and Rangelands
Sobhani, H. Associate Professor in Natural Resources Faculty. University of Tehran

Archive of SID
www.SID.ir

Marvi Mohajer, M. R. Associate Professor in Natural Resources Faculty. University of Tehran

Ulmus glabra is one of the most important species of the industrial forests of northern forests of Iran. It is distributed from Gorgan (at the northeast) to Arasbaran (at the northwest). Due to development of Dutch elm disease in their habitats, countless numbers of this species have died and its presence in the forest ecosystems is in danger of being eliminated. There have been so many studies and efforts to save this valuable species all over the world. One of the efforts has been focusing on the evaluating both sound and diseased individuals in order to study natural balance ecosystem on sound physiological trees. nowadays one of the methods that are used to assess the ecosystem is to study the soil microorganism enzyme. Based on decreasing living conditions from top to bottom of the soil and also increasing living limits biological potential (constraints) towards the deep soil, the frequency of micro and macro organisms will decrease. Therefore the soil enzyme activities that are themselves related to these activities have a descending gradient from top to lower levels of soil. If the natural process for any reason will be abrupt may lead to an unbalanced ecosystem, which at the end will result to migrate to the living organisms to the lower levels. This will cause the change of the gradient shape and will follow a fluctuation. In this research, following the theorem and emphasis on phosphomonoesterase enzyme study, the soil of four forest habitats were studied which were located at Gorgan, Noshahr, Asalem and Arasbaran. Sampling was done on during Spring of 2004. The soil samples were analyzed and phosphomonoesterase activities were measured. The goal was to study the effects of natural balance on both sound and diseased elm individuals in normal and abnormal ecosystems. The results were analyzed by GLM (General Linear Model) method and were compared by Tukey test. The results show that all of the sound elms are on the balance ecosystems (except one) and the diseased ones are on balanced. In addition the comparison of enzyme activity in each horizon in both groups shows that decrease of organisms activities in unbalanced elm ecosystem is quiet significant. In fact it can be stated that to save this valuable species it is not enough to only follow and find the resistant phenotypes and genotypes elms to Dutch elm disease. In other words, the interactions of different biological factors and balanced ecosystems have the main effects on saving sound elms, which may result to control the disease. This means that we have to induct a sound and powerful management for these forests.

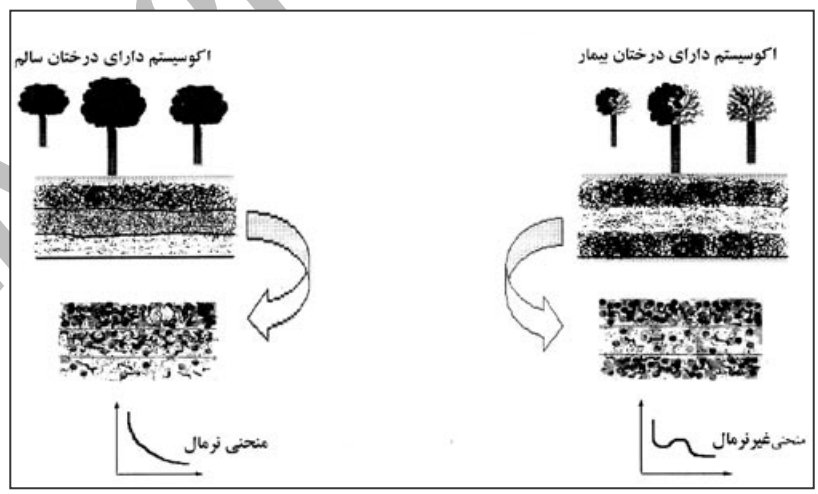
Key words: Elm, *Ulmus glabra*, Soil enzyme, Enzyme activity, Ecosystem balance and Ecosystem evaluation

مقدمه

دیرزمانی اســت که بشر از اکوسیستم‌های طبیعی بهره‌برداری می‌نماید و همواره به دنبال تداوم و افزونی بهره‌وری بوده است. اما بهره‌برداری‌های نابخردانه در قرن‌های اخیر و بروز فاجعه‌های عظیم زیســت محیطی، انسان قرن حاضر را وادار به درک بهتر و عمیق‌تر روابط اجزای اکوسیستم‌ها و شاخص‌های ظرفیت اکوسیستم‌ها در مقابله با اختلالات زیست محیطی نموده است. روش مطالعات آنزیمی خاک یکی از روش‌هایی اســت که انسان را در رسیدن به این مهم یاری کرده است. با استفاده از مطالعهٔ موجودات خاکزی و قوانین حاکم بر فراوانی و سطح فعالیت آنها، می توان در زمینهٔ ارزیابی و در نهایت مدیریت بهینهٔ اکوسیستم از این مطالعات استفاده کرد(۴، ۵، ۷ ، ۹). همچنین استفاده از این مطالعات جایگاه ویژه‌ای در امر تعیین و شناسایی شدت و میزان خسارات وارد بر اکوسیستم‌های طبیعی داشــته اســت(۴، ۵ ، ۱۲). بیماری مرگ نارون (Dutch Elm Disease) یکی از بیماریهای اســت که در چند دههٔ اخیر آسیب‌های فراوانی را بر گونه‌های مختلــف جنس نارون در منطقهٔ پراکنش طبیعی آن وارد کرده اســت تا حدی کــه برخی از این گونه‌ها در معرض خطر جدی قرار گرفته و در صورتی که روند کاهشی جمعیت این گونه‌ها همچنان ادامه یابد ممکن است در معرض انقراض قرار گیرند. گسترهٔ عمل این بیماری تمامی گونه‌های جنس‌های نارون (Ulmus. sp) و آزاد (Zelkova. sp) را شــامل می‌شود. گونه ملج (*Ulmus glabra*) یکی از ارزشمندترین گونه‌های صنعتی موجود در جنگل‌های شمال ایران است که علاوه بر ارزش اقتصادی آن یکی از گونه‌های طبیعی و مهم اکوسیســتم جنگل‌های شمال ایران محسوب می‌شود. در گذشته این گونه در بسیاری از نقاط جنگل‌های شمال پراکنده بود ولی امروزه تعداد این درختان در اکوسیستم جنگل‌های خزری به شــدت رو به کاهش گذاشــته و یکی از مهمترین دلایل بروز آن گســترش بیماری مرگ نارون اســت. عامل بیماری مذکور قارچ *Ceratocystis ulmi* است. قارچ بیماریزای مزبور در فرم غیرجنســی به نام *Ophiostomaulmi* و نیز *ulmi Ophiostoma novo* نامیده می‌شــود. ناقل آن یک نوع سوسک پوستخوار با نام علمی *Scolytus scolytus* است. سابقهٔ شناسایی این بیماری در ایران حدود۳۰ ســال اســت ولی در اروپا بیش از ۷۰ سال سابقهٔ شناسایی دارد. تا به حال منجر به مرگ بســیاری از گونه‌های ســردهٔ Ulmus شده اســت (۱). با وجود این که پژوهش‌های زیادی برای مبارزه با این بیماری در جهان انجام شده ولی هنوز راه حل مناسب و کاملی برای آن ارائه نشده است. در سال‌های اخیر حضور پایه‌های کاملاً سالم ملج نظر پژوهشگران را به خود جلب کرده است و این پرسش را در اذهان ایجاد کرده اســت که به احتمال قوی سلامت این پایه‌ها به دلیل ژنوتیپ مقاوم به بیماری بوده‌اند یا اینکه عدم بروز بیماری صرفاً به دلیل عدم هجوم عامل بیماریزا بوده است. یکی از فرضیاتی که در این زمینه ارائه شده، اهمیت حضور پایه‌های دارای فنوتیپ ســالم در اکوسیستم‌های بکر است که آنها را از پایه‌های بیماری که در اکوسیستم‌های دست خورده و یا به تعبیری نامتعادل وجود دارند جدا می سازد. در واقع اکوسیستم دست خورده به مناطقی گفته می‌شود که تحت تاثیر دخالت مستقیم یا غیر مستقیم انسان است. در واقع فرضیهٔ این پژوهش نیز بر این مبنی استوار است که بر هم خوردن تعادل طبیعی در عرصهٔ چرخهٔ زنجیره‌های

Archive of SID
www.SID.ir

غذایی، هرم انرژی، چرخه‌های مواد و یا هریک از موازین دیگر نظام حاکم بر اکوسیستم پیچیدهٔ جنگل می تواند منجر به بروز ضعف فیزیولوژیک در گونه‌های مختلف شده و در نهایت آمادگی درختان ملج را برای پذیرش بیماری افزایش میدهد. شایان ذکر است که گنجینهٔ عظیم اندوختهٔ ژنتیکی هر موجود تکامل یافتهای به خصوص درختان که از پیشینهٔ تکاملی بسیار کهنی برخوردارند شامل هزاران ژن است که در شرایط مختلف زیستی تنها بخشی از آنها بیان می‌شوند و بخش زیادی از آنها بیان نشده و تنش‌های زیستی آینده است که می تواند منجر به بیان یا عدم بیان این ژن‌ها گردد. در واقع بر هم خوردن تعادل طبیعی اکوسیستم تحولی را در بیان ژن‌های درختان ایجاد کرده و ممکن است برخی از سیستمهای دفاع فیزیولوژیک گیاهان را دچار اختلال نماید. بر طبق مطالعات انجام شده تراکم و در نتیجه فعالیت ارگانیسم‌های موجود در خاک از سطح تا عمق کاهش یافته و تابع یک روند نزولی است (۵،۲ ، ۸، ۹، ۱۱). اما در صورتی که یک یا چند عامل تاثیرگذار منجر به بر هم خوردن تعادل اکولوژیکی اکوسیستم گردد، منجر به مهاجرت ارگانیسم‌های افق‌های فوقانی به افق‌های تحتانی می گردد. به این ترتیب روند کاهشی حاکم بر فراوانی ارگانیسم‌های موجود در افق‌های خاک از سیر نزولی خارج شده و نوسانات نامنظمی را نشان خواهد داد(شکل شمارهٔ ۱). در واقع به دلیل مهاجرت میکروارگانیسم‌ها به افق‌های پایین‌تر، منحنی نزولی فعالیت آنزیمی آنها تبدیل به منحنی نامنظم می‌گردد. به همین دلیل این پدیده را می‌توان به عنوان یکی از ابزارهای ارزیابی اکوسیستم‌های مختلف زراعی و طبیعی به کار برد



شکل شمارهٔ ۱- شمای مقایسهٔ اکوسیستم‌های متعادل و نامتعادل و وضعیت فعالیت ارگانیسم‌ها در افق‌های مختلف آنها

(۳،۲، ۶، ۹، ۱۱). اگرچه از پارامترهای دیگری نیز می توان به این منظور استفاده کرد که در محدودهٔ این پژوهش قرار ندارد. بنابراین فرضیهٔ اصلی این پژوهش بیانگر آنست که پایه های سالم ملج بیشتر در اکوسیستم‌های متعادل و پایه های بیمار ملج بیشتر در اکوسیستم‌های نامتعادل پراکنش دارند.

سابقهٔ پژوهش

در زمینهٔ ارزیابی اکوسیستم‌های طبیعی روش‌های مختلفی وجود دارد که مطالعات آنزیمی میکروارگانیسم‌های خاک یکی از جدیدترین این روش‌ها است(۳،۲، ۵، ۷ ، ۹). در واقع آنزیم‌ها به عنوان مهمترین پروتئین‌های شناخته شده در فرآیندهای متابولیکی موجودات زنده محسوب می‌شوند و به دلیل اینکه در ساده ترین تک‌سلولی‌ها تا پیچیده‌ترین ارگانیسم‌های حیاتی قابل مطالعه هستند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردانـد. فعالیت کمی و کیفی آنزیم‌ها، بیانگر میزان فعالیت ارگانیسم‌های حیاتی مختلفی است که از فرآیند مورد نظر در چرخه های متابولیک خود برخوردارند. به عبارت دیگر مطالعهٔ فعالیت کمی آنزیم‌ها نیز می‌تواند موید میزان فراوانی ارگانیسم‌های حیاتی باشد. به همین دلیل فعالیت برخی از آنزیم‌های خاص مانند الکل دهیدروژناز، گلوکوزیداز، اوره‌آز و فسفومونواستراز می تواند بیانگر سطح فراوانی ارگانیسم‌های تولید کنندهٔ آنها در محیط باشد (۳، ۶، ۱۰، ۱۱). آنزیم فسفومونواستراز یکی از آنزیم‌هایی است که به وسیلهٔ بسیاری از ارگانیسم‌های موجود در خاک در طی فرآیندهای متابولیک در دو شکل اسیدی و قلیایی تولید می شود و به همین دلیل میزان فعالیت این آنزیم در یک خاک موید میزان فعالیت بیولوژیک خاک و در اصل موید فراوانی میکروارگانیسم‌های موجود در آن است. نظر به آنکه فاز قلیایی این آنزیم به وسیلهٔ ریشه‌های گیاهان ترشح نمی‌شود و تنها به وسیلهٔ ارگانیسم‌های موجود در خاک تولید می شود، برای مطالعه و محاسبهٔ فعالیت میکروارگانیسم‌های و ماکروارگانیسم‌های خاک مناسب‌تر است (۳، ۱۰). اکوسیستم خاک اگرچه به ظاهر فاقد حیاتی پویا است اما هزاران موجود میکرو و ماکروارگانسیم در این زیستگاه ارزشمند وجود دارند که در پایداری اکوسیستم‌های گیاهی موثرند و هر یک متاثر از یک یا چند زنجیرهٔ غذایی مختلف هستند(۳، ۵، ۸، ۱۲).

در این پژوهش با استفاده از روش مطالعات آنزیمی خاک، اکوسیستم‌های دارای درختان بیمار ملج، با اکوسیستم‌هایی که تنها زیستگاه درختان سالم هستند مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش میزان آنزیم فسفومونواستراز در فاز قلیایی، در افق‌های مختلف خاک در اکوسیستم‌های دارای پایه های بیمار و سالم ملج مطالعه شده و با استفاده از مقایسهٔ این دو گروه، اثر تعادل طبیعی اکوسیستم بر ظهور یا عدم ظهور بیماری مورد ارزیابی قرار گرفته است. ابتدا از چهار رویشگاه مختلف ملج واقع در استان گلستان (گرگان)، استان مازندران (نوشهر)، استان گیلان (اسالم) و استان آذربایجان شرقی (ارسباران) نمونه‌های خاک در چهار افق با فواصل ۱۰ سانتیمتری (۰-۱۰، ۱۰-۲۰، ۲۰-۳۰ و ۳۰-۴۰ سانتیمتری) در ابتدای فصل رویش در اوایل سال ۱۳۸۳ نمونه گیری شده و در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شدند. شایان ذکر است که به دلیل اینکه مطالعهٔ اثر تعادل درونی اکوسیستم هدف اصلی این پژوهش بوده است از نمونه برداری از توده‌های دست خورده و به شدت بهره برداری شده صرفنظر شده و تمامی مناطق نمونه برداری شامل مناطق جنگلی دارای پوشش به ظاهر خوب و فاقد آسیب‌های ناشی از دخالت بشر بوده است. علاوه بر این رویشگاه‌هایی انتخاب شدند که جایگاه حداقل چند پایهٔ سالم و یا چند پایهٔ بیمار بودند. رویشگاه نخست در جنگل آموزشی و پژوهشی شصت کلاته گرگان در ارتفاع ۵۲۰ متری، رویشگاه دوم در جنگل آموزشی و پژوهشی خیرودکنار در شش ارتفاع مختلف ۵۶۴ متر، ۸۱۹ متر، ۸۶۳ متر، ۱۱۷۰متر، ۱۰۳۰متر و ۱۰۷۱ متری از سطح دریا در منطقهٔ نوشهر در استان مازندران، رویشگاه سوم در دو جنگل اسالم (در جادهٔ

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- خصوصیات رویشگاه‌های نمونه‌برداری شده

نام منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	میزان بارندگی سالیانه (میلیمتر)	میانگین دما (درجهٔ سانتیگراد)
ارسباران	۳۹°۲'	۴۶° و ۵۲'	۱۳۴۰	۵۵۰	۱۱
اسالم	۳۷° و ۴۳'	۴۸° و ۴۸'	۹۵۰	۱۲۸۶	۸/۵
خیرود	۳۶° و ۲۴'	۵۱° و ۴۱'	۱۰۷۰ - ۲۳۲	۱۱۰۰	۱۵/۵
گرگان	۳۶° و ۵۰'	۵۴° و ۲۹' و	۵۲۰	۶۴۹	۱۶

اسالم خلخال) در ارتفاعات ۱۰۳۰ و ۱۰۷۱ متری از سطح دریا و در طرح دریابن در ارتفاع ۸۸۰ متری از سطح دریا و رویشگاه چهارم در منطقهٔ ارسباران در دو ارتفاع ۱۳۴۰ و ۱۶۶۰ متری انتخاب گردید. در رویشگاه خیرودکنار سه اکوسیستم دارای درختان سالم و سه اکوسیستم دارای درختان بیمار نمونه‌برداری شدند. در رویشگاه اسالم نیز یک اکوسیستم دارای پایه‌های بیمار و دو اکوسیستم دارای پایه‌های سالم نمونه‌برداری شدند. رویشگاه‌های گرگان و ارسباران فاقد پایه‌های بیمار بودند. شایان ذکر است که به دلیل اهمیت حضور پایه‌های مطالعاتی در داخل اکوسیستم جنگل، از مناطق دارای تک درختان بیمار صرف نظر شد. در کل ده اکوسیستم سالم و چهار اکوسیستم بیمار با سه تکرار نمونه برداری شدند. بنابراین ۳۰ تکرار از اکوسیستم‌های دارای درختان سالم و ۱۲ تکرار از اکوسیستم‌های دارای درختان بیمار نمونه‌برداری شدند. مشخصات رویشگاه‌های نمونه‌برداری شده در جدول شمارهٔ ۱ درج شده است.

روش مطالعه

پس از اضافه کردن محلول حائل (Buffer) پارا نیتروفنیل به یک گرم نمونهٔ خاک آنها را به مدت یک ساعت در ۳۷ درجهٔ سانتی گراد نگهداری کرده و پس از آن میزان پارا نیتروفنیل آزاد شده به وسیلهٔ فعالیت آنزیم مورد نظر به وسیلهٔ هیدروکسید سدیم رنگ آمیزی شده و در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده و در نهایت محاسبه می شود (۱۰).

محلول‌های مورد نیاز

محلول سوبسترا برای فسفومونواستراز قلیایی

۴/۲۶۸ گرم (Merck ۶۸۵۰) Disodium p-nitrophenyl phosphate) hexahydrate) را در محلول Working buffer فسفومونواستراز قلیایی حل کرده و حجم محلول با آن به یک لیتر رسانده شد. توجه شود که این محلول را باید به طور تازه مورد استفاده قرار داد بنابراین فقط باید به مقدار مورد نیاز آزمایش تهیه شود.

محلول بافر پایه (Stock)

مخلوط ۱۲/۱ گرم تریس (hydroxymethyl aminomethane) + ۱۱/۶ گرم اسید مالئیک + ۱۴ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات + ۶/۳ گرم اسید بوریک را تهیه کرده و در ۵۰۰ سی سی محلول یک نرمال هیدروکسید سدیم حل کرده سپس حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. توجه شود که استوک بدست آمده فقط در ۴ درجهٔ سانتی گراد قابل نگهداری است.

Working buffer برای فسفومونواستراز قلیایی (pH=۱۱/۵)

۲۰۰ سی سی از محلول بافر پایه (Stock) و ۵۰۰ سی سی آب مقطر را مخلوط کرده و با استفاده از هیدروکسید سدیم pH آن به ۱۱ رسانده سپس حجم نهایی محلول را با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد.

محلول کلرید کلسیم نیم مولار (۰/۵M)

۳۶/۷۴ گرم $CaCl_2,2H_2O$ را در آب مقطر حل کرده و حجم آن با آب مقطر به حجم نیم لیتر رسانده شد.

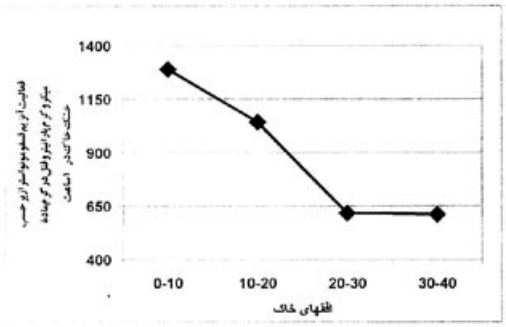
محلول هیدروکسید سدیم نیم مولار (۰/۵M)

۲۰ گرم هیدروکسید سدیم را در آب مقطر حل کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به نیم لیتر رسانده شد.

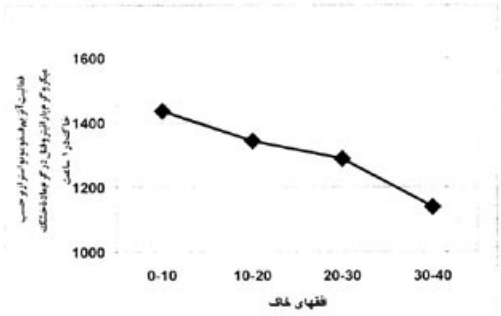
محلول پایه استاندارد (Standard stock)

یک گرم p-nitrophenol را با آب مقطر حل کرده و حجم نهایی محلول به یک لیتر رسانده شد (توجه شود که محلول فوق فقط در ۴ درجهٔ سانتی گراد قابل نگهداری است).

محلول Working standard ($\mu g\ ml^{-1}$) (۲۰ µg p-nitrophenol .)

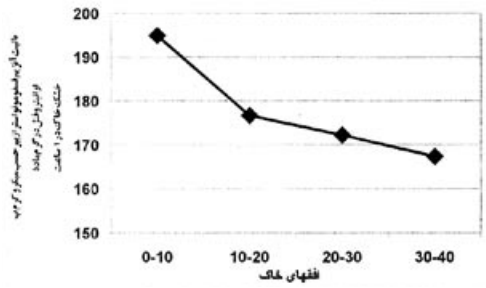


نمودار شماره ۱- جنگل شصت کلاته – گرگان (۱).

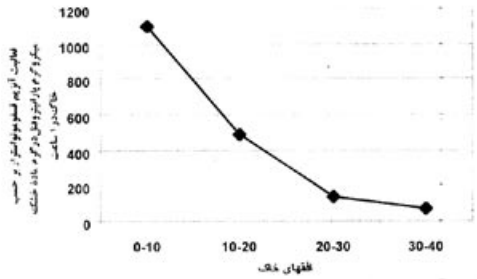


نمودار شماره ۲- جنگل شصت کلاته – گرگان (۲).

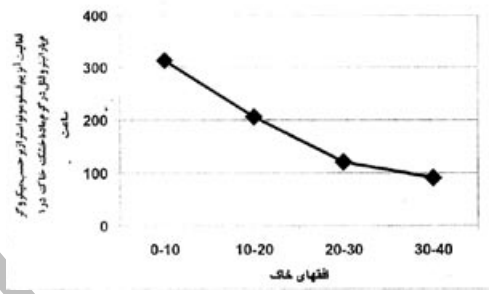
Archive of SID
www.SID.ir



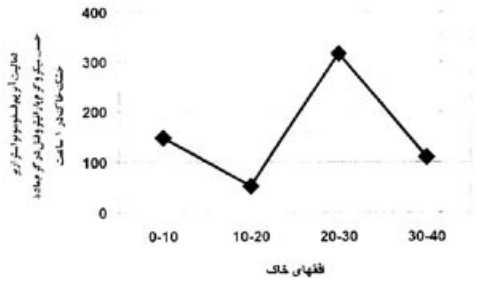
نمودار شماره ۳- سری پاتم (جنگل خیرودکنار – نوشهر).



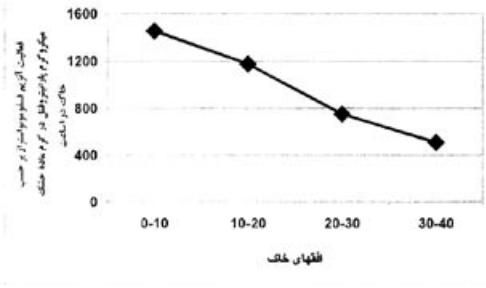
نمودار شماره ۴- جنگل شصت کلاته – گرگان (۳).



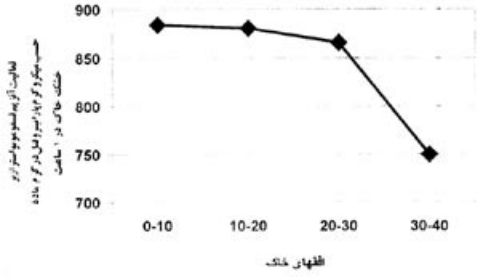
نمودار شماره ۵- سری پاتم (جنگل خیرودکنار –نوشهر).



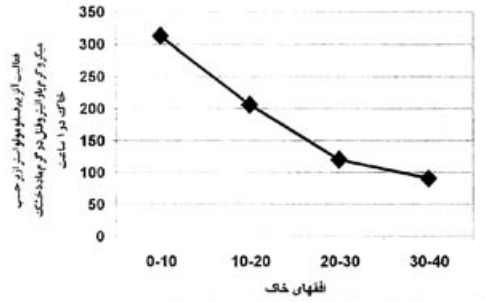
نمودار شماره ۶- سری چیلر (جنگل خیرودکنار – نوشهر).



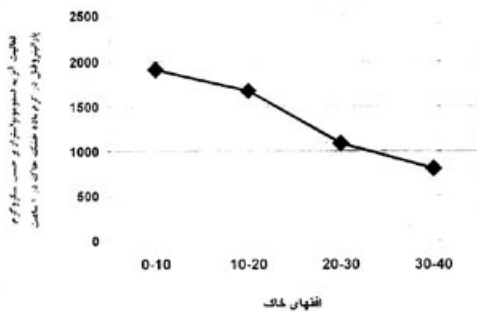
نمودار شماره ۷- ارسباران – توپخانه



نمودار شماره ۸- ارسباران – تازه کند.

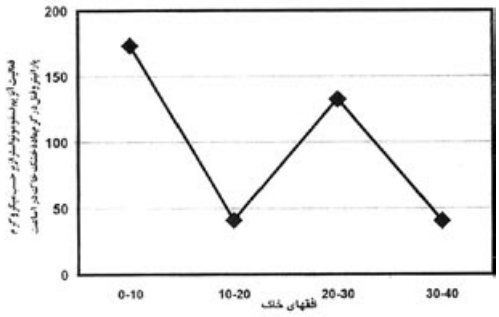


نمودار شماره ۹- سری پاتم (جنگل خیرودکنار – نوشهر).

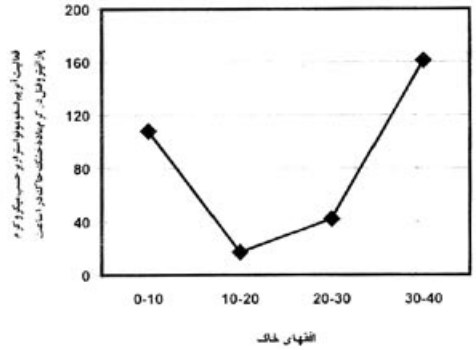


نمودار شماره ۱۰- اسالم – گیلان.

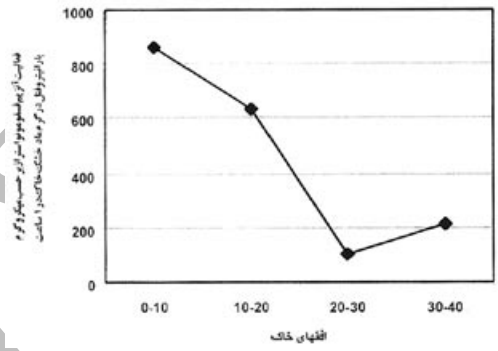
www.SID.ir



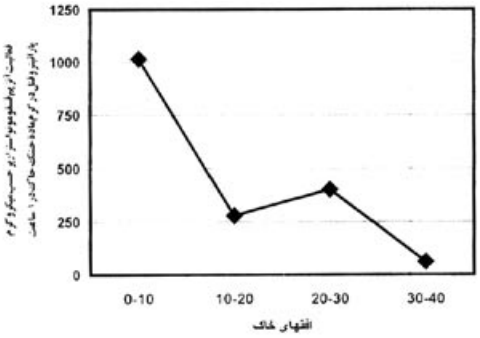
نمودار شماره ۱۱- سری گرازین (جنگل خیرودکنار – نوشهر).



نمودار شماره ۱۲- سری پاتم (جنگل خیرودکنار – نوشهر).



نمودار شماره ۱۴- سری گرازین (جنگل خیرودکنار – نوشهر).



نمودار شماره ۱۳- اسالم – گیلان.

۲ سی سی از محلول پایه استاندارد با آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد.

رسم منحنی استاندارد کالیبراسیون

مقادیر ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ سی سی از محلول پایه استاندارد در شش لولهٔ آزمایش ریخته و با آب مقطر حجم هر یک به ۵ سی سی رسانده شد. سپس به این محلول یک سی سی محلول کلرید کلسیم نیم مولار و ۴ سی سی محلول هیدروکسید سدیم نیم مولار اضافه کرده و به خوبی هم زده و با کمک کاغذ صافی صاف شد. استاندارد بدست آمده به ترتیب حاوی مقادیر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم P-nitrophenol است. محلولهای به دست آمده را با استفاده از روش طیف سنجی و با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده سپس با استفاده از منحنی رگرسیون معادلهٔ خط بدست آمده ملاک محاسبات طیف سنجی محلولهای کنترل و نمونه‌ها قرار داده شد. معادله خط به دست آمده تا غلظت ۱۲۰ میکروگرم P-nitrophenol قابل استفاده است، بنابراین بهتر است که میزان فعالیت آنزیم یک بار پیش از انجام همه مراحل برای هر نمونه اندازه‌گیری شده و در صورت لزوم مقدار خاک اولیه کمتر شود. توجه به این نکته ضروری است که ظاهرا غلظت محلول نهائی اگر چه آسانتر به نظر میرسد ولی کمی ایجاد خطا می‌نماید که در مطالعات خاص بهتر است. از آن صرف‌نظر شود.

روش کار

در ۵ ارلن ۲۰۰ سی سی، هر کدام یک گرم خاک تازه ریخته شد. در صورتی که امکان انجام آزمایش به سرعت پس از نمونه برداری وجود نداشته باشد، بهتر است که خاک را تا مدت یک ماه در یخچال در دمای ۱۴ درجه سانتیگراد برای مدت زمان بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداشت. سپس یک سی سی محلول سوبسترا (برای هر دو فاز اسیدی و قلیایی) و ۴ سی سی محلول Working buffer (که برای فاز اسیدی و قلیایی به طور جداگانه تهیه شده است) تنها به سه ظرف ارلن حاوی نمونه های خاک اضافه شد. به دو ظرف دیگر تنها ۴ سی سی محلول Working buffer اضافه شد. این دوظرف حاوی محلولهای کنترل است. در ظروف را بسته و ضمن هم زدن به مدت یک ساعت در ۳۷ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شد. پس از آن به هر یک از ۵ ظرف یک سی سی محلول کلرید کلسیم نیم مولار و ۴ سی سی محلول هیدروکسید سدیم نیم مولار را اضافه کرده و در این مرحله به ظروف حاوی نمونه های کنترل یک سی سی از محلول سوبسترا اضافه شد.

در نهایت به تمامی نمونه‌ها ۹۰ سی سی آب مقطر اضافه کرده و پس از هم زدن، محتوی ظروف را با کاغذ صافی فیلتر کرده و محلول به دست آمده با استفاده از روش طیف سنجی و با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده شد.

میزان فعالیت آنزیم به صورت میکروگرم P-nitrophenol (pNP) در گرم مادهٔ خشک در مدت یک ساعت تیمار حرارتی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$(S-C).10.100/\%dm=\mu gNP.g^{-1}dm.h^{-1}$$

S معادل مقدار pNP بر حسب میکروگرم در نمونه‌ها است.

C معادل مقدار pNP بر حسب میکروگرم در کنترل‌ها است.

۱۰ ضریب رقت محلول‌ها است.

۱۰۰ ضریب درصد وزن خشک خاک است.

Archive of SID
www.SID.ir

Dm مقدار مادهٔ خشک نمونه به درصد است.

نتایج

نتایج این بررسی حاکی از آن است که در رویشگاه‌های گرگان، اسالم و ارسباران که تنها در برگیرندهٔ درختان سالم ملج بوده‌اند روند منظم کاهشی فعالیت آنزیم از سطح به عمق خاک مشاهده شد اما در رویشگاه نوشهر یکی از اکوسیستم‌های دارای درختان سالم از این قاعده مستثنی بوده و روندی نامتعادل را نشان داد. از سوی دیگر در رویشگاه‌های دارای درختان بیمار در مناطق نوشهر و اسالم روند نامنظمی مشاهده شد که حاکی از مهاجرت میکروارگانیسم‌های خاک در افق‌های مختلف است. علاوه بر این، مقایسهٔ میانگین در اکوسیستم‌های دارای درختان بیمار و اکوسیستم‌های دارای درختان سالم نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار در این دو گروه و کاهش چشمگیر مقدار فعالیت آنزیم در گروه نخست است. همانطور که از نتایج بر میآید در افق‌های ۱۰-۲۰، ۲۰-۳۰ و ۳۰-۴۰ اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۹۹ درصد و در افق ۰-۱۰ در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار بوده است. همچنین نتایج آزمون T استیودنت نیز با این نتایج مطابقت دارد. نتایج آزمون هر افق به طور جداگانه در یک پاراگراف تنظیم شده است که شامل مقادیر P و F با استفاده از آزمون توکی، درجهٔ آزادی گروه‌ها دوگروه اکوسیستم)، اشتباه کل و نیز درجهٔ آزادی کل است. سپس تعداد، میانگین و انحراف از معیار هر یک از دو گروه و نیز اخلاف عددی میانگین‌ها، میزان T محاسباتی و همچنین P برآورد شده با استفاده از جدول T استیودنت مشخص شده است.

بحث

نتایج به دست آمده با فرضیهٔ مطرح شده در این پژوهش مطابقت داشته و حاکی از آنست که در اکوسیستم‌های در برگیرندهٔ درختان بیمار به دلیل بر هم خوردن تعادل طبیعی اکوسیستم و ایجاد اختلال در نظام حاکم بر آن، بخشی از میکروارگانیسم‌ها از افق‌های فوقانی به افق‌های زیرین مهاجرت کرده‌اند. به نظر می‌رسد اکوسیستم‌های دارای درختان بیمار فاقد تعادل طبیعی در نظام زیستی خود هستند در حالیکه اکوسیستم‌های دارای درختان سالم از این تعادل برخوردارند. در واقع یکی از نشانه‌های تعادل اکوسیستم وجود روند کاهش ارگانیسم‌ها از سطح به عمق خاک است و اگر این روند دچار اختلال شود نشان دهندهٔ تاثیر یک یا چند عامل بر هم زنندهٔ این تعادل است. از سوی دیگر معنی دار بودن تفاوت میانگین فعالیت آنزیم در اکوسیستم‌های دارای درختان سالم و بیمار موید افت شدید فعالیت میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های نامتعادل نسبت به اکوسیستم‌های متعادل است. این امر گواه دیگری بر این مدعاست که اکوسیستم‌های نامتعادل، روندی کاهشی در فراوانی میکروارگانیسم‌های خاک داشته و به تعبیری دچار توالی فرساینده شده‌اند. نکتهٔ قابل توجه مشاهدهٔ یک رویشگاه دارای درختان سالم با الگوی اکوسیستم‌های نامتعادل است (نمودار شمارهٔ ۶) که یا وجود آن ناقض فرضیهٔ مطرح شده است که با درنظر گرفتن نتایج به دست آمده از سایر رویشگاه‌ها این وضعیت چندان منطقی به نظر نمی رسد و یا حاکی از عدم حضور عوامل بیماریزا است. یعنی این اکوسیستم حداقل از نظر شرایط تعادل بستر خاک دچار اختلال شده و آمادگی شرایط شیوع بیماری را دارد. از سوی دیگر نتایج مقایسهٔ میانگین افق‌های مختلف در دو گروه اکوسیستم مطالعه شده موید افت شدید فعالیت آنزیمی و در نتیجه فعالیت ارگانیسم‌های تولید کنندهٔ این آنزیم در خاک اکوسیستم‌های دارای درختان بیمار به نسبت گروه دوم است. در واقع این کاهش موید افت توان بیولوژیک در خاک این مناطق است. این امر نیز می‌تواند تاییدی بر تاثیر ایجاد اختلال در نظام حاکم بر این اکوسیستم‌ها باشد.

در واقع یک اکوسیستم جنگلی مجموعهٔ بسیار پیچیده‌ای از موجودات و عوامل زیستی است که نه تنها از نظام حاکم بر شرایط درونی خود متاثر است بلکه از تغییرات به وجود آمده در سایر اکوسیستم‌های مجاور نیز که در ارتباط با آن هستند تاثیر می پذیرد. به همین دلیل توقف فعالیت‌های انسانی تنها در یک منطقهٔ محدود نمی‌تواند تضمین کنندهٔ سلامت جنگل و حفظ تعادل طبیعی اکوسیستم باشد، زیرا میزان تاثیر بسیاری از اختلالات به وجود آمده در جنگل برای بشر ناشناخته است ، بنابراین هر تغییرجزئی در هر یک از اجزای اکوسیستم در یک فضای چند بعدی عمل کرده و می‌تواند سر منشا اختلالات خرد و کلان بی‌شماری در اکوسیستم گردد(۴، ۵، ۷ ، ۸). بدون شک اکوسیستم‌های مختلف جنگلی، دارای ظرفیت‌های پذیرش و ترمیم در سطوح متفاوتی هستند(۴، ۵ ، ۱۲). به همین دلیل و با درنظر گرفتن نتایج این پژوهش می‌توان گفت که برای جلوگیری از شیوع این بیماری و در نهایت انقراض گونهٔ ملج تنها یافتن فنوتیپ‌های و یا حتی ژنوتیپهای سالم ملج راه حل نهایی نیست بلکه نجات این گونهٔ ارزشمند علاوه بر حفظ ژنوتیپ‌های مقاوم و فنوتیپ‌های سالم نیازمند شناخت اکوسیستم‌های متعادل و تلاش در جهت حفظ تعادل طبیعی این اکوسیستم‌هاست. شایان ذکر است که برای مطالعهٔ تعادل طبیعی در اکوسیستم می‌توان از تکنیک‌های مختلفی استفاده کرد که مطالعات آنزیمی خاک تنها یکی از آنهاست و در صورتی که از چند پارامتر برای این مطالعه استفاده شود نتایج دقیق‌تری بدست می‌آید. به این ترتیب پایداری و سلامت درختان ملج محصول بر هم کنش کلیهٔ عوامل درونی (فیزیوژنتیک) و بیرونی آللوپاتیک است و حفاظت از این میراث ارزشمند نیازمند اعمال یک مدیریت جامع و همه جانبه است. شایان ذکر است که بر خلاف نظر برخی از پژوهشگران، اقدامات حفاظتی در یک منطقهٔ محدود از اکوسیستم‌های جنگل‌های شمال کشور به تنهایی نمی‌تواند متضمن بقای آنها باشد زیرا شبکهٔ حیات در برگیرندهٔ مجموعه‌ای از زنجیره‌های غذایی و ارتباطات درونی است که بروز اختلال در یک زنجیرهٔ کوچک ممکن است منجر به بروز فاجعه‌ای جبران ناپذیر گردد(۷ و ۱۲). بنابراین بهتر است که علاوه بر توقف مطلق فعالیت‌های بشری در برخی از اکوسیستم‌های بکر و دخالتهای حساب شده در اکوسیستم‌های پیرامونی آنها، به دنبال بهره‌وری هوشمندانه از طبیعت با الهام از الگوهایی باشیم که مادر طبیعت به ما ارائه می نماید. تا این میراث ارزشمند گذشتگان سرمایهای برای آیندگان نیز باشد.

منابع مورد استفاده

۱ - شیروانی، الف. ۱۳۷۷؛ طبقه بندی ژنوتیپهای ملج (*Ulmus glabra* Hudson) در رویشگاه‌های شمال کشور، پایان نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۹ ص

2-Dick, Richard P. 2000, Soil enzyme stability as an ecosystem indicator. National Center for Environmental Research. 4 p.

3-Evenson, F. J. St. 1982; Soil enzymes in methods of soil analysis. Chemical and microbial properties, ed. pp. 909-947. American Society of Agronomy. Madison.

4-Gershuny, Grace, and Joe Smillie. 1995, The soul of soil: A guide to ecological management, 3rd edition. ag. Access, Davis, CA. 158 p.

5-Korori, S.A.A., Jalili, A., Khoshnevis, M., Matinizadeh, M., Shirvany, A., Teimouri, M. and Rahmani, A.2004; Losses inflicted on plant communities (uncultivated) in southern ecosystems of Iran as

Archive of SID
www.SID.ir

a consequence of the Iraq-Kuwait war in 1991. UNCC claim report number 5000427.

6-Kramer, S. Green. Douglas. 2000; M. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. Soil Biology & Biochemistry 32 179-188.

7-Pimentel, D. et al. 1995; Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. Science. Vol. 267, No24.p.1117-1122.

8-Sachs, Paul D. 1999; Edaphos: Dynamics of natural soil system, 2nd edition. The Edaphic Press. Newbury, VT. 197 p.

9-Schloter, M. Dilly, O. Munch, J.C. 2003, Indicators for evaluating soil quality. Agriculture, Ecosystems and Environment 98: 255–262.

10-Scinner, F., E. Shlinger, E. Kandeler and R. Margesin. 1996, Methods in soil Biology. Springer. 422pp.

11-Taylor, J. P. Wilson, B. Mills, M.S. Burns, R.G. 2002, Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoil using various techniques. Soil biology & Biochemistry. 34:387-401.

12-Trasar-Cepeda, C. Leiro´s, M.C. Seoane, S. Gil-Sotres, F. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. Soil Biology & Biochemistry. 32: 1867–1875.

General Linear Model: Horizon 20-30 cm versus Group

Factor	Type	Levels	Values
Group	fixed	2	Diseased Health

Analysis of Variance for Horizon, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Group	1	1741926	1741926	1741926	13.63	0.001
Error	40	5110774	5110774	127769		
Total	41	6852701				

Level	N	Mean	StDev
Health (	30	620.9	410.3
Diseased	12	170.1	143.8

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals
Response Variable Horizon
All Pairwise Comparisons among Levels of Group

Group = Diseased subtracted from:

Level	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Health	450.8	122.1	3.692	0.0007

General Linear Model: Horizon 30-40 cm versus Group

Factor	Type	Levels	Values
Group	fixed	2	Diseased Health

Analysis of Variance for Horizon, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Group	1	1319213	1319213	1319213	12.68	0.001
Error	40	4162162	4162162	104054		
Total	41	5481375				

Level	N	Mean	StDev
Health	30	512.1	375.9
Diseased	12	119.7	76.0

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals
Response Variable Horizon
All Pairwise Comparisons among Levels of Group

Group = Diseased subtracted from:

Level	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Health	392.3	110.2	3.561	0.0010

Model: Horizon 0-10 cm versus Group

Factor	Type	Levels	Values
Group	fixed	2	Diseased Health

Analysis of Variance for Horizon, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Group	1	1647254	1647254	1647254	5.69	0.022
Error	40	11573523	11573523	289338		
Total	41	13220776				

Level	N	Mean	StDev
Health	30	977.9	575.7
Diseased	12	539.5	422.3

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals
Response Variable Horizon
All Pairwise Comparisons among Levels of Group

Group = Diseased subtracted from:

Level	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Health	438.4	183.7	2.386	0.0219

General Linear Model: Horizon 10-20 cm versus Group

Factor	Type	Levels	Values
Group	fixed	2	Diseased Health

Analysis of Variance for Horizon, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Group	1	2657180	2657180	2657180	11.76	0.001
Error	40	9036007	9036007	225900		
Total	41	11693187				

Level	N	Mean	StDev
Health	30	799.0	534.9
Diseased	12	242.3	258.9

Tukey 95.0% Simultaneous Confidence Intervals
Response Variable Horizon
All Pairwise Comparisons among Levels of Group

Group = Diseased subtracted from:

Level	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
Health	556.8	162.3	3.430	0.0014

www.SID.ir