

بررسی تمایز فرم تنه درخت راش توسط نشانگرهای ژنی ایزوآنزیمی

پروین صالحی شانجانی^{۱*}، محمدحسن عصاره^۲ و محسن کلاگری^۳

۱- نویسنده مسئول مکاتبات: استادیار پژوهشی، بانک ژن منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

پست الکترونیک: psalehi@rifr-ac.ir

۲- دانشیار پژوهشی، گروه زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۳- استادیار پژوهشی، گروه تحقیقات صنوبر و درختان سریع‌الرشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۷/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۲/۲۲

چکیده

گونه راش (*Fagus orientalis* Lipsky) یکی از درختان مهم جنگل‌های ایران بوده و اهمیت ویژه‌ای به لحاظ اکولوژیکی و اقتصادی دارد. در توده‌های راش، درختانی با مورفولوژی خاص تنه (مثل تنه‌های چنگالی) اغلب به صورت گروهی مشاهده می‌شوند که علت آن انتشار محدود گرده و به ویژه بذر در توده‌های طبیعی و ساختار فامیلی می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش بررسی وجود رابطه بین گوناگونی مورفولوژیکی تنه و تنوع ژنتیکی است. در کل ۶۸ درخت بدفرم (چنگالی) و خوش‌فرم (میانرو) از یک توده راش در جنگلهای خزری ایران با استفاده از الکتروفورز ژل نشاسته ۱۶ لوکوس آنزیمی مطالعه گردید. مقایسه عملهای تنوع ژنتیکی بین درختان بدفرم و خوش‌فرم تفاوت مهمی از نظر میانگین تعداد آلل در لوکوس، تعداد آلل با فراوانی $\leq 95\%$ در لوکوس، تعداد مؤثر آلل، اندیکس شانون، هتروزیگوزیتی مورد انتظار را نشان نداد. با این وجود، در گروه درختان بدفرم آلل خصوصی مشاهده گردید که برای فرایندهای سازگاری آینده اهمیت دارد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، میزان دگرلقاحی برای تمام درختان بررسی شده بالا بود. نبودن تمایز ژنتیکی آشکار بین گروه‌های بدفرم و خوش‌فرم درختان راش نشان می‌دهد که کاربرد نتایج مارکرهای آنزیمی در تمایز ویژگی‌های سازگاری بایستی با احتیاط دنبال شود. مشاهده آلل خصوصی در گروه درختان بدفرم ما را به ادامه تحقیق بر روی این موضوع با سایر مارکرها ترغیب می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، جنگل‌های خزری، چنگالی شدن، راش، مارکرهای آنزیمی.

مقدمه

درخت می‌تواند تشکیل شوند. ایجاد چنگال بر روی تنه نقصی است که باعث بدفرم شدن درخت شده و طول تنه را کاهش می‌دهد (Drénou, 2000).
از آنجایی که در توده‌های راش، درختانی با مورفولوژی خاص تنه (مثل تنه‌های چنگالی) اغلب به صورت گروهی

اصطلاح "چنگال" در یک درخت، به محوری اطلاق می‌شود که به دو یا چند محور هم‌اندازه تقسیم شده و این چند محور با هم زاویه‌های حاده ایجاد کنند. چنگالها روی تنه یا روی شاخه‌ها در زمانهای مختلفی از زندگی یک

می‌باشند. بررسی گوناگونی آلوزیمی که ناشی از تغییرات در توالی‌های DNA رمزکننده پروتئین می‌باشد از روش‌های متداول در زیست‌شناسی جوامع گیاهیست (Tanksey, 1983؛ Wendel & Weeden, 1989). کاربرد الکتروفورز ژل نشاسته (Smithies, 1955)، ظاهرسازی هیستوشیمیایی آنزیم‌ها روی ژل (Hunter & Markert, 1957) و مطالعات کلاسیک Harris (۱۹۶۶)، Lewontin و Hubby (۱۹۶۶) تحول عظیمی در شناخت فرایندهای تکامل ایجاد نمود (Wang & Szmidt, 2001). امروزه هنوز هم نشانگرهای ایزوزیمی اغلب یکی از بهترین ابزارها برای پاسخ به سؤالات موجود در ژنتیک حفاظت درختان جنگلی شناخته می‌شوند (Young *et al.*, 2000). برخی پژوهش‌ها با اشاره به رابطه بین گوناگونی فراوانی‌های آلی برخی آنزیمها و شرایط محیطی، به نقش احتمالی سازگاری آن آل‌ها تأکید می‌کنند (Thiébaud *et al.*, 1982؛ Comps *et al.*, 1990, 1991؛ Gömöry *et al.*, 1992؛ Belletti & Lanteri, 1996). اولین مطالعه در مورد تنوع ژنتیکی پراکسیدازها و گلوتامات اکسالوآستات-ترانس آمینازها به وسیله Thiébaud و همکاران (۱۹۸۲) بر روی یک گروه از جوامع راش در فرانسه انجام شد. نتایج فوق‌حاکمی از وجود رابطه بین فراوانی آلوزیم‌های پراکسیداز و دما و رطوبت هوا بود با آزمایش دیگری با جوامع بیشتر توسط Felber و Thiébaud (۱۹۸۴) تأیید شد. Müller-Starck (۱۹۸۵ و ۱۹۸۹) با مطالعه جوامع آسیب‌دیده و ظاهراً سالم راش در آلمان نشان داد که هتروزیگوسیتی درختان بردبار به تنش، بیشتر از درختان حساس است.

با توجه به نقش آنزیمها در فیزیولوژی و سازگاری گیاه و نیز وجود شواهد بسیار که حاکی از متفاوت بودن پاسخهای آلوزیمی گیاهان مقاوم و حساس به تنشهاست. هدف از

مشاهده می‌شوند بنظر می‌رسد ویژگی بدفرم شدن توارثی باشد. شناخت پدیده چنگالی شدن در راش و وراثت‌پذیری آن در هر دو توده‌های مصنوعی و طبیعی اهمیت داشته و مطالعه ژنتیکی بودن چنگالی شدن در توده‌های طبیعی از آن جهت مهم است که می‌تواند بر روی مدیریت و عملیات پرورشی توده‌های طبیعی تأثیر بگذارد.

چنگالی شدن از مباحث بسیار بحث‌برانگیز و مهمی است که نیازمند مطالعه کاوشگرانه است. پیدایش پدیده چنگالی شدن متأثر از عوامل بسیاری است که می‌توان به ویژگیهای خود گونه، مدیریت ناصحیح و تغییرات ناگهانی در محیط پیرامون درخت مثل خشکی‌های شدید، سرماهای حاد یا طوفان و حمله حشرات نسبت داد (Nicolini *et al.*, 2001). مطالعات نشان داده‌اند که بدفرم شدن تنه راش ارتباط مستقیمی با توان آسیب‌دیدگی جوانه به یژه در دوره نهالی دارد (Miller, 1953). زمان شکوفایی جوانه از ویژگی‌های فنوتیپی است که رابطه زیادی با سازگاری درخت داشته و توارث‌پذیری بالایی دارد (Billington & Wuehlisch *et al.*, 1991؛ Pelham, 2000؛ Howe *et al.*, 1995؛ Kramer, 2005). نتایج چندین آزمون استانی در راش اروپا نشان داده است که زمان شکوفایی جوانه و بنابراین خطر آسیب سرمازدگی دیررس بهاره بر زنده‌مانی، رشد و از همه مهمتر فرم تنه تأثیر دارد. به طوری که بنظر می‌رسد تأخیر در باز شدن جوانه‌ها عامل حفاظتی خوبی در برابر آسیب ناشی از یخ‌زدگی بهاره دیررس باشد (Jazbec *et al.*, 2007).

کاربرد مارکرهای مولکولی نقش مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی موجودات زنده دارد. آلوزیم‌ها اشکال مختلف آنزیمی هستند که به وسیله آل‌های مختلف یک لوکوس به رمز درآمده و به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی قابل استفاده

روش‌های آماری

برای هر فرد، ژنوتیپ‌های دیپلوئید شماره‌گذاری و فراوانی‌های آللی محاسبه شد. فراوانی‌های آللی در میان گروه درختان خوش‌فرم و بدفرم با استفاده از آزمون مربع‌کای بررسی گردید (Raymond & Rousset, 1995). میانگین تعداد آلل‌ها در لوکوس (Na)، تعداد آلل‌ها با فراوانی مساوی یا بیش از ۵٪، آللهای خصوصی^۱ (با فراوانی کمتر از ۵٪)، پلی‌مورفیسم لوکوس‌ها، تعداد مؤثر آلل، اندیکس شانون و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، مشاهده شده (Ho) و کل (He) با نرم‌افزار GeneAlex (Peakal & Smouse, 2006) محاسبه گردید. مقادیر آماری F ارائه شده توسط Wright (۱۹۳۱ و ۱۹۵۱) با استفاده از مقدار هتروزیگوسیتی، سه سطح لقاح درون‌گروهی Fit: شاخص ثبوت درون‌گروهی، Fit: شاخص ثبوت کل جمعیت و Fst: کاهش شاخص ثبوت بین گروه‌های درختان بدفرم و خوش‌فرم را نشان می‌دهد (Brown & Weir, 1983; Barrett & Shore, 1990). مقادیر فوق برای بررسی هر گونه انحراف از مقادیر هاردی-وینبرگ در جمعیت و تمایز ژنتیکی بین درختان بدفرم و خوش‌فرم به کار می‌روند. آزمون Assignment (Paetkau et al., 1995) که در آن با استفاده از توزیع آللهای مشاهده شده برای تمایز بین درختان بدفرم و خوش‌فرم استفاده می‌شود محاسبه گردید. اطلاعات حاصل از داده‌های آلوزیمی درختان به روش تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2004) مطابق Li و Nei (۱۹۷۹) تحلیل شد. برای مطالعه تشابه ژنتیکی فاصله بین افراد از ضریب جاکارد (Jacard) و برای تعیین ادغام گروه‌ها از UPGMA استفاده گردید.

انجام این تحقیق این است که با بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ آنزیم در درختان بدفرم و خوش‌فرم جمعیت خیرود در ارتفاع ۱۲۰۰ متر از سطح دریا، امکان استفاده از نشانگرهای ایزوزیمی ژنی در تمایز فرم درخت مطالعه گردد.

مواد و روشها

نمونه گیاهی از ۶۸ درخت راش شامل ۳۸ درخت خوش‌فرم (تنه بدون انشعاب و میانرو) و ۳۰ درخت بدفرم (۱۰ متر اول تنه دو یا چند شاخه و چنگالی) از ارتفاع ۱۲۰۰ متری از سطح دریا در جنگل خیرودکنار نوشهر جمع‌آوری گردید. استخراج آنزیم از بافت جوانه خواب و بافت پوستی شاخه‌های هر درخت انجام شد و همگناها به وسیله دستگاه الکتروفورز افقی ژل نشاسته ۱۲٪ تفکیک گردیدند (صالحی شانجانی ۱۳۸۱).

گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های راش با استفاده از ۱۰ سیستم آنزیمی رمز کننده ۱۶ لوکوس ژنی به این ترتیب مطالعه شدند: آزمون ژنی وراثت تک‌تک ایزوآنزیم‌ها و تفسیر زیموگرام‌ها از روش Thiébaud و همکاران (۱۹۸۲) (برای پراکسیداز) Merzceau و همکاران (۱۹۸۹) (برای منادیون ردوکتاز، ایزوسیترات دهیدروژناز، فسفوگلوکز ایزومراز، مالات دهیدروژناز و فسفوگلوکوموتاز)، Müller-Starck و Starke (۱۹۹۳) (برای شیکیمات دهیدروژناز، ۶- فسفوگلوکونات دهیدروژناز، لوسین آمینوپیتیداز و آنزیم گلوتامات-اکسالواستات ترانس آمیناز) انجام گردید. لوکوس‌ها به وسیله نام اختصاری آنزیم نام‌گذاری شده و براساس سرعت حرکت (کاتدی‌ترین ناحیه به‌عنوان لوکوس A و دومین لوکس قبل آن B و غیره) حرف‌گذاری شدند (صالحی شانجانی، ۱۳۸۲، ۱۳۸۴ و ۱۳۸۶).

1- Private alleles

بررسی تمایز فرم تنه درخت راش توسط...

جدول ۱- اطلاعات کلی در مورد سیستم‌های آنزیمی، شماره آنزیمی (EC) و تعداد آلل‌های مشاهده شده

سیستم آنزیمی	طبقه آنزیمی	شماره EC	لوکوس‌های پلی مورفیک	تعداد آلل مشاهده شده	ساختمان چهارم	گروه بندی آنزیم
۱ پراکسیداز	اکسیدوردوکتازها	۱.۱۱.۱.۷	PX-A	۲	منومر	متابولیسم ثانوی
			PX-B	۲	منومر	
۲ لوسین آمینوپپتیداز	هیدرولازها	۳.۴.۱۱.۱	LAP-A	۲	منومر	متابولیسم ثانوی
			LAP-B	۲	منومر	
۳ گلو تامات اکسالو استات ترانس آمیناز	ترانسفرازها	۲.۶.۱.۱	GOT-A	۲	دایمر	متابولیسم اولی
			GOT-B	۱	دایمر	
۴ منادیون ردوکتاز	اکسیدوردوکتازها	۱.۶.۹۹.۲	MNR-A	۲	تترامر	متابولیسم ثانوی
۵ ایزوسیترات دهیدروژناز	اکسیدوردوکتازها	۱.۱.۱.۴۲	IDH-A	۱	دایمر	متابولیسم اولی
			MDH-A	۲	دایمر	
۶ مالات دهیدروژناز	اکسیدوردوکتازها	۱.۱.۱.۳۷	MDH-B	۲	دایمر	متابولیسم اولی
			MDH-C	۲	منومر	
۷ فسفوگلوکوز ایزومراز	ایزومرازها	۵.۳.۱.۹	PGI-A	۲	دایمر	متابولیسم اولی
			PGI-B	۲	دایمر	
۸ فسفوگلوکوز موتاز	ترانسفرازها	۲.۷.۵.۱	PGM-A	۲	منومر	متابولیسم اولی
۹ شیکیمات دهیدروژناز	اکسیدوردوکتازها	۱.۱.۱.۲۵	SKDH-A	۳	منومر	متابولیسم ثانوی
۱۰ فسفو گلوکونات دهیدروژناز	اکسیدوردوکتازها	۱.۱.۱.۴۴	6PGDH-A	۳	دایمر	متابولیسم اولی

جدول ۲- فراوانی آللی درختان خوش فرم و بد فرم

لوکوس	آلل	بد فرم	خوش فرم
Px-A	A	۰/۳۱۷	۰/۳۱۶
	B	۰/۶۸۳	۰/۶۸۴
Px-B	A	۰/۷۶۷	۰/۷۶۳
	B	۰/۲۳۳	۰/۲۳۷
Lap-A	B	۰/۹۰۰	۰/۹۳۴
	C	۰/۱۰۰	۰/۰۶۶
Lap-B	B	۰/۶۸۳	۰/۶۱۸
	C	۰/۳۱۷	۰/۳۸۲
Got-A	B	۰/۷۳۳	۰/۶۵۸
	C	۰/۲۶۷	۰/۳۴۲
Got-B	B	۱/۰۰	۱/۰۰
Mnr-A	A	۰/۲۱۷	۰/۱۵۸
	B	۰/۷۸۳	۰/۸۴۲
Idh-A	B	۱/۰۰	۱/۰۰
Mdh-A	C	۰/۵۳۳	۰/۵۲۶
	E	۰/۴۶۷	۰/۴۷۴

ادامه جدول ۲- فراوانی آللی درختان خوش فرم و بدفرم

خوش فرم	بدفرم	آلل	لوکوس
۰/۰۰	۰/۰۵۰	A	Mdh-B
۱/۰۰	۰/۹۵۰	C	
۰/۰۱۳	۰/۰۱۷	A	Mdh-C
۰/۹۸۷	۰/۹۸۳	B	
۰/۹۴۷	۰/۹۱۷	B	Pgi-A
۰/۰۵۳	۰/۰۸۳	C	
۰/۰۲۶	۰/۰۳۳	A	Pgi-B
۰/۹۷۴	۰/۹۶۷	B	
۰/۰۱۳	۰/۰۳۳	A	Pgm-A
۰/۹۸۷	۰/۹۶۷	B	
۰/۸۴۲	۰/۸۳۳	B	Skdh-A
۰/۰۵۳	۰/۰۶۷	C	
۰/۱۰۵	۰/۱۰۰	D	
۰/۵۳۹	۰/۴۸۳	B	6Pgd-A
۰/۴۴۷	۰/۵۰۰	C	
۰/۰۱۳	۰/۰۱۷	D	

جدول ۳- عاملهای تنوع و تمایز ژنتیکی براساس لوکوسها (ستاره‌دارها نشان انحراف (با سطح اطمینان بالای ۹۵٪) از ساختار ژنوتیپی مورد انتظار از قانون هاردی-وینبرگ است، اعداد تیره نشان‌دهنده نقصهای هتروزیگوزیتی مهم است).

Nm	Fst	Fit	Fis	Ho	He	Ht	
۲۸۱۰۰۹/۵۰۰	۰/۰۰	-۰/۲۶۴	-۰/۲۶۴*	۰/۵۴۶	۰/۴۳۲	۰/۴۳۲	Px-A
۱۴۶۰۵/۷۵۰	۰/۰۰	۰/۵۰۲	۰/۵۰۲*	۰/۱۷۹	۰/۳۶۰	۰/۳۶۰	Px-B
۶۴/۷۰۷	۰/۰۰۴	-۰/۰۹۰	-۰/۰۹۵	۰/۱۶۶	۰/۱۵۱	۰/۱۵۲	Lap-A
۵۳/۶۷۹	۰/۰۰۵	-۰/۰۲۷	-۰/۰۳۲	۰/۴۶۷	۰/۴۵۲	۰/۴۵۴	Lap-B
۳۶/۹۵۵	۰/۰۰۷	۰/۱۷۱	۰/۱۶۶*	۰/۳۵۱	۰/۴۲۱	۰/۴۲۳	Got-A
-	-	-	-	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	Got-B
۴۳/۸۱۵	۰/۰۰۶	۰/۲۷۱	۰/۲۶۷*	۰/۲۲۲	۰/۳۰۳	۰/۳۰۴	Mnr-A
-	-	-	-	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	Idh-A
۵۰۵۸/۲۵۰	۰/۰۰	-۰/۳۰۳	-۰/۳۰۳*	۰/۶۴۹	۰/۴۹۸	۰/۴۹۸	Mdh-A
۹/۵۰۰	۰/۰۰۲۶	-۰/۰۲۶	-۰/۰۵۳	۰/۰۵۰	۰/۰۴۸	۰/۰۴۹	Mdh-B
۲*۱۱۹/۹۳۷	۰/۰۰	-۰/۰۱۵	-۰/۰۱۵	۰/۰۳۰	۰/۰۲۹	۰/۰۲۹	Mdh-C
۶۶/۹۶۹	۰/۰۰۴	-۰/۰۷۳	-۰/۰۷۷	۰/۱۳۶	۰/۱۲۶	۰/۱۲۷	Pgi-A
۵۸۷/۳۱۳	۰/۰۰	-۰/۰۳۱	-۰/۰۳۱	۰/۰۶۰	۰/۰۵۸	۰/۰۵۸	Pgi-B
۵۵/۵۳۰	۰/۰۰۴	-۰/۰۲۴	-۰/۰۲۸	۰/۰۴۶	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	Pgm-A
۹۴۱/۷۴۵	۰/۰۰	۰/۲۱۹	۰/۲۱۹*	۰/۲۲۲	۰/۲۸۴	۰/۲۸۴	Skdh-A
۸۶/۳۴۵	۰/۰۰۳	۰/۰۲۰	۰/۰۱۷	۰/۵۰۴	۰/۵۱۲	۰/۵۱۴	6Pgd-A
۵۹/۵۰۳	۰/۰۰۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۰				میانگین

جدول ۴- مقایسه ویژگیهای ژنتیکی در درختان خوش فرم و بدفرم راش

بدفرم	خوش فرم	جمعیت
$2 \pm 0/13$	$1/94 \pm 0/14$	میانگین تعداد آلل در لوکوس
$1/75 \pm 0/14$	$1/69 \pm 0/15$	میانگین تعداد آلل با فراوانی $\leq 5\%$ در لوکوس
$1/4 \pm 0/09$	$1/39 \pm 0/01$	تعداد موثر آلل
$0/38 \pm 0/07$	$0/35 \pm 0/07$	اندیکس شانون
$0/06 \pm 0/06$	0	تعداد آلل خصوصی
$0/24 \pm 0/05$	$0/22 \pm 0/05$	هتروزیگوزیتی

نتایج

پلی مورفیسم سیستم های آنزیمی

GOT-A و GOT-B) شامل دو آلل با تحرک نسبی ۱۰۰ و ۹۵ در لوکوس GOT-A و یک آلل در لوکوس GOT-B (عدم پلی مورفیسم) نسبت داده می شوند. آنزیم های حاصل از هر دو لوکوس دایمر هستند. منادیون ردوکتاز به وسیله یک لوکوس MNR-A با ۲ آلل دارای تحرک نسبی ۱۰۰ و ۷۴ رمز می شود و ساختار آنزیمی آن تترامری است. ایزوزیم های ایزوسیترات دهیدروژناز به وسیله دو لوکوس ژنی رمز می شود که ناحیه اول فعالیت (IDH-A) منومورف و ناحیه دوم فعالیت روی ژل (IDH-B) رنگ پذیری کمی داشت و قابل بررسی نبود. ملات دهیدروژناز به وسیله ۳ لوکوس آنزیمی (MDH-A¹، MDH-B و MDH-C) رمز می شود. در هر سه لوکوس ۲ شکل آللی مشاهده گردید. بیان فنوتیپی لوکوس MDH-A بسیار مشابه به MDH-B است و هر دو آنزیم تولید شده به وسیله این لوکوس ها دایمری می باشند. در حالی که آنزیم حاصل از لوکوس MDH-C منومری است. در لوکوس MDH-C در حقیقت ۴ شکل آللی وجود دارد.

تعداد ۱۰ سیستم آنزیمی رمز کننده ۱۶ لوکوس در این پژوهش بکار گرفته شده است تا امکان استفاده از آنزیم ها به عنوان مارکری برای درختان خوش فرم از بدفرم بررسی گردد (جدول ۱). مشاهده باندها بر روی ژل نشان می دهد که پراکسیداز (PX) به وسیله ۳ لوکوس ژنی رمز می شود، به طوری که ۳ ناحیه فعالیت روی ژل ظاهر می شود که دو ناحیه دارای فعالیت کافی و پایدار هستند و تحت عنوان PX-A و PX-B بررسی می شوند. بیان ناحیه سوم وابسته به فصل رویشی است که در این مطالعه لحاظ نگردید. آنزیم های تولید شده به وسیله هر دو لوکوس منومر می باشند. دو آلل با تحرک نسبی ۱۰۰ و ۱۰۵ در PX-A و ۲ آلل با تحرک نسبی ۳۹ و ۵۲ در PX-B مشاهده شدند. لوسین آمینوپپتیداز به وسیله ۲ لوکوس آنزیمی (LAP-A و LAP-B) رمز می شود. در هر دو لوکوس دو شکل آللی با تحرک نسبی ۱۰۰ و ۹۷ در لوکوس LAP-A و تحرک نسبی ۱۰۰ و ۹۸ در لوکوس LAP-B مشاهده گردید. ساختار آنزیمی تولید شده به وسیله هر دو لوکوس منومر می باشد. ایزوآنزیم های گلوتامات-اکسالوآستات ترانس آمیناز به دو لوکوس

۱- MDH-A به عنوان اولین لوکوس در تمام جوامع غربی و مرکزی راش اروپایی کاملاً منومورفیک است. به طوری که بسیاری از محققان از ارزیابی آن ممانعت نموده اند. در صورتی که این لوکوس در راش شرقی جوامع بالکان پلی مورفیک می شود (Vyšny, 1997).

6PGD-A و SKDH-A, MNR-A, GOT-A, PX-B
نقص هتروزیگوسیتی مشاهده می‌شود.

مقادیر آماری F نشان می‌دهد که جمعیت خیرود در تعادل بوده و یا نقص جزئی در هتروزیگوت دارند (جدول ۳). عموماً مقدار مثبت جزئی Fis و Fit نشان‌دهنده انحراف جزئی از معادله هاردی-وینبرگ به طرف افزایش هموزیگوت‌ها است. به علاوه نتایج نشان دادند که اگرچه مقادیر Fis نشان‌دهنده نقص جزئی هتروزیگوت‌ها است ولی تعداد لوکوس‌هایی که زیادی^۱ هتروزیگوت (با مقادیر منفی Fis) نشان می‌دهند بیشتر از تعداد لوکوس‌هایی با نقص^۲ هتروزیگوت (با مقادیر مثبت Fis) است. مقدار Fst بیان‌کننده چگونگی شرکت تک‌تک لوکوس‌ها در تمایز ژنتیکی می‌باشد، از آن میان لوکوس MDH-B متمایزترین لوکوس می‌باشد. مقادیر کم Fst نشان‌دهنده درجه پایین پلی‌مورفیسم است.

جدول ۳ همچنین جریان ژن ۱۶ لوکوس را در جمعیت خیرود نشان می‌دهد. مقادیر محاسبه شده برای جریان ژن در میان لوکوس‌ها متغیر است، به طوری که از ۹/۵ در لوکوس MDH-B تا ۲۸۱۰۰۹/۵ در لوکوس PX-A با میانگین ۵۹/۵ متغیر است. میانگین جریان ژن در لوکوس‌های مختلف نشان می‌دهد که کمترین ژن از طریق لوکوس MDH-B و بیشترین ژن از طریق لوکوس PX-A جریان دارد. آنالیز تک‌تک ژنوتیپها بوسیله آزمون Assignment، نشان داد که میزان جریان ژن بین پایه‌ها زیاد می‌باشد، به طوری که تمایز بین پایه‌های بدفرم و خوش‌فرم امکان‌پذیر نمی‌باشد (شکل ۱).

ولی از آنجایی که سرعت مهاجرت آلل اول و دوم و نیز آلل سوم و چهارم بسیار شبیه هم است فقط دو آلل تفسیر گردید. در لوکوس MDH-C، بیشترین فراوانی آللی متعلق به آلل B می‌باشد. دو لوکوس به آنزیم فسفوگلوکز ایزومراز (PGI-B, PGI-A) نسبت داده می‌شود که ۲ شکل آللی در لوکوس‌های PGI-B, PGI-A مشاهده گردید. آنزیم تولید شده به وسیله هر دو لوکوس دایمر بود. فسفوگلوکز موتاز در یک لوکوس (PGM-A) با ۲ آلل که دارای تحرک نسبی ۱۱۲ و ۱۰۰ است رمز می‌شود. ساختار آنزیم منومری است. شیکیمات دهیدروژناز در یک لوکوس، SKDH-A، با ۳ آلل که دارای تحرک نسبی ۱۰۰، ۸۶ و ۷۲ است رمز می‌شود. آنزیم ساختمان منومری دارد. فسفوگلوکونات دهیدروژناز به وسیله ۳ لوکوس رمز می‌شود که 6PGD-A با ۳ آلل که دارای تحرک نسبی ۱۰۰، ۹۰ و ۸۰ هستند مورد مطالعه قرار گرفت. ساختمان آنزیم دایمری می‌باشد. در هیچ‌یک از لوکوس‌های آنزیم‌های مطالعه شده اختلاف مهمی (در سطح ۹۵٪) در فراوانی‌های آللی در بین درختان خوش‌فرم و بدفرم مشاهده نگردید (جدول ۲).

ویژگی‌های ژنتیکی در جمعیت راش خیرودکنار نوشهر

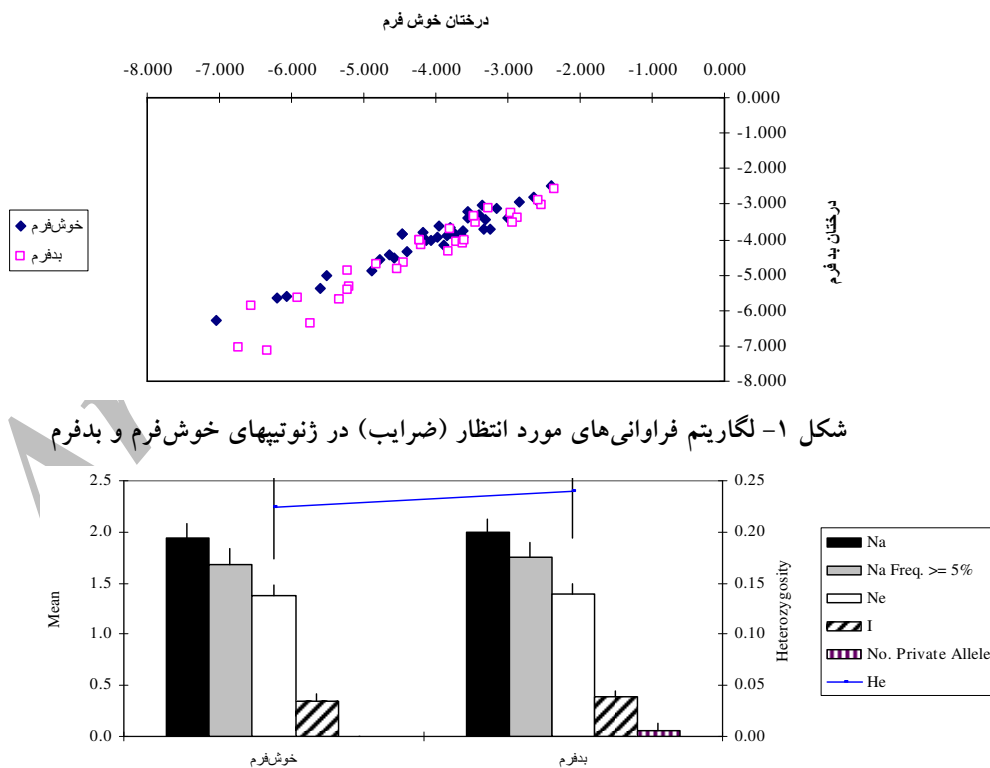
جدول ۳ هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار از معادله هاردی-وینبرگ را در سطح لوکوس‌ها نشان می‌دهد. هتروزیگوسیتی کل در ۱۶ لوکوس به طور چشمگیری از ۴/۵٪ در لوکوس PGM-A تا ۵۱/۴٪ در لوکوس 6PGD-A متغیر است. نتایج نشان می‌دهد اگرچه سهم هر یک از لوکوس‌ها برای تشکیل هتروزیگوسیتی متفاوت بود ولی در کل تعداد لوکوس‌هایی که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار باشد بیشتر است. به طوری که در لوکوس‌های

1- Excess
2- Deficit

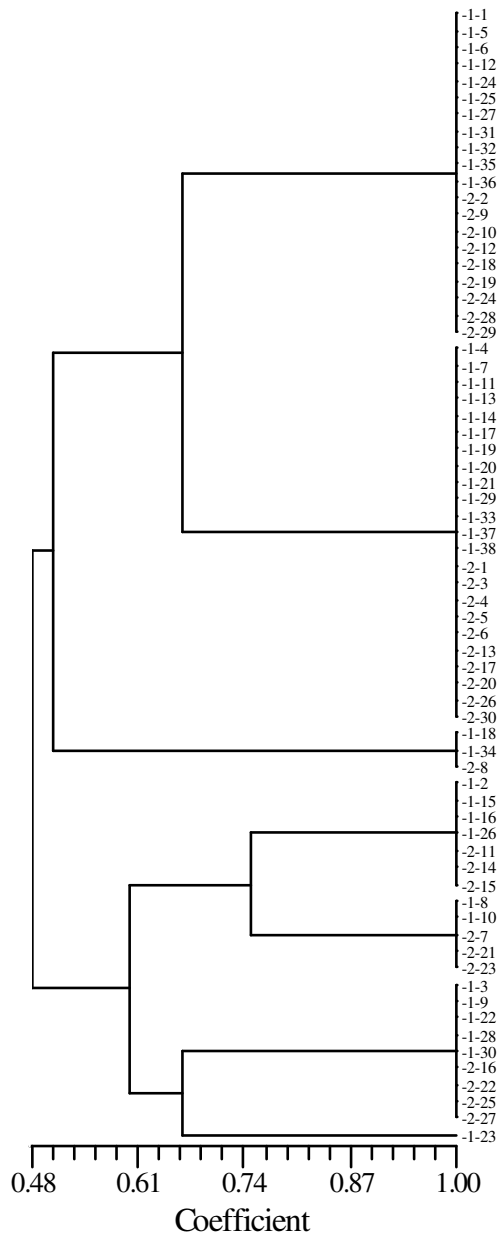
برای تشریح طرح تمایز درختان بدفرم و خوش فرم راش، شباهت ژنتیکی بین درختان مختلف براساس گوناگونی تک تک لوکوسها و نیز کل لوکوسها محاسبه و دندروگرامهای مربوطه رسم گردید. هیچ یک از دندروگرامهای حاصل از تک تک لوکوسها و کل لوکوسها نتوانست تمایز خاصی را بین درختان بدفرم و خوش فرم نشان دهد (شکل های ۳ و ۴). در اینجا از میان دندروگرامهای حاصل از تک تک آنزیمها فقط دندروگرام حاصل از شباهت ژنتیکی براساس آنزیم پراکسیداز به عنوان نمونه درج گردیده است (شکل ۳). همان گونه که در شکل های ۳ و ۴ مشاهده می گردد، خوشه های بسیاری در هر دو دندروگرام تشکیل شده است که در هیچ یک تمایز خاصی بین درختان بدفرم و خوش فرم مشاهده نگردید

تنوع و تمایز ژنتیکی بین درختان بدفرم و خوش فرم

نتایج مقادیر تنوع آلی و ژنتیکی در جدول ۴ در بین گروههای خوش فرم و بدفرم درختان راش منطقه خیرود نشان می دهد که در کل ۳۲ شکل آلی در ۱۶ لوکوس ژنی مشاهده شد که درصد پلی مورفیسم آنها در درختان بدفرم (۰/۸۷/۵) بیش از درختان خوش فرم بود. اگرچه میانگین تعداد آلل در لوکوس، تعداد آللها با فراوانی بیش از ۵٪، تعداد آلل مؤثر، اندیکس شانون، هتروزیگوزیتی درختان بدفرم اندکی بیش از درختان خوش فرم بود ولی اهمیت آن در سطح ۰/۱٪ معنی دار نبود (شکل ۲). تنها در یک لوکوس، آلل خصوصی با فراوانی کمتر از ۵٪ مشاهده شد که مربوط به لوکوس MDH-B بوده و فقط در درختان بدفرم وجود داشت.

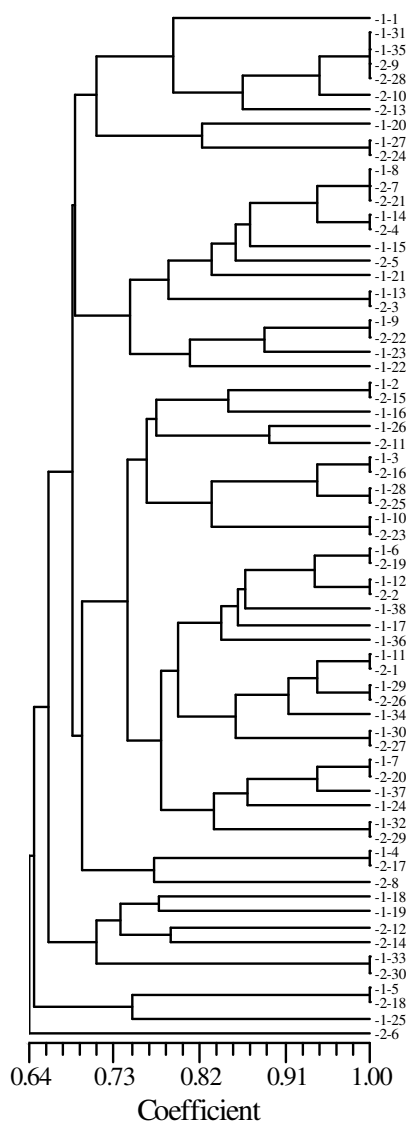


شکل ۲- مقایسه میانگین مقادیر تنوع ژنتیکی در گروه های درختان خوش فرم و بدفرم راش



شکل ۳- دندروگرام ۳۰ درخت بدفرم (با پیشوند ۲) و ۳۸ درخت خوش فرم (با پیشوند ۱) حاصل از مقادیر فراوانی آللی لوکوسهای آنزیم پراکسیداز

بررسی تمایز فرم تنه درخت راش توسط...



شکل ۴- دندروگرام ۳۰ درخت بدفرم (با پیشوند ۲) و ۳۸ درخت خوش فرم (با پیشوند ۱) حاصل از مقادیر فراوانی

آلی کل لوکوس‌های مورد مطالعه

بحث

ساختار ژنتیکی جوامع راش بوسیله مدل "جدا شدگی به وسیله فاصله" که توسط Wright (۱۹۴۳ و ۱۹۴۶) ارائه شده است توضیح داده می‌شود (Gregorius *et al.*, 1986; Comps *et al.*, 1990, 1991; Guguen *et al.*, 1988). براساس این مدل، احتمال لقاح بین دو فرد ارتباط معکوسی با فاصله جغرافیایی آنها دارد. بنابراین بیشترین احتمال تولیدمثل در جوامع راش ناشی از لقاح بین افراد خویشاوند است که باعث افزایش میزان خویشاوندی می‌شود. نقص هتروزیگوت مشاهده شده در بسیاری از جوامع راش درستی این فرضیه را تأیید می‌نماید (Merzeau *et al.*, 1994). گونه راش به‌عنوان یک گونه بادگرده‌افشان به‌رغم توان انتشار بالای گرده به نقاط دوردست ولی انتشار محلی بذر دارای گوناگونی ژنتیکی کمتری در بین جوامع بوده و گوناگونی ژنتیکی آنها بیشتر در بین گروه‌هایی از افراد خویشاوند است که در فاصله چند متری از هم قرار دارند، یعنی در آنها ساختار فامیلی مشاهده می‌شود (Hamrick *et al.*, 1993; Hamrick & Nason, 1996, 2000).

وجود ساختار فامیلی راش توسط مارکرهای مولکولی نیز قابل جستجو است. به طوری که مطالعه توزیع فضایی گوناگونی ژنتیکی توده‌های طبیعی راش توسط مارکرهای آلوزیمی و میکروساتلایتی حاکی از وجود ساختار فامیلی در بین گروه‌های مختلف درختان یک توده است (Wang, 2004, 2004; Vornam *et al.*, 2004; Asuka *et al.*, 2005). آنجایی که در توده‌های راش، درختانی با مورفولوژی خاص تنه (مثل تنه‌های چنگالی) اغلب به صورت گروهی مشاهده می‌شوند پس مطالعات فوق می‌تواند به صورت غیرمستقیم تأییدی بر توارثی بودن فرم درخت باشد. ولی

چنین مشاهداتی کافی نبوده و نیازمند مشاهدات مستندتری است. بدین منظور در این تحقیق تنوع و تمایز آلوزیمی ۱۶ لوکوس آنزیمی در درختان خوش‌فرم و بدفرم مطالعه گردیده و نتایج هیچ تفاوتی از نظر عملهای ژنتیکی را نشان نداد.

مطالعات نشان داده‌اند که راش به دماهای خیلی پایین زمستانه (حتی در مرحله بلوغ) حساس است (Pukacki, 1990). این حساسیت در مرحله نهالی بیشتر نمایان می‌شود. به طوری که نهال‌های راش به سرمازدگی دیررس بسیار حساس‌تر می‌باشند. نهال‌هایی که در اوایل بهار زودتر شکوفا می‌شوند بیشتر در معرض آسیب سرمازدگی قرار می‌گیرند، این مسئله باعث کاهش ارتفاع درختان (Hristov & Botev, 1981) و نامنظمی در فرم تنه (Myczkowski, 1955) می‌شود. از آنجایی که زمان شکوفایی جوانه یکی از ویژگی‌های فنوتیپی است که رابطه زیادی با سازگاری درخت داشته و توارث‌پذیری بالایی دارد (Billington & Pelham, 1991; Wuehlisch *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 2000; Saxe *et al.*, 2001; Chmura & Rożkowski, 2002; Ningre & Colin, 2007). پس درختان بدفرم از لحاظ ژنتیکی می‌باید با درختان خوش‌فرم تفاوت داشته باشند. برای اثبات فرضیه مطروح شده در این پژوهش از مارکرهای ایزوآنزیمی استفاده شد، زیرا برخی پژوهش‌ها با اشاره به رابطه بین گوناگونی فراوانی‌های آلی برخی آنزیمها و شرایط محیطی، به نقش احتمالی سازگاری آن آلل‌ها تأکید می‌کنند (Thièbaut *et al.*, 1982; Comps *et al.*, 1990; Belletti & Lanter, 1991; Gömöry *et al.*, 1992a; Müller-Starck, 1996). مطالعه Müller-Starck (۱۹۸۵ و ۱۹۸۹) نیز بر روی جوامع آسیب‌دیده و ظاهراً سالم راش اروپا در آلمان

al., 2002. با این وجود مواردی نیز مشاهده می‌شوند که بر نقش احتمالی سازگاری آلل‌های ایزوآنزیمی تأکید می‌کنند. به طوری که با استفاده از چندین لوکوس ایزوژیمی پلی مورف نشان داده شده است که اختلاف درون و میان جمعیتی در مناطق جنوبی اروپا افزایش پیدا می‌کند که از آن میان به وجود رابطه میان گوناگونی فراوانی آللی آنزیم پراکسیداز به تغییرات محیطی متأثر از عرض جغرافیایی یا ارتفاع از سطح دریا اشاره بیشتری شده است (Barrière et al., 1985؛ Comps et al., 1990, 1991؛ Paule et al., 1995). در این پژوهش الگوی گوناگونی لوکوسهای مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری بین درختان بدفرم و خوش‌فرم نشان نداده است.

با توجه به اثبات وجود ساختار فامیلی در بین گروه‌های مختلف درختان یک توده توسط مارکرهای مولکولی DNA (Wang, 2004؛ Vornam et al., 2004؛ Asuka et al., 2005)، نتایج این پژوهش هماهنگ با پژوهش قبلی (Dounavi, 2000) نشان می‌دهد که مارکرهای ژنی آنزیمی ابزار مناسبی برای مطالعه ژنتیکی بودن ویژگیهای سازگاری در درختان نیستند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد برای مطالعه تمایز ویژگی فرم درخت از مارکرهای دیگر سازگاری استفاده گردد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور با عنوان بررسی ویژگیهای ژنتیکی فرم درخت راش می‌باشد. بدین وسیله از کلیه کسانی که ما را به نحوی در انجام این پژوهش یاری نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

نشان داد که هتروزیگوسیتی درختان بردبار به تنش بیشتر از درختان حساس است. به‌رغم این نتایج مطالعه تنوع و تمایز آلوزیمی ۱۶ لوکوس آنزیمی در درختان خوش‌فرم و بدفرم در پژوهش حاضر هیچ تفاوت معنی‌داری را از نظر عاملهای ژنتیکی بین دو گروه درختان نشان نداده است. این نتایج موافق یافته‌هایی بود که Dounavi (۲۰۰۰) با بررسی ۹ لوکوس ژنی آنزیمی در درختان بدفرم و خوش‌فرم ۳ توده راش اروپا در آلمان نتوانست هیچ شواهدی از ارتباط بدفرم‌شدن با الگوهای ایزوآنزیمی پیدا کند. این مسئله می‌تواند ناشی از خنثی بودن گوناگونی آلوزیمی باشد.

بحث بر روی خنثی (بی‌اثر) بودن و یا سازگارکننده بودن گوناگونی آلوزیمی از مباحث بسیار بحث‌برانگیزی است که نظریات ضد و نقیضی در مورد آن داده شده است. به طوری که Kimura (۱۹۶۸ و ۱۹۶۹) اظهار می‌دارد پلی مورفیسم آنزیمی که در گونه‌های دگرلقاح مشاهده می‌شود ناشی از بی‌اثر یا تقریباً بی‌اثر بودن بیشتر موتاسیونهاست. درحالی که بسیاری از دانشمندان اعتقاد دارند گوناگونی ژنتیکی مشاهده شده قابلیت سازگاری دارد و آلل‌های متفاوت ویژگیهای بیوشیمیایی مختلفی نشان می‌دهند (Latter, 1975). در تأیید نظریه اول شواهد بسیاری نشان می‌دهند که اختلافات مهم در سطوح تنوع، تمایز و تکثر ژنتیکی میان جمعیتی گونه‌های راش وجود ندارد (Comps et al., Müller-Srarck & Ziehe, 1991؛ Gömöry et al., 1993؛ Larsen, 1996؛ Hazler et al., 1997؛ Salehi Shanjani et al., 1999؛ Salehi Shanjani et al., 2002). در پژوهشی که بر روی جمعیت‌های مختلف راش شرقی در ایران انجام شد هیچ الگو و تمایزی در گوناگونی هیچ یک از لوکوسهای آنزیمی مشاهده نگردید (Salehi Shanjani et al., 2002).

- in Piedmont, north western Italy. *Silvae Genetica*, 45: 1-4.
- Billington, H.L. and Pelham, J., 1991. Genetic variation in the data of budburst in Scottish birch populations: implications for climate change. *Functional Ecology*, 5: 403-409.
- Brown, A.H.D., and Weir, B.S., 1983. Measuring genetic variability in plant populations. In: Tanksley, S.D. and Orton, L., (Eds.). *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*, Elsevier, Amstredam, pp. 219-239.
- Chmura, D.J. and Rozkowski, R., 2002. Variability of Beech Provenances in Spring and Autumn Phenology. *Silvae Genetica*, 51: 2-3.
- Comps, B., Thiebaut, B. Paule, L., Merzeau, D., and Letouzey, J., 1990. Allozymic variability in beechwoods (*Fagus sylvatica* L.) over central Europe: spatial differentiation among and within populations. *Heredity*, 65: 407-417.
- Comps, B., Thiebaut, B., and Merzeau, D., 1991. Genetic variation in European beech stands (*Fagus sylvatica* L.): 110-124. In: Müller-Starck, G., and Ziehe, M.J.D., (Eds.). *Genetic Variation in European populations of forest trees*. Sauerlander's Verlag, Frankfurt, Germany. 180 p.
- Comps, B., Thiebaut, B., Sugar, I., Trinajstic, I. and Plazibat, M., 1993. Genetic variation of Croatian beech stands (*Fagus sylvatica* L.): spatial differentiation in connection with the environment. *Annales des Sciences Forestières*, 48: 15-28.
- Cuguen, J., Merzeau, D. and Thiebaut, B., 1988. Genetic structure of the European beech stand (*Fagus sylvatica* L.): F-statistics and importance of Mating system characteristics in their evolution. *Heredity*, 60: 91-100.
- Dounavi, A., 2000. Family structures in beech stands (*Fagus sylvatica*). Dissertation for PhD degree, University of Göttingen, 142 p.
- Drénou C., 2000. Pruning Trees: The Problem of Forks. *Journal of Arboriculture*, 26(5): 264-269.
- Felber, F. and Thiébaud, B., 1984. Etude préliminaire sur le polymorphisme enzymatique du Hêtre (*Fagus sylvatica* L.), Variabilité génétique de deux systemes de peroxydases enzymatique du Hêtre (*Fagus sylvatica* L.), Variabilité génétique de deux systemes de peroxydasesden relation avec les conditions écologiques. *Oecology of Plant*, 5: 133-150.
- Gömöry, D., Paule, L., Brus, R., Zhelev, P., Tomovic, Z., and Gracan, J., 1999. Genetic structure and Taxonomy of beech on Balkan Peninsula. *Journal of Evolutionary Biology*, 12: 746-754.
- Gömöry, D., Vyšný, J., Comps, B. and Thiébaud, B., 1992. Geographical patterns of genetic differentiation and diversity in European beech
- منابع مورد استفاده**
- صالحی شانجانی، پ.، ۱۳۸۶. تنوع ایزوزیمی فسفو گلوکوز ایزومراز، فسفو گلوکو موتاز، شیکیمات دهیدروژناز و فسفو گلوکونات دهیدروژناز راش *Fagus orientalis Lipsky* در راشتستان‌های ایران. مجله زیست شناسی ایران، ۱۹: ۳۷۹-۳۸۴.
- صالحی شانجانی، پ.، ۱۳۸۴. تنوع ایزوزیمی منادیون ردوکتاز، ایزو سیترات دهیدروژناز و ملات دهیدروژناز راش شرقی *Fagus orientalis Lipsky* در ایران. مجله زیست شناسی ایران، ۱۷: ۴۰۲-۴۲۰.
- صالحی شانجانی، پ.، ۱۳۸۲. تنوع ایزوزیمی پراکسیداز، لوسین آمینو پپتیداز و گلوتامات اکسالو استات ترانس آمیناز گونه *Fagus orientalis Lipsky* در راشتستان‌های ایران. مجله زیست شناسی ایران، ۱۵: ۱-۱۵.
- صالحی شانجانی، پ.، ۱۳۸۱. تنوع ژنتیکی راش و ارتباط آن با برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی بیوشیمیایی و مورفولوژیکی در راشتستانهای ایران. پایان‌نامه دکتری دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم، تهران. ۲۲۰ صفحه.
- Kirby, G.C., 1975. Heterozygote frequencies in small subpopulations. *Theoretical Population Biology*, 8: 31-48.
- Thiébaud, B., 1984. Variabilité génétique "hêtre commun" (*Fagus sylvatica* L.) dans les milieux montagnards et de haute altitude en Europe. *Colloque Ecologie et al Biogéographie des Milieux Montagnards et de Haute Altitude*, Gabas. France et Documents d'Ecologie Pyrénéenne, 3-4: 513-521.
- Asuka, Y., Tomaru, N., Munehara, Y., Tani, N., Tsumura, Y. and Yamamoto, S., 2005. Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beech-dwarf bamboo forest. *Molecular Ecology*, 14(8): 2565-2575.
- Barrett, S. C.H. and Shore, J. S., 1990. Isozyme variation in colonizing plants. In : Soltis, D. E. and Soltis, P. S., (Eds). *isozymes in plant biology*. Chapman and Hall, London. 280 p.
- Barrière, G., Comps, B., Comps, B., Cuguen, J., N'Tsiba, F. and Thiebaut, B., 1985. The genetical ecological variability of beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. An alloenzymatic study: genetic isolations of beech-woods: 24-50. In: Muhs, H.J., (Eds.). *Improvement and silviculture of beech*. Mitteilungen der Bundesforschngsanstalt für Forestwirtschaft. Grosshansdorf. 230 p.
- Belletti, P., and Lanteri, S., 1996. Allozyme variation among European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands

- Kimura, M., 1969. The rate of evolution considered from the standpoint of population genetics. *Proceeding of national Academy of Science U.S.A.*, 63:1181-1188.
- Kramer, K., 2005. A genetic-ecological study on beech (*Fagus sylvatica* L.): a leap of faith to assess a species' adaptive potential to environmental change. *QUEST & CLASSIC workshop on Modeling plant penology and large scale phenological observations*. www.geog.le.ac.uk/staff/jk61/phenows1/Kramer.htm
- Larsen, A.B., 1996. Genetic structure of populations of beech (*Fagus sylvatica* L.) in Denmark. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 11: 220-232.
- Latter, D.H., 1975. Influence of selection pressures on enzyme polymorphisms in *Drosophila*. *Nature*, 257:590 - 592.
- Lewontin, R. C. and Hubby, J. L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophil pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 595-609.
- Merzeau, D., Comps, B., Theibaut, B., and Letouzey, J., 1994. Estimation of *Fagus sylvatica* L. mating system parameters in natural populations. *Annal Science Forestry*, 51: 163-173.
- Merzeau, D., Di Giusto, F., Comps, B., Thiébaud, B., Letouzey, J. and Cuguen, J., 1989. The allozyme variants of beech (*Fagus Sylvatica* L.): inheritance and application to a study of the mating system. *Silvae Genetica*, 38: 195-201.
- Miller A. D., 1953. Factors affecting the growth and form of young beech at Gardingr forest Wiltshire. *Forestry*, 26:111-122.
- Müller-Starck, G. and Starke, R., 1993. Inheritance of isozymes in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Journal of Heredity*, 84: 291-296.
- Müller-Starck, G. and Ziehe, M., 1991. Genetic variation in populations of *Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L. and *Q. petera* Liebl. In Germany: 125-140. In: Müller-Starck, G. and Ziehe, M., (Eds.). *Genetic variation in European populations of forest trees*. Sauerländer;s verlg, Frankfurt. 180 p.
- Müller-Starck, G., 1985. Genetic differences between "tolerant" and "sensitive" beeches (*Fagus sylvatica* L.) in an environmentally stressed adult forest stand. *Silva Genetica*, 34 : 241-247.
- Müller-Starck, G., 1989. Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L.: 127-142. In: Scholz, F., Gregorius, H.R. and Rudin, D., (Eds). *Genetic effects of air popllutants in forest tree populations*. Springer, Berlin, Heidelberg. 255 p.
- (*Fagus sylvatica* L.) populations in France. *Biología (Bratislava)*, 47: 571-579.
- Gregorius, H. R., Krauhausen, J., and Müller-Stark, G., 1986. Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in a stand of *Fagus sylvatica* . *Heredity*, 57: 255-262.
- Hamrick, J. L. and Nason, J. D., 2000. Gene flow in forest tree: 90-100. In: Young, A., Boshier, D. and Bayle, T., (Eds.). *Forest conservation Genetics: Principles and Practice*. CSIRO Publishing, 150 p.
- Hamrick, J. L., and Nason, J. D., 1996. Consequences of dispersal in plants: 203-236. In: Rhodes, O.E., Chesser R.K. and Smith, M. (Eds.) *Population Dynamics in ecological and time*. University of Chicago Press, Chicago. 340 p.
- Hamrick, J.L., Murawski, D.A. and Nason, J.D., 1993. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio*, 107/108: 281-297.
- Harris, H., 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proceeding of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 164: 298-310.
- Hazler, K., Comps, B., Sugar, I., Melovski, L., Tashev, A. and Gracan, J., 1997. Genetic structure of *Fagus sylvatica* L. populations in southeastern Europe. *Silvae Genetica*. 46: 58-98.
- Howe, G.T., Saruul, P., Davis, J. and Chen, T.H.H., 2000. Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F2 family of hybrid poplars. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 632-642.
- Howe, G.T., Saruul, P., Davis, J., Chen, T.H.H., 2000. Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F2 family of hybrid poplars. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 632-642.
- Hristov, H.P., Botev, N.I., 1981. Effect of the injuries from late spring frost on the increment of the European beech. *Gorskostopanska Nauka*, 18: 19-27.
- Hubby, J. L. and Lewontin, R. C., 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophil pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 577-594.
- Hunter, R. L. and Markert, C. L., 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125:1294-1295.
- Jazbec, A., Šegotič, K., Ivankovič, M., Marjanovič, H. and Perič, S., 2007. Ranking of European **beech** provenances in Croatia using statistical analysis and analytical hierarchy process. *Forestry*, 80:151-162.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217:624-626.

- Saxe, H., Cannell, M.G.R., Johnsen, Ø., Ryan, M.G., Vourlttis, G., 2001. Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist*, 149: 369-400.
- Smithies, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochemistry Journal*, 61:629-641.
- Tanksely, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant molecular Biology Report*, 1: 3-8.
- Thiébaud, B., Lumaret, R. and Vernet, P.H., 1982. The bud enzymes of beech (*Fagus sylvatica* L.) Genetic distinction and analysis of polymorphism in several French populations. *Silvae Genetica*, 31: 51-60.
- Vornam, B., Decarli, N. and Gailing, O., 2004. Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers. *Genetics*, 5: 561-570.
- Wang, K.S., 2005. Gene Flow in European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Genetica*, 122: 105-113.
- Wang, X.-R., and Szmidt, A. E., 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 16: 199-220.
- Wendel, J.F. and Weeden, N.F., 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes: 5-45. In Soltis, D. E. and Solits, P. S. (Eds.). *Isozymes in plant biology*, Chapman and hall, London. 210.
- Wright, S., 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159.
- Wright, S., 1943. Isolation by distance, *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright, S., 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, 31: 39-59.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, 15: 323-354.
- Wuehlisch, G.V., Krusche, D. and Muhs H.J., 1995. Variation in temperature sun requirement for flushing of beech provenances. *Silva Genetica*, 44:5-6.
- Young, A., Boshier, D., and Bayle, T., 2000. *Forest conservation Genetics : Principles and Practice*. CSIRO Publishing, 1: 102, 290.
- Myczkowski, S., 1955. The influence of ecological factors upon the formation of the habit of beech – *Fagus sylvatica* L. *Rocznik Sekcji Dendrologicznej Polskiego Towarzystwa Botanicznego*, 10: 233-251.
- Nei, M., 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41: 225-233.
- Nicolini, E., Chanson, B. and Bonne, F., 2001. Stem Growth and Epicormic Branch formation in understory beech trees (*Fagus sylvatica* L.). *Annals of Botany*, 87: 737-750.
- Ningre, F. and Colin, F., 2007. Frost damage on the terminal shoot as a risk factor of fork incidence on common beech (*Fagus sylvatica* L.). *Annals of Forest Science*, 64: 79-86.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4:347-354.
- Paule, L., Gömöry, D. and Vyšný, J., 1995. Genetic diversity and differentiation of beech populations in Eastern Europe. In: Madsen, S., (Eds.). *Genetics and Silviculture of Beech*. *Forskningsserien (Copenhagen)*, 11: 159-167.
- Peakal. R. and Smouse, P.E., 2006. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- Pukacki, P., 1990. Resistance to low temperatures: 185-192. In: Białobok S., (ed.), *Buk zwyczajny (Fagus sylvatica L.)*. PWN Warszawa Poznań. 330 p.
- Raymond, M. and Rousset, F., 1995. An exact test of population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Rohlf JF (2004) *NTSYS-pc: 2.11 Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software, Setauket, N.Y.
- Salehi Shanjani, P., Paule, L., Khavari-nejad, R.A., Gömöry, D. and Sagheb-Talebi, K., 2002. Allozymic variability in beech (*Fagus orientalis* Lipsky) forests over Hyrcanian zone. *Forest Genetics*, 9: 297-297.

Differentiation of beech stem forms using isoenzyme gene markers

P. Salehi Shanjani^{*1}, M. H. Assareh² and M. Calagari³

1. ^{*}Corresponding author: Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran, E-mail: psalehi@rifr-ac.ir
2. Assoc. Prof. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
3. Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran

Accepted: 19.10.2008

Received: 12.05.2008

Abstract

Oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky) is one of the major components of the Iranian forests and it is of both ecological and economical importance. In beech stands (*Fagus sylvatica* Lipsky) it is observed, that beech trees with specific trunk morphology, such as forked stems, often occur in groups, can be assumed due to a limited pollen and especially seed dispersal and distinct family structures. Aim of this work was the investigation of a possible relation between the variability of the trunk morphology and genetic variation of the species. A total of 68 forked and monopodial trees in a beech stands in Hyrcanian Forests of Iran were analyzed using 16 enzymatic gene loci. Comparison for genetic diversity measures between the forked and monopodial trees revealed no significant differences for mean number of alleles per locus, mean number of frequent alleles per locus, effective number of alleles, neither for Shannon index nor expected heterozygosity. However, it was found private allele in the forked trees group, which is very important for adaptation processes in future. The outcrossing rate estimated using isoenzyme gene markers was relatively high for all of the investigated individuals, as expected. The results of this analysis did not show any clear genetic differentiation between the forked and monopodial groups of beech trees that means there was no indication about enzymatic genotypes, which strongly promote the formation of forked stems; this shows that application of isoenzyme gene markers in differentiation of adaptive traits should be considered with caution. However observation of private allele in forked trees group persuades us to continue this subject using other markers.

Key words: beech, *Fagus orientalis* Lipsky, genetic variation, Hyrcanian forests, Isoenzyme gene markers