Archive of SID

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۰۳-۲۸۹ (۱۳۹۰)

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های در خطر انقراض سفیدپلت (*Populus caspica* Bornm.) در جنگل‌های میان‌بند شمال ایران

حسن فلاح[۱]، مسعود طبری*[۲]، داوود آزادفر[۳] و فریبا بابایی[٤]

۱- کارشناس‌ارشد جنگل‌داری، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی نور
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی نور، دانشگاه تربیت مدرس
پست الکترونیک: masoudtabari@yahoo.com
۳- دانشیار، گروه جنگل‌داری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- کارشناس‌ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی نور

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۲٤

چکیده

برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت سفیدپلت براساس نشانگر ایزوآنزیمی پراکسیداز و مورفولوژیکی برگ ۳۰ پایه درختی با فواصل بیش از ۱۰۰ متر از سه رویشگاه میان‌بند جنگلی واقع در پارک جنگلی گلستان، استخر پشت نکا و مرزن‌آباد چالوس انتخاب گردید. به منظور بررسی فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز، نمونه‌های شاخه دو ساله از تاج درختان برداشت شد. همچنین از هر پایه ۱۵ برگ مورد اندازه‌گیری ۱۳ صفت ریختی برگ قرار گرفتند. بررسی کمی آنزیم پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV و بررسی کیفی آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (PAGE) صورت گرفت. نتایج نشان داد که صفات تعداد دندانه اصلی برگ، طول دمبرگ، ماده خشک برگ، زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایین و فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ، صفات کارایی جهت بررسی تنوع مورفولوژیکی این گونه می‌باشند. در بررسی کمی آنزیم، بیشترین میزان فعالیت مربوط به رویشگاه مرزن‌آباد و کمترین آن مربوط به رویشگاه نکا بود. طبق نتایج کیفی آنزیم پراکسیداز، رویشگاه گلستان (۱۵ هکتار) و نکا (١٤ هکتار) به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیتی بودند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها، تمایز مورفولوژیکی و ایزوآنزیمی زیادی را برای درون و بین جمعیت‌های این گونه نشان داد و با توجه به آن سه اکوتیپ مرزن‌آباد، نکا و گلستان قابل تفکیک است. با وجود این، نشانگر ایزوآنزیمی پراکسیداز در تفکیک اکوتیپ‌ها کارایی بیشتری نشان داد. الگوی باندی پراکسیداز و نشانگر مورفولوژیکی برگ از میان پایه‌های نر و ماده درون جامعه اختلافی را نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، تنوع ژنتیکی، جنگل‌های خزری، سفیدپلت.

مقدمه

منابع تنوع زیستی پایه‌های پایداری زندگی بشری می‌باشند (Ganlin *et al*., 2006). تنوع زیستی مفهوم گسترده‌ای از تنوع ژنتیکی تا تنوع اکوسیستم‌ها را در بر می‌گیرد (Sohrabi *et al*., 2005). تنوع ذخایر ژنتیکی علاوه بر کمک به پایداری پوشش گیاهی در مقابل

www.SID.ir

Archive of SID

تنش‌های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده، در اصلاح ارقام و دستیابی به ژنوتیپ‌های برتر نیز اهمیت فراوانی دارد (Espahbodi *et al*., 2006). هدف بلندمدت استراتژی حفاظت و احیاء، محافظت از پتانسیل تکاملی گونه‌ها و محافظت از تنوع ژنتیکی در سطح داخل و بین جمعیت می‌باشد (Riggs, 1990) و برای هدف کوتاه مدت آن باید برنامه های راهبردی و عملی جهت حفظ و احیای تنوع ژنتیکی اعمال گردد (Fenster & Dudash, 1994). در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی، ایزوآنزیمی و مولکولی معمول است (Banu *et al*., 2010). صفات مورفولوژی یکی از قدیمی ترین ابزار طبقه‌بندی گیاهان می‌باشد (Espahbodi *et al*., 2006). استفاده از صفات مورفولوژیکی برگ از اقدامات لازم در بررسی های تنوع ژنتیکی، تفکیک اکوتیپ ها و فعالیت های اصلاحی صنوبرها می‌باشد (Shiji *et al*., 1996; Krishnan & Sleper, 1997). آنزیم پراکسیداز از مهمترین آنزیم‌ها در سیر تحولات فیزیولوژیک گیاهان می‌باشد و به دلیل فراوانی باندها و نیز امکان وضوح باند جهت مطالعات ایزوآنزیمی همواره از جایگاه خاصی برخوردار است. بسیاری از محققان برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان از تفسیر زیموگرام‌های الکترفورزی این آنزیم استفاده کرده‌اند که بررسی تمایز ژنتیکی راش اروپایی *Fagus sylvatica* (Gomory *et al*., 1992) تنوّع ایزوآنزیمی جمعیت‌های آندمیک گونه *Astragalus submitis* و *Astragalus persicus* (Zarre *et al*., 2004, 2007) و تغییرات ژنتیکی جوامع پده *Populus euphratica* (Calagari *et al*., 2007)نمونه‌هایی از این مجموعه مطالعات به شمار می‌روند. تحقیق حاضر در مورد گونه سفیدپلت (*Populus caspica*) که گونه‌ی انحصاری (Marvi Mohajer, 2005) و در خطر انقراض جنگلهای هیرکانی می‌باشد (Jalili & Jamzad, 1999) انجام شده است. سفیدپلت از جنس صنوبر (Populus)، بخش (Leuce)، زیر بخش (Albide) و از خانواده بیدیان (Salicaceae) است (Ziyai Ziyabari, 1993). درختی دو پایه با ساقه منفرد، خزان کننده و دارای برگهای متنوع می‌باشد و در مناطق پایین بند و میان بند جنگلهای شمال از تالش تا جنگل گلستان پراکنش داشته و به دلیل فشارهای اقتصادی- اجتماعی حاکم، به شدت در معرض تخریب قرار گرفته است (Asadi *et al*., 2004). با توجه به باستانی بودن جنگلهای هیرکانی و در خطر انقراض قرار گرفتن گونه های انحصاری مانند سفیدپلت، باید تحولی اساسی در مدیریت جنگل‌داری کشور با اندیشه‌ای نو مبتنی بر حفاظت اصولی از غنای ژنتیکی گیاهی این گونه ها انجام شود. در این تحقیق تنوع و تمایز ژنتیکی گونه سفیدپلت در سه رویشگاه میان‌بند جنگل های خزری با دو نشانگر مورفولوژیکی برگ و ایزوآنزیمی پراکسیداز، جهت ارائه راهکارهای نو در راستای برنامه‌ریزی مدیریت صحیح حفاظت و احیاء این ذخیره ژنتیکی ارزشمند جنگلهای هیرکانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

سه رویشگاه مرزن آباد چالوس، استخر پشت نکا و پارک جنگلی گلستان جهت بررسی انتخاب شدند. مشخصات این مناطق در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. پایه های نر و ماده در اواخر بهمن تا اواخر اسفند بواسطه شاتون های متفاوت (شاتون نر کوچکتر از شاتون ماده، دارای برگه تخم‌مرغی قهوه‌ای، مژه های بلند و ارغوانی و سرشار از گرده) از هم تفکیک شدند. در هر یک از مناطق مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی ۵ پایه نر و ۵ پایه ماده درخت سفیدپلت انتخاب شد و نمونه‌های شاخه دو ساله در یک جهت نسبت به تابش آفتاب (به دلیل تکمیل فرآیند فیزیولوژیک)، با فاصله ۱۰۰ متری جهت جلوگیری از تشابه ژنتیکی برداشت گردیدند (Hatziskakis *et al.*, 2011). کلیه نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت به صورت جداگانه، در یخدان حاوی یخ خشک (دمای ٤ درجه سانتیگراد)، جهت مطالعات آنزیمی به آزمایشگاه انتقال داده شد.

جهت عصاره‌گیری، نمونه‌ها را در هاون چینی مخصوص کاملا خرد نموده و پس از اضافه کردن محلول عصاره گیری، توسط دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، ایزوآنزیم‌ها استخراج شدند تا مرحله شروع آزمایش‌های کمی و کیفی آنزیمی در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Korori, 1989). مطالعه کمی آنزیم پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV، در طول موج ۵۳۰ نانومتر انجام شد و فعالیت آنزیم پراکسیداز در واحد زمان اندازه‌گیری گردید (Korori, 1989). مطالعات کیفی با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی و به روش PAGE (پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز) انجام شد (Hames & Rickwood, 1990). در مطالعه تاکسونومی صفات ریخت‌شناسی برگ در مجموع ۱۳ صفت ریختی برگ (Calagari *et al.*, 2007) با ۱۵ تکرار از نمونه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. حالات مختلف صفات مورد استفاده به صورت کدهایی تعریف شد (جدول ۲).

فعالیت کمی پراکسیداز با استفاده تجزیه واریانس داده ها (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS Ver, 17 انجام شد. تجزیه و تحلیل در مورد داده‌های الکتروفورتیکی (ژل های تهیه شده) به صورت کیفی و با تفسیر باندهای ایزوآنزیمی براساس حضور و عدم حضور باندها انجام شد. در بررسی صفات مورفولوژی، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به منظور تعیین صفاتی که دارای بیشترین درصد واریانس هستند با نرم‌افزار SPSS Ver, 17 انجام شد. میزان تأثیرپذیری صفات از محیط (پلاستیسیتی) نیز با استفاده از روش (Bruschi *et al*, 2003) طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\mathbf{Pl} = 1 - \frac{x}{X}$$

Pl = پلاستیسیتی پارامتر مورد بررسی، x = کمترین مقدار پارامتر مورد بررسی، X = بیشترین مقدار پارامتر مورد بررسی

گروه‌بندی پایه‌ها براساس صفات مورفولوژی و فعالیت کیفی پراکسیداز با استفاده از روش تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP Ver., 3.1.2 و SPSS Ver, 17 انجام شد. بدین منظور، ابتدا ضریب فاصله بین افراد از روش مربع فاصله اقلیدسی محاسبه شد. مقایسه کارایی روشهای مختلف تجزیه کلاستر به کمک ضریب همبستگی کوفنتیک انجام شد. در نهایت دندروگرام حاصل از روش Wards با ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۸۹ به عنوان بهترین روش تجزیه کلاستر انتخاب شد.

جدول ۱- ویژگی مناطق مورد مطالعه

نام رویشگاه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	مساحت به هکتار
مرزن‌آباد چالوس	٤۲۵	۳٦ ° ۲۹´۱۱″	۵۱ °۱۹´۱۲″	۱
استخرپشت نکا	۵۳۰	۳٦° ۳۵´ ۰۷″	۵۲° ۳۸´۱۲″	۱٤
پارک جنگلی گلستان	۵۲۰	۳۷° ۲۳´ ۱٦″	۵۵° ۵٤´۰۸″	۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق مورد مطالعه روی نقشه

جدول ۲– صفات مورفولوژیک و مقیاس‌های مورد استفاده در اندازه‌گیری

ردیف	صفت مورفولوژیکی	مقیاس
۱	سطح برگ	سانتیمتر مربع
۲	طول برگ	سانتیمتر
۳	حداکثر پهنای برگ	سانتیمتر
٤	طول دمبرگ	سانتیمتر
٥	نسبت طول دمبرگ به طول برگ	سانتیمتر
٦	تعداد دندانه اصلی	عدد
۷	فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ	سانتیمتر
۸	فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا رگبرگ اصلی	سانتیمتر
۹	ضخامت برگ	میلیمتر
۱۰	زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایینی	درجه
۱۱	ماده خشک برگ	درصد
۱۲	حداکثر عمق دندانه برگ	میلیمتر
۱۳	نسبت طول برگ به پهنا	نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها به لحاظ میانگین فعالیت کمی آنزیم پرکسیداز تفاوت معنی‌داری را بین رویشگاه‌های مورد بررسی نشان داد. رویشگاه‌های مرزن‌آباد و گلستان دارای بیشترین میانگین فعالیت کمی پراکسیداز و در گروه a و رویشگاه نکا با میانگین ۰/۰٤٦ به تنهایی در گروه b و دارای کمترین میانگین فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز می‌باشد (جدول ۳).

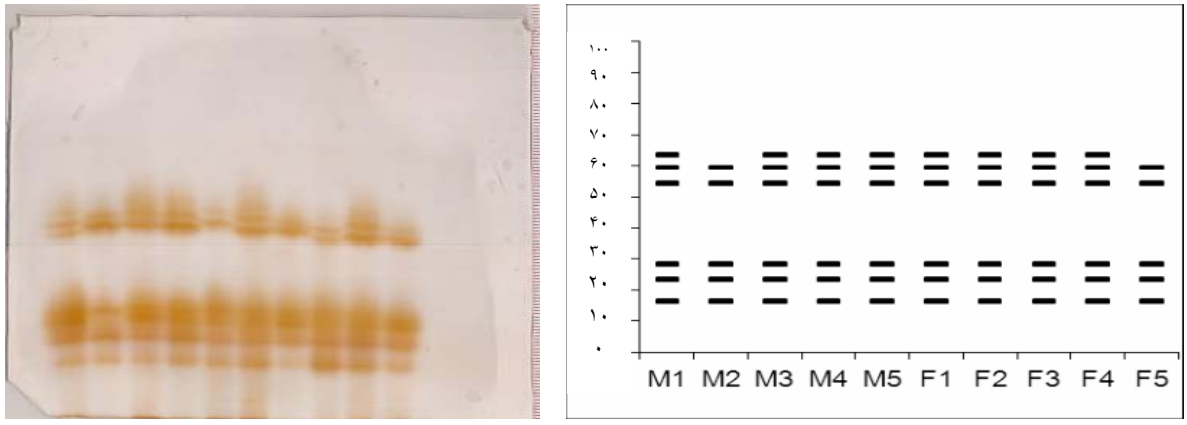
جدول ۳- میانگین فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز در دقیقه (unit/min/gr)

نام رویشگاه	میانگین
مرزن‌آباد چالوس	۰/۰۸۸ ±۰/۰۱۸[a]
پارک جنگلی گلستان	۰/۰۷۷ ±۰/۰۳۸[a]
استخرپشت نکا	۰/۰٤٦ ±۰/۰۲۳[b]

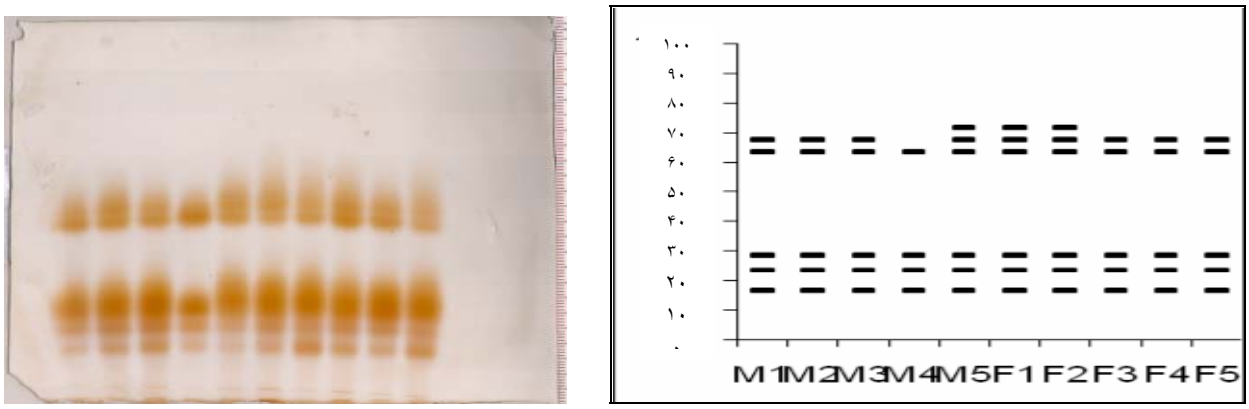
در بررسی کیفی پراکسیداز در نمونه‌های شاخه دو ساله در کل ۱۵ باند مجزا بر روی ژل نمایان گردید. باندهای پراکسیداز دو ناحیه‌ی متفاوت را بر روی ژل نشان دادند. ناحیه اول (PX1) ناحیه‌ی باندهای سبک که ناحیه کاتدی نیز خوانده می‌شود و ناحیه‌ی دوم (PX2) ناحیه‌ی باندهای سنگین و کند که ناحیه آندی خوانده می‌شود (با حداکثر تحرک نسبی ٤٥ درصد). ناحیه دوم شامل ٦ باند با تحرک نسبی ۷، ١٦، ۲۳، ۲۸، ۳۲ و ۳۵ درصد بود. باندهای شماره‌ی ١٦، ۲۳ و ۲۸ دارای فراوانی ۱۰۰ درصد (یعنی کلیه پایه‌های مورد بررسی در رویشگاه‌های مورد مطالعه دارای این باندها می‌باشد) بود و باندهای پایه فیزیولوژیک خوانده می‌شوند. باند با تحرک نسبی ۷ و ۳۵ درصد مختص رویشگاه گلستان بود. باند با تحرک نسبی ۳۲ درصد و فراوانی ٦٦/٦٦ درصد در رویشگاه‌های نکا و گلستان دیده شد. ناحیه اول دارای ۹ باند با تحرک نسبی ۵۲، ٥٦، ۵۸، ٦۰، ٦۳، ٦٥، ٦۷، ٦۹ و ۷۱ درصد بود. از این میان باندهای با تحرک نسبی۵۲، ٥٦، ٦۰، ٦٥ و ٦۹ درصد مختص رویشگاه گلستان و باند با تحرک نسبی۷۱ درصد مختص رویشگاه مرزن‌آباد بود. باندهای با تحرک نسبی ٦۳ درصد و با فراوانی ٦٦/٨٦ و باند با تحرک نسبی ٦۷ درصد و فراوانی ٤۰ درصد در همه رویشگاه‌ها مشاهده شد. نتایج ایزوآنزیمی پراکسیداز اختلافی به لحاظ نوع جنسیت بین پایه‌های نر و ماده در ۱۲ الگوی باند ایزوآنزیمی نشان نداد و به عبارتی درختان نر و ماده در هر یک از مناطق مورد بررسی از نظر الگوی باندی وضعیت تقریبا مشابهی داشتند. نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز بر این امر دلالت داشت که پایه‌های نر و ماده رویشگاه‌های مختلف دارای اختلافاتی در الگوی ایزوآنزیمی بوده ولی از نظر نوع جنسیت اختلافی در آنها مشاهده نشد (شکلهای ۱ تا ٤).

www.SID.ir

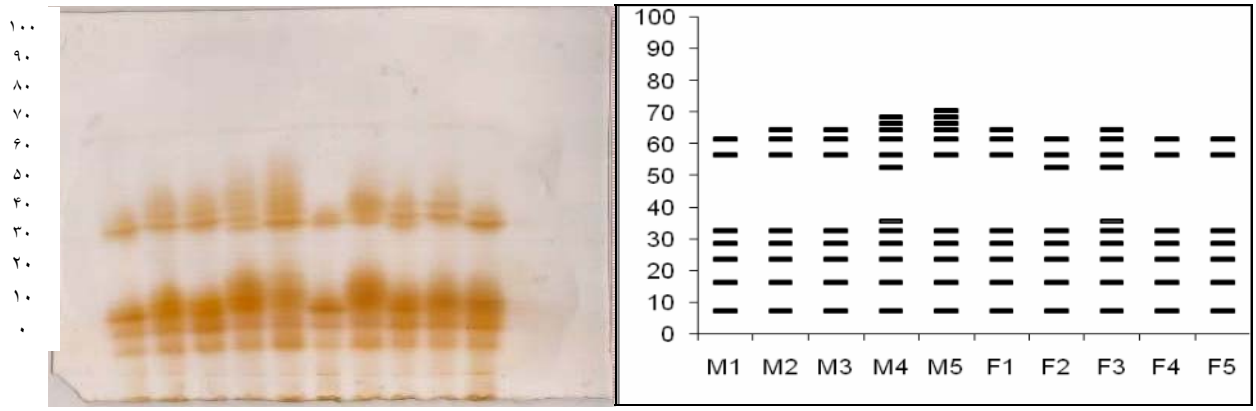
Archive of SID



شکل ۱- زیموگرام باند الکتروفورزی و ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز شاخه در رویشگاه استخرپشت نکا



شکل ۲- زیموگرام باند الکتروفورزی و ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز شاخه در رویشگاه مرزن‌آباد چالوس



شکل ۳- زیموگرام باند الکتروفورزی و ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه گلستان

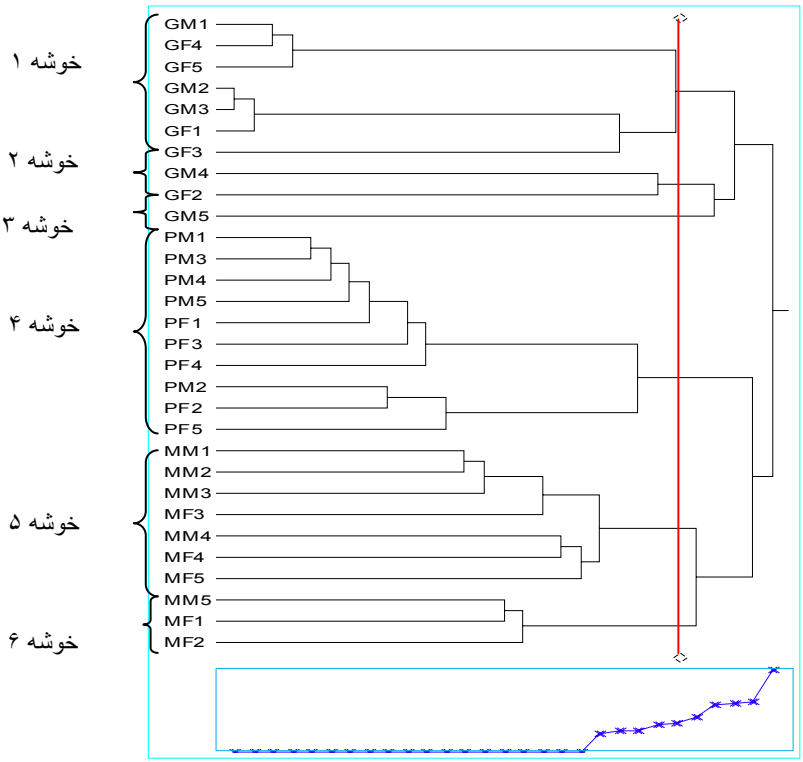
www.SID.ir

Archive of SID

گروه بندی پایه‌های موجود در سه رویشگاه میان‌بند براساس فعالیت کیفی پراکسیداز با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش حداقل واریانس Ward's، ٦ خوشه را از یکدیگر متمایز نمود. پایه های رویشگاه گلستان با تفاوت در تعداد پایه ها در سه خوشه مجزا ۱، ۲ و ۳ قرار گرفتند. پایه‌های رویشگاه مرزن‌آباد نیز با تفاوت در تعداد پایه‌ها در دو خوشه ۵ و ٦ قرار گرفتند و کلیه پایه‌های رویشگاه نکا در خوشه ٤ قرار گرفتند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین پایه PM1 نکا و GM1 گلستان دیده شد (شکل ۳). رویشگاه گلستان بیشترین تنوع درون جمعیتی و رویشگاه نکا از این لحاظ کمترین تنوع را نشان داد (جدول ٤).

جدول ٤- نتایج گروه‌بندی پایه‌های داخل رویشگاه‌ها براساس فعالیت کیفی آنزیم پروکسیداز شاخه

	خوشه‌بندی براساس فعالیت کیفی پراکسیداز	
رویشگاه	تعداد خوشه در فاصله ۵	تعداد خوشه در فاصله ۱۰
پارک جنگلی گلستان	٦	۳
مرزن‌آباد چالوس	٤	۳
استخر پشت نکا	۲	۲



پایه‌های رویشگاه‌های میان‌بند	فاصله ژنتیکی
MM1- MM4	۲/۵۸
GM2 – GF3	۲/۸۳
PM1- PM2	۲/۸۵
GM4 – GF2	۳/۷۲
GM1 – GM2	۳/۹۳
MM1 – MM5	٤/۹۰
GM4 – GM5	٦/٤۹
GM1- GM4	٦/۷۸
PM1 – MM1	٦/۹۵
GM1 - PM1	۱۱/٦۲

شکل ٤- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای درختان سفیدپلت در رویشگاه‌ها براساس فعالیت کیفی آنزیم پراکسیداز و جدول فاصله ژنتیکی آن.

(G= پایه‌های رویشگاه گلستان، P= پایه‌های رویشگاه نکا، M= پایه‌های رویشگاه مرزن‌آباد، M= پایه ماده، F= پایه نر)

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به منظور استفاده از متغیرهای ضروری که دارای بیشترین درصد واریانس هستند برای ۱۳ مشخصه مورفولوژیکی برگ از درختان سفیدپلت در مناطق مورد بررسی انجام شد. در صفات برگ مجموع ۸۵/۷۳۳ درصد واریانس به ۵ مؤلفه اول اختصاص پیدا کرد (جدول ۵). در تشکیل مؤلفه اول صفات تعداد دندانه اصلی برگ، طول برگ، سطح برگ، طول برگ، طول دمبرگ، ماده خشک برگ، فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ و زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایین نقش مهم‌تری داشتند (جدول ٦).

جدول۵- سهم صفات در ایجاد واریانس‌ها

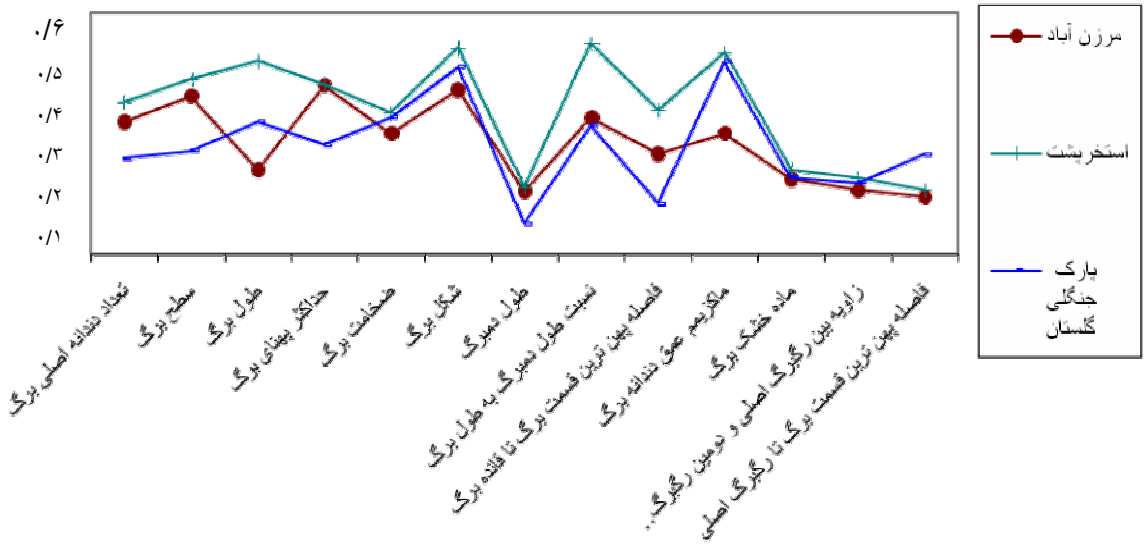
مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	سهم واریانس	واریانس تجمعی
۱	۵/۰۳۷	۳۸/۷٤۵	۳۸/۷٤۵
۲	۱/۸۳۲	۱٤/۰۸۹	۵۲/۸۳٤
۳	۱/٦۸	۱۲/۹۲٦	٦۵/۷٦۱
٤	۱/٤۳۸	۱۱/۰٦۵	۷٦/۸۲۵
۵	۱/۱۵۸	۸/۹۰۸	۸۵/۷۳۳

جدول ٦- تعیین صفات در تبیین مؤلفه‌ها

صفات	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم	مؤلفه چهارم	مؤلفه پنجم
تعداد دندانه اصلی برگ	۰/۸۱۸	۰/۰۹٤	-۰/۳۳	۰/۰۰٤	۰/۰۱۹
سطح برگ	۰/۹۱	۰/۱٤۵	۰/۰۱۷	-۰/۰۱	۰/۰۹۱
طول برگ	۰/۷۳٦	-۰/۱۳۹	۰/۲۲۸	۰/٤۹	-۰/۰۲۲
حداکثر پهنای برگ	۰/۳۵۹	۰/۱٦	۰/۷۷	-۰/۲۰۱	-۰/۱۲
ضخامت برگ	-۰/۰۹۵	۰/۹۱۸	-۰/۰٤۲	-۰/۱۲۹	۰/۰٦۷
شکل برگ	-۰/۲٦٦	-۰/۰٤۸	۰/٦۸۹	۰/۵۳۵	۰/۱۹٦
طول دمبرگ	۰/۸۷٦	-۰/۳۸۲	۰/۰۰۳	-۰/۰۳	۰/۰۷٦
نسبت طول دمبرگ به طول برگ	۰/۲۵٦	-۰/۳۲٤	-۰/۲۳۳	-۰/۸۲۳	۰/۱۱۱
فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ	۰/۹۱۲	-۰/۰۰۷	۰/۰۹٤	۰/۲۳۹	۰/۱٤۸
حداکثر عمق دندانه برگ	۰/۳۵٤	۰/۷۲٤	۰/۳۰٦	-۰/۰۹۹	-۰/۳۲۲
ماده خشک برگ	۰/۸٤٤	۰/۲۵۱	-۰/۰٤۸	۰/۰۳٤	۰/۱۷
زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایین	-۰/۵۲۹	۰/۲۲٦	۰/۵۰۹	۰/۲۷	۰/۳۰۵
فاصله پهن‌ترین برگ تا رگبرگ اصلی	-۰/۰۸٦	۰/۱۵	۰/۰۱۲	-۰/۱۸۸	۰/۹۰۹

www.SID.ir

Archive of SID



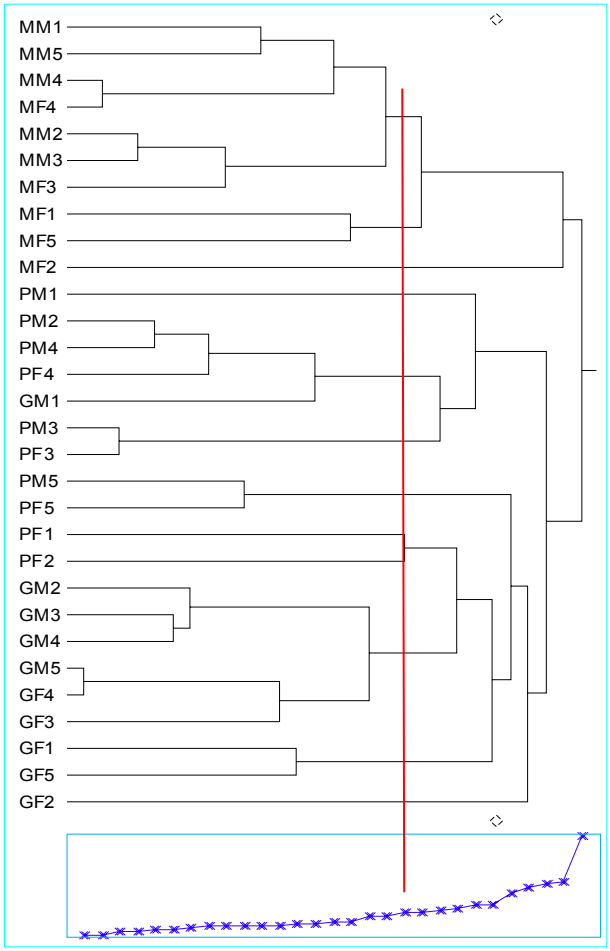
شکل ۵- پلاستیسیتی صفات مورفولوژیک برگ درختان در مناطق مورد بررسی

نتایج حاصل از محاسبه پلاستیسیتی نشان داد که از بین صفات مورد مطالعه صفات طول دمبرگ، فاصله پهن ترین قسمت برگ تا قاعده برگ، تعداد دندانه اصلی برگ، زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایین، ضخامت برگ و ماده خشک برگ کمترین میزان پلاستیسیتی در هشت رویشگاه به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۵).

در رویشگاه های میان‌بند مرزن آباد، استخرپشت نکا و گلستان مجموعا ٦ خوشه ی جداگانه مشخص شد. جز پایه ی MF2 مرزن آباد که در خوشه ۲ قرار گرفت کلیه‌ی پایه‌های رویشگاه مرزن در خوشه‌ی جداگانه ۱ قرار گرفتند. پایه‌های PM5 و PF5 بطور جداگانه در خوشه‌ی ٤ قرار گرفتند. پایه‌ی GF2 رویشگاه گلستان در خوشه ی ٦ قرار گرفت. سایر پایه های رویشگاه گلستان و نکا با تفاوت در تعداد پایه ها در دو خوشه جداگانه ۳ و ۵ قرار گرفتند (شکل ٦). بیشترین فاصله ژنتیکی بین پایه های یک نر رویشگاه مرزن آباد (MM1) و (PM1) نکا (11/62) و کمترین فاصله ژنتیکی بین پایه‌ی ۵ نر (GM5) و ٤ ماده ی (GF4) گلستان (۰/۳۲) دیده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



پایه‌های رویشگاه‌های میان‌بند	فاصله ژنتیکی
GM5 - GF4	۰/۳۲
MM4 – MF4	۰/٤۷
PM3 - PF3	۰/۸۱
MM2 – MM3	۰/۸۲
PM2 – PM4	۰/۸۷
PM5 – PF1	۵/۰۷
PM5 – GF2	۵/۷۹
PM1 - PM5	٦/۱۱
MM1 – MF2	٦/۲۷
MM1 - PM1	۱۱/٦۲

شکل ٦- دندروگرام و جدول فاصله ژنتیکی حاصل از تجزیه خوشه‌ای در میان‌بند براساس صفات مورفولوژی برگ

بحث

از میان مشخصه‌های مورفولوژیکی، برگ‌ها به دلیل رشد و تولید مثل درختان، فتوسنتز و کربن‌گیری از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. نتایج بررسی‌های مربوط به گونه‌های *Populus deltoides* Bartr. (Sokal *et al.*, 1986)، *Populus nigra* L. (Kristinnic, 1997)، *Populus euphratica* Oliv. (Calagari *et al.*, 2007) و *Zizyphus jujuba* Mill (Khakdaman *et al.*, 2007) نشان داده است که مشخصه های مورفولوژیکی برگها در تعیین تمایز میان درختان در رویشگاه‌های مختلف نقش مهمی داشته‌اند. به دلیل تأثیر عوامل محیطی بر روی جوامع، وجود اختلاف مورفولوژیکی و فنولوژیکی در اغلب گونه‌ها مشاهده می‌گردد (Barnes, 1993). بنابراین اختلاف مورفولوژیکی صرفا نمی‌تواند منشأ ژنتیکی داشته باشد بلکه بررسی‌های بیوشیمیایی و استفاده از آنزیم می‌تواند به عنوان مکمل، تمایز جوامع گیاهی را با دقت مطمئن‌تری نشان دهد (Babaie *et al.*, 2010). در بسیاری از تحقیقات، فعالیت کمی و کیفی پراکسیداز در گیاهان، مبنای طبقه‌بندی ژنتیکی قرار داده شده است (Salehi shanjani & Machon *et al.*, 1997; Vendramin, 2007; Bogdanovic *et al.*, 2006;

www.SID.ir

Archive of SID

Manjuntha *et al*., 2003; همچنین پژوهش‌های فراوانی با اشاره به رابطه بین گوناگونی فراوانی آللی برخی آنزیم‌ها و شرایط محیطی، به نقش احتمالی سازگاری آن آلل‌ها تأکید می‌کند (Gomory *et al*., 1992; Comps *et al*., 1990,1991). در تعیین کاراترین صفات جهت بررسی تنوع مورفولوژیکی صفات دارای کمترین پلاستیسیتی (Bruschi *et al*., 2003) و صفاتی که ایجاد واریانس‌ها بیشترین نقش را دارند کمتر تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند، لذا اگر این صفات تحت کنترل ژن باشند ژن‌های کنترل‌کننده آنها در پایه‌های مختلف متفاوت خواهند بود (Espahbodi *et al*., 2006). بنابراین صفات تعداد دندانه اصلی برگ، طول دمبرگ، ماده خشک برگ، زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایین و فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ کاراترین صفات برگ جهت بررسی تنوع مورفولوژیکی این گونه می‌باشند. در تحقیق حاضر، تجزیه واریانس داده‌ها به لحاظ میانگین فعالیت کمی آنزیمی تفاوت معنی‌داری را بین برخی رویشگاه‌های مورد بررسی نشان داد. این عامل می‌تواند مؤید تفاوت ژنتیکی بین رویشگاه‌ها باشد (Babaie *et al*., 2010). گروه‌بندی پایه ها براساس صفات مورفولوژیکی برگ و فعالیت کیفی پراکسیداز براساس حضور و عدم حضور باندها ، تمایز ژنتیکی بالا و کلاسه های ژنتیکی متعددی را نشان داد؛ با توجه به قرار گرفتن کلیه پایه های برخی رویشگاه‌ها در کلاسترهای جداگانه در مجموع اکوتیپ‌های مرزن‌آباد، نکا و گلستان از یکدیگر قابل تفکیک هستند. نشانگر ایزوآنزیمی پراکسیداز کارایی بالاتری در تفکیک اکوتیپ‌ها نشان داد در صورتیکه نشانگر مورفولوژیکی برگ بین رویشگاه‌های نکا و گلستان تمایزی نشان نداد. الگوی باندی پراکسیداز تعداد ۱۵ باند جداگانه را بر روی ژل نشان داد. باندهای با تحرک نسبی ۱۶، ۲۳ و ۲۸ درصد دارای فراوانی ۱۰۰ درصد می‌باشند و باندهای پایه فیزیولوژیک خوانده می‌شوند (Calagari *et al*., 2007). همچنین باند با تحرک نسبی۶۳ و ۶۷ درصد با تفاوت در تعداد پایه ها در همه رویشگاه ها مشاهده شد. حضور این باندهای عمومی احتمالا دلیلی بر منشا تکاملی یا اجداد عمومی پایه های انتخاب شده می‌باشند و یا اینکه این ایزوآنزیم ها تحت کنترل ژن‌های مشابهی می‌باشند. ژن‌هایی که می‌توانند انعطاف‌پذیر و تکامل‌پذیر و قادر به بیان شرایط ژنتیکی مشابه پایه‌ها قبل از یک دوره تکاملی باشند (Aliyu & Awopetu, 2007).

در این بررسی باندهای مختص به محل (مانند باند با تحرک نسبی۷، ۳۵، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۶۰، ۶۵، ۶۹ و ۷۱ درصد) و باندهای مختص به تعدادی رویشگاه (باند با تحرک نسبی ۳۲ درصد نکا و گلستان) در تمایز درختان رویشگاه های مورد بررسی نقش وافری دارند. وجود باندهای کاتدی مشترک (باندهای سبک) در تعیین خویشاوندی میان پایه‌های درون جمعیت و بین جمعیت نقش مهمی دارد (Aliyu & Awopetu, 2007). تمایز بین الگوی باندی آنزیم پراکسیداز در گرادیان جلگه بوسیله گروه‌بندی فعالیت کیفی پراکسیداز با استفاده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها، پایه‌های هر سه رویشگاه را از یکدیگر متمایز کرد و پایه‌های هر یک از این رویشگاه‌ها را در کلاسه های ژنتیکی جداگانه قرار داد. همچنین قرار گرفتن پایه‌ها درون هریک از این رویشگاه‌ها در خوشه های جداگانه از تمایز و تنوع درون جمعیتی این رویشگاه‌ها حکایت دارد. رویشگاه گلستان با داشتن ۷ باند مختص بیشترین تمایز بین جمعیتی و تنوع درون جمعیتی

www.SID.ir

Archive of SID

را نشـان داد. بـه لحـاظ تنـوع درون جمعیتـی رویشـگاه گلسـتان بیشـترین و رویشـگاه نکـا کمتـرین تنـوع درون جمعیتی را نشان داد. رویشگاه پارک گلستان چه از لحـاظ غنای خاکی (خاک قهوه‌ای آهکی و آبرفتـی) (Jalilvand, 1988) و چه از لحاظ اقلیمی که در مرز بین چنـدین نـوع آب و هوا (Akhani, 2004) و حفـاظتی اسـت شـرایط را برای یک تنوع زیستی بالا فراهم کرده است. حضور تنـوع گونه های با سرشت متفاوت در این پارک مؤیـد ایـن امـر است. در این خصوص Babaie و همکاران (2010) تنـوع ژنتیکی بیشتری را بـرای رویشـگاه درخـت آزاد گلسـتان نسبت به رویشگاه های نـور مازنـدران و گمـل گـیلان بـا مطالعه ایزوآنزیمی پراکسیداز برگ نشان دادند. یافتـه هـای این تحقیق از میان پایه های نـر و مـاده بـه لحـاظ الگـوی باندی و خوشه‌ای پراکسیداز درون جامعه اختلافـی نشـان نداد و دلیل آن می‌تواند ناشی از عدم وابستگی این صـفت بـه نـوع جنسـیت باشـد (Calagari *et al.*, 2007). عـدم اختلاف حضور باندهای ایزوآنزیمی در پایه‌های درخت نر و مـاده پـده (Calagari *et al.*, 2007) و (Rottenberg *et al*., 2000) نیز گزارش شده است. گونه سـفیدپلت بـه صورت قطعـات جـدا در منـاطقی بـا تنـوع جغرافیـایی و اقلیمی گسـترده وجـود دارد. تنـوع جغرافیـایی و اقلیمـی عوامل بسیار موثر بر ایجاد تنوع ژنتیکی انـد (Dunlap *et al*., 1995). همچنین تاریخ تکاملی گونـه‌هـا نقـش بسـیار موثری در ایجاد تنوع و تمایز ژنتیکـی جمعیـت‌هـا دارد و یـک گونـه مـی‌توانـد در اثـر تکامـل چنـد هـزار سـاله تفـاوت‌هـای ژنتیکـی در راسـتای سـازگاری محیطـی بـا محیط های متنوع پیدا کند که نقش مهمـی در پایـداری آن جمعیت‌ها دارد. گونه سـفیدپلت از جـنس صـنوبر، گونـه مختص جنگل های هیرکانی و معروف به فسیل زنده است (Hosseini, 1998) و به همراه گونـه‌هـایی نظیـر انجیلـی (*Parrotia persica*) و لیلکـی (*Gleditschia caspica*) بجا مانده از دوران سوم زمین‌شناسـی مـی‌باشـد (Marvi Mohajer, 2005) و تاریخ تکاملی زیادی برای ایـن گونـه برآورد می‌شود. بطور کلی درختـان جـنس صـنوبر بـدلیل دوپایه بودن و افزایش تلاقی درون و بین گونـه‌ای از یـک طرف و قابلیت درختان صنوبر در پراکنـده نمـودن وسـیع بذرها و گرده اختلاف ژنتیکی و جریان ژنی بالایی دارنـد (Calagari *et al.*, 2007) و در تمـایز ژنتیکـی گونـه سفیدپلت در جوامع طبیعی مهاجرت از طریق گرده و بذر (خصوصا گرده) می‌تواند نقش مهمی را ایفا کند. از نتـایج این تحقیق می‌توان تنوع و تمایز ژنتیکی بالایی برای گونه سفیدپلت پیش‌بینی نمود. چنین تنوع و تمایز ژنتیکی برای گونه در حال انقراض سفیدپلت ضرورت حفاظت *in situ* و *ex situ* و بازسـازی کلیـه‌ی جمعیـت‌هـای ایـن گونـه آندمیک و کم نظیر جنگـل هـای باسـتانی هیرکـانی را کـه ذخیره‌گـاه ژنتیکـی نـادر بسـیاری از گونـه‌هـا در مقیـاس جهانیست را گوشزد می‌کند. در نهایت، ذکر این نکته لازم است که برای بررسی بیشتر و دقیقتر تفاوت های ژنتیکـی، استفاده از سایر نشانگرها، بـه‌ویـژه نشـانگرهای مولکـولی نظیـر RAPD، RFLP، AFLP و EST بـه‌منظـور نقشه‌برداری کامـل از ژنـوم سـفیدپلت ضـروری بـه نظـر می‌رسد (Vandenbroeck, 2000).

منابع مورد استفاده

- Akhani, H., 2004.Golestan National Park Flora, Tehran University Press, Tehran, 567 pp.
- Aliyu, O.M., and Awopetu, J.A.M., 2007. Assessment of genetic diversity in three population of cashew (*Anacardium occidental* L.) using protein-isoenzyme- electrophoretic analysis, Genetic Resource Crop Evolution, 10:722-73.

www.SID.ir

Archive of SID

Canadian Journal of Forestry Research, 25: 1710-1725.
– Espahbodi, K., Mirzaie- Nodoushan, H., Tabari, M. and Akbarinia, M., 2006. Investigation of genetic variation of wild service (*Sorbus torminalis* (L) Crantz), Using Morphological Analysis of Fruits and Leaves. Pajouhesh va Sazandegi ,72: 44-57.
– Fenster, C.B. and Dudash, M.R., 1994. Genetic considerations for plant population restoration and conservation. Cambridge University Press. UK.
– Ganlin, W., Minyi, H., Renyan, D. and Kai, Z., 2006. Effects of different traveling disturbances on the species diversity in *Pinus taiwanensis* communities. Acta Ecologica Sinica, 26: 3924-3930.
– Gomory, D., Vysny, J., Comps, B. and Thiebaut, B., 1992. Geographical patterns of genetic differentiation and diversity in European beech(*Fagus sylvatica* L.). Population in France. Biologia(Bratislava), 47: 571-579.
– Hames, B.D. and Rickwood, D., 1999. Gel electrophoresis of proteins, a practical approach second edition, Oxford University Press. U.K., 465 pp.
– Hatziskakis,S., Tsiripidis, I., and Papageorgiou, A.C., 2011. Leaf morphological variation in beech (*Fagus sylvatica* L.) populations in Greece and its relation to their post-glacial origin, Botanical Journal of the Linnean Society, 165. 422-436.
– Hosseini, S.M., 1998. Iranian native conifer forests decline due to snow, wind, drought and diseases.Proceedings of IUFRO conferences: Environmental interaction in forest decline. Vienna. Austria.
– IUCN., 1994. The IUCN Red List Categories and Criteria. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, World Conservation Union, Gland. Italy.
– Jalili, A. and Jamzad, Z., 2000. Red Data Book of Iran. Iranian Research Institute of Forest and Rangeland, 748 pp.
– Jalilvand, H., 1988. Assesment Distribution and Ecological Characteristics of *Populus caspica* Bornm Species in North Forest of Iran. PhD thesis, Tarbiat Modares University. Tehran, 262 pp.
– Khakdaman, H., Pourmeidani, A. and Adnani, S.M., 2007. Study of genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) ecotypes. Iranian Journal of
– Asadi, F., Mirzaie-Nodoushan, H., Modir Rahmati, E. and Naderishahab, M.E., 2004. Using morphological markers in poplar colonies differentiation. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 12: 267-300.
– Babaie, F., Jalali, S.G. and Azadfar, D., 2010. Genetic variation investigation on *Zelkova carpinifolia*, from three Iranian north lowland habitats using leaf Peroxidase, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 18: 83-92 .
– Banu, S.D., Lagu, M. and Gupta, V., 2010, Phylogeographical studies in distinct populations of *Symplocos laurina* Wall. using cytoplasmic PCR-RFLP approach, Tree Genetics & Genomes, 6:13–23.
– Barnes, B. and Han, F., 1993. Phenotypic variation of Chinese aspens and their relationships to similar taxa in Europe and North America, Canadian Journal of Botany, 71: 799-815.
– Bogdanovic, J., Milosavic, N., Prodanovic, R., Ducic, T. and Radotic, K., 2006. Variability of antioxidant enzyme activity and isoenzyme profile in needles of Serbian spruce (*Picea omorika* (Panc.) Purkinye), Biochemical Systematic and Ecology, 35: 263-273.
– Bruschi, P., Grossoni, P. and Bussotti, F., 2003. Within and among tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Lieble. Natural Populations Tree, 17: 164-172.
– Calagari, M., Jafari Mofidabadi, A., Tabari, M. and Hoseini, S.M., 2007. Genetical variation on natural populations of *Populus euphratica* Oliv. by peroxidase isoenzyme. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 15: 115-122.
– 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.
– 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.
– Dunlap, J.M. and Stettler, R.F., 1995. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. X. Trait correlations in young black cottonwood from four river valleys in Washington,

www.SID.ir

Archive of SID

– Shiji, W., Binghao, C. and Hugun, L., 1996. Euphrates Poplar forest. China Environmental Science Press, China 482 pp.
– Sohrabi, H., Akbarinia, M. and Hosseyni, S. M., 2005. Assesment plant species diversity of ecosystematic unit in Dehsorkh forestry zone of Javanrood, Journal of Environmental Studies, 41: 61-68.
– Sokal, R.R., Grovello, T.J. and Unrasch, R.S., 1986. Geographic variation of vegetative characters of *Populus deltoids*. Syst. Bot, 11:419- 432.
– Vandenbroeck, A., Slychen, J., Halfmaerten, D., and Depraeter, D., 2000. Isozyme polymorphism in the Belgian and Hungarian *Populus nigra* gene bank and the EUFORGEN *Populus nigra* Core collection. 21St Session of International Poplar Commission (IPC), 187.
– Zarre, Sh., Khodaei, Z., Karamali, Z., Nikname, V. and Mirmasoumi, M., 2007. Isoenzyme variation patterns and species concept in *Astragalus gossypinus* and *Astragalus persicus* complexes (Fabaceae) in Iran, Biochemical Systematices and Ecology, 35: 757 -763.
– Zarre, Sh., Rajaiy, N., Ebrahimzadeh, H., Habibi, M. and Nikname, V., 2004. Isoenzyme variation in some populations of a rare endemic species *Astragaluse submitis* (Fabaceae) in Iran, Biochemical Systematic and Ecology, 32: 675 -684.
– Ziyai -Ziyabari, S.F., 1993. Genetic Resources of Poplar Species in Iran and Their Protection Methods, Pajouhesh va Sazandegi, 16: 28-31.
Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14: 202-214.
– Korori, S.A.A., 1989. Dissertationsarbeit Zur Eelangung des Dokorgrades and der Universtat fer Badenkult in Wien Enginereicht Von Frou Dipl.Ing. Iran.
– Krishnan, H.B. and Sleper, D.A. 1997; Identification of tall fescue cultivars by sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis of seed proteins. Crop Science, 37: 215–219 .
– Kristinnic, A., Trinajstic, I., Kajba, P. and Samardzic, J., 1997. Morphological variability of leaves of Black Poplar(*Poulus nigra* L.) in natural stands along the sava river crotia. *Populus nigra* Network, IPGRI, 71-77.
– Machon, N., Lefranc, M., Bilger, I.J., Mazer, S. and Sarr, A., 1997. Allozyme variation in Ulmus species from France: analysis differention, Heredity, 78: 12-20.
– Manjuntha, B.R., Virupakshi, S. and Naik, G.R., 2003. Peroxidase isozyme polymorphism in popular sugarcane cultivar, Current Science, 85: 1347- 1349.
– Marvi Mohajer, M., 2005. Silviculture, Tehran University Press, Tehran, 387 pp.
– Riggs, L,A., 1990. Conserving genetic resources on-site in forest ecosystems. Forest Ecology and Management, 35: 45-68.
– Rottenberg, A., Nevo, E. and Zhary, D., 2000. Genetic variability in sexually dimorphic and monomorphic population of *Populus euphratica* (Salicaseae). Canadian Journal of Forestry Research, 30: 482-486.
– Salehi Shanjani, P. and Vendramin G.G., 2007. Genetic differentiation between generations of beech (*Fagus orientalis* Lipsky) populations in Caspian forests. Iranian Journal of Biology, 20:50-60.

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of genetic diversity in endangered stands of *Populus caspica* Bornm. of sub-mountain forests in north of Iran

H. Fallah[1], M. Tabari[*2], D. Azadfar[3] and F. Babaie[4]

1- M.Sc., Forestry, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Assis. Prof., Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran,
E-mail: masoudtabari@yahoo.com
3- Assis. Prof., Agricultural and Natural Resources University of Gorgan, Gorgan, I.R.Iran
4- M.Sc., Forestry, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran

Received: 01.05.2011 Accepted: 16.10.2011

Abstract

In order to investigate the genetic diversity within and between populations of *Populus caspica* Bornm. based on peroxidase enzyme and morphological leaf traits markers, sampling of thirty trees with over one hundred meter distance were selected in three sub mountain forest habitats (Neka, Golestan, Marzanabad). Two-year old branches were taken on trees crown to investigate quantitative and qualitative peroxidase enzyme activities. Thirteen leaf traits were also recorded in morphological study. Quantitative study of peroxidase using UV Spectrophotometer and qualitative studies were performed by polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE). Results showed that the number of main serration of leaf, petiole length, leaf dry matter, angle between the main vein and the second vein and the distance down the most broad leaf area to rule leaf were efficient treats for morphological diversity investigation of the species. By quantitative method, the highest and the lowest activity were related to Marzanabad and Neka, respectively. The qualitative results of the enzyme peroxidase showed the most variation within population in Golestan (15 ha) and lowest in Neka habitat (14 ha). Classification of isoenzyme bands and morphological traits showed high genetic differentiation of several genetic classes within and between the populations for the species. Whereas, three ecotypes of Neka, Golestan and Marzanabad were distinguished. However, peroxidase isoenzyme markers showed more efficient to ecotype differentiation. Also, peroxidase band patterns and morphological marker between male and female individuals didn't show any differences within the populations.

Key words: Peroxidase, Genetic diversity, Caspian forests, *Populus caspica* Bornm.

www.SID.ir