دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۲۵۸-۲۴۷ (۱۳۹۶)

ارزیابی نتاج حاصل از تولید مثل جنسی درختان پده با استفاده از شاخص‌های ریخت‌شناسی برگ و ایزوآنزیم

محسن کلاگری[۱*]، حسین میرزائی ندوشن[۲]، فرهاد اسدی[۳] و پروین صالحی شانجانی[۴]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران
پست الکترونیک: calagari@rifr-ac.ir

۲- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۳- دانشیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مازندران

۴- دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۲

چکیده

گونه پده به‌دلیل سازگاری در شرایط اکولوژیکی مختلف و دگرگشن بودن می‌تواند نهال‌های بذری با تنوع ژنتیکی بالا تولید کند که در فرایند انتخاب درختان برتر، دورگ‌گیری و در نهایت تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب به‌لحاظ کمی و کیفی نقش مهمی داشته‌باشد. هدف این تحقیق ارزیابی ویژگی‌های ایزوآنزیمی و ریخت‌شناسی برگ در برخی از ژنوتیپ‌های حاصل از تولید مثل جنسی در گونه پده بود. تعداد ۵۰ ژنوتیپ بذری پده از درختان مادری ۱۲ رویشگاه مختلف که به‌لحاظ ویژگی‌های کمی و کیفی رشد نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری داشتند انتخاب و تنوع نتاج حاصل از درختان به‌لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی برگ و فعالیت آنزیم پراکسیداز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ریخت‌شناسی برگ نشان داد که نتاج درختان مادری رویشگاه‌های گتوند و لرستان بیشترین و نتاج درختان زابل کمترین مقدار طول، حداکثر پهنا و سطح برگ را داشتند. نتایج تجزیه واریانس ایزوآنزیمی برای ژنوتیپ‌های برتر از درختان رویشگاه‌های مختلف نشان داد که گوناگونی ژنتیکی در درون ژنوتیپ‌های برتر و میان درختان مادری آنها به‌ترتیب ۶۹ و ۳۱ درصد بود. همچنین مقدار ضریب تنوع در درون ژنوتیپ‌های برتر و درختان والد دارای تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بود. بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ‌های درختان درفول، سرخس و زابل به‌ترتیب با ۱، ۰/۸۳ و ۰/۸۳ بود. بیشترین تعداد آلل مؤثر و ضریب شانون متعلق به ژنوتیپ‌های رویشگاه زابل به‌ترتیب با ۲/۹۳ و ۱/۱۲ بود.

واژه‌های کلیدی: ایزوآنزیم، پده، پراکسیداز، ریخت‌شناسی برگ، نهال بذری.

مقدمه

گونه‌های مختلف جنس صنوبر به‌دلیل دگرگشن بودن و هتروزیگوسیتی نهال‌های حاصل از بذر آنها، دارای تنوع ژنتیکی زیادی می‌باشند. این درختان با تولید بذر زیاد و پراکندگی و گسترش توسط باد می‌توانند تنوع ژنتیکی خود را در دامنه جغرافیایی وسیعی گسترش دهند. همین امر محققان را ملزم می‌کند تا با جمع‌آوری بذر از درختان مناطق مختلف جغرافیایی و کشت آنها ژنوتیپ‌های مطلوب

Archive of SID

www.SID.ir

از نظر تولید کمی و کیفی چوب، مقاومت در برابر عوامل زنده و تنش‌های محیطی را انتخاب کنند. تقلیل سطح تنوع ژنتیکی صنوبرها به‌دلیل تکثیر غیرجنسی (قلمه یا ریشه-جوش) توجیهی بر ادامه فعالیت‌های اصلاحی و استفاده از بذر آنها در تکثیر را مطرح می‌کنند (Asadi *et al*., 2004). در گونه سفید پلت (*P. caspica* L.) فقدان شرایط تکثیر جنسی شامل نور لازم، خاک مناسب و رطوبت کافی به‌طور توام باعث شده که اندک بذرهای سبز شده نتوانند به درختان بالغ تبدیل شوند و در همان مراحل اولیه حذف شوند. بنابراین به‌دلیل کمبود تولید مثل جنسی در طبیعت، این درختان فاقد تنوع ژنتیکی کافی هستند و ضمن حساسیت به تنش‌های محیطی، امکان افزایش عملکرد از طریق انتخاب کلن‌های موجود در آنها وجود ندارد (Asadi & Mirzaie-Nodoushan, 2011).

با توجه به اینکه مناطق وسیعی از کشور را مناطق گرم و خشک با خاک شور و قلیا تشکیل می‌دهد استفاده از کلن-هایی از صنوبر که با وجود مقاومت به شرایط محیطی بتوانند به‌عنوان زراعت چوب مورد استفاده قرار گیرند از اهمیت زیادی برخوردار است. البته معرفی ارقام مقاوم، سازگار و پرمحصول صنوبر در مناطق خشک و گرمسیری یکی راه‌های افزایش توسعه زراعت چوب و ایجاد اشتغال در این مناطق می‌باشد. گونه پده از درختان بومی ایران با دامنه وسیع اکولوژیکی است. به‌دلیل ویژگی‌های بسیار خوب این گونه تلاقی‌های بین گونه‌ای متعددی انجام شده (Jafari-Mofidabadi & Modirrahmati, 2000) تا این ویژگی‌ها را به سایر گونه‌های جنس صنوبر منتقل نمایند. تلاش‌هایی در سطح بین‌المللی انجام شده‌است تا از صفات مطلوب تحمل به شوری و خشکی استفاده شود (Singh *et al*., 2002; Rottenberg *et al*., 2000). از آنجا که آب و هوای کره زمین رو به گرم شدن است، گونه‌هایی که تحمل نسبی به گرما داشته باشند مورد توجه ویژه خواهندبود. به‌همین دلیل این گونه مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته-است تا ویژگی تحمل به گرما در آن بررسی و مورد استفاده قرار گیرد (Grover *et al*., 2000; Wang *et al*., 2003).

فرایند اصلاح و بومی‌سازی جنس صنوبر طوری است که محققان را قادر می‌سازد تا با ایجاد فنوتیپ‌های جدید بتوانند علاوه بر افزایش عملکرد و تولید کمی، بر تغییرات شرایط محیطی فائق آمده و سازگاری گونه‌ها را حفظ کنند (Arens *et al*., 1998). یکی از اهداف برنامه‌های اصلاحی و تولید کلن، ایجاد ژنوتیپ‌های با تنوع ژنی بالا به‌منظور کاهش خطرهای حاصل از کشت در شرایط آب و هوایی مختلف و آفات و بیماریها می‌باشد (Roberds & Bishir, 1997). یکی از مراحل اساسی در تولید کلن‌های برتر انتخاب والدین یا درختان مادری مناسب از بین والدین متعدد است. این انتخاب را می‌توان از طریق ارزیابی درختان والد حاصل از توده‌های مختلف و یا ارزیابی نتاج حاصل از ژنوتیپ‌های بذری آنها انجام داد. در این ارتباط در استان گان‌سو کشور چین انتخاب درختان برتر پده طی سه مرحله گزینش منجر به ژنوتیپ‌های برتری شد که دارای مشخصه-های کمی مانند توانمندی رشد و نیز مشخصه‌های کیفی مانند شکل استوانه‌ای تنه، مقاومت به آفات و بیماری‌ها بودند (Shiji *et al*., 1996).

در اصلاح گونه‌های دگرگشن، تولید مثل جنسی عمومی‌ترین روش ایجاد تنوع ژنتیکی و تعیین کلن‌های برتر و اصلاح جمعیت‌های ناهمگن است. در تولید کلن‌های برتر یکی از مراحل اساسی انتخاب والدین یا درختان مادری مناسب از بین والدین متعدد است. این انتخاب را می‌توان از طریق ارزیابی درختان والد حاصل از توده‌های مختلف و یا ارزیابی نتاج حاصل از ژنوتیپ‌های بذری آنها انجام داد. در این ارتباط، در کشور چین با انتخاب درختان برتر پده طی سه مرحله گزینش توانستند به ژنوتیپ‌های برتری دست یابند که دارای مشخصه‌های کمی مانند توانمندی رشد و نیز مشخصه‌های کیفی مانند فرم استوانه‌ای تنه، مقاومت به آفات و بیماری‌ها بودند (Shiji *et al*., 1996).

تفاوت‌های فنوتیپی درون جمعیتی جنس صنوبر به‌طور گسترده در ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلن‌های طبیعی گونه-های *P. tremuloides* و *P. grandidentata* (Barnes, 1966) و کلن‌های گونه صنوبر لرزان *P. tremula* (Farmer

Archive of SID

www.SID.ir

& Barnes, 1978) گزارش شده‌است. در ایران نیز با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی تنوع ژنوتیپ‌های گونه پده (Calagari *et al*., 2014) و نیز گونه بادام (Emam *et al*., 2014) بررسی شده است.

آنزیم پراکسیداز به‌دلیل تعدد باندها و نیز امکان وضوح باند برای مطالعات ایزوآنزیمی مورد توجه محققان است. در ایران بررسی‌های متعددی برای تنوع ژنتیکی با استفاده از این آنزیم بر روی درختان جوامع طبیعی پده (Calagari *et al*., 2007) و نیز درختان افراپلت (Khaksar *et al*., 2015) انجام شد. هدف این تحقیق ارزیابی ویژگی‌های ایزوآنزیمی و ریخت‌شناسی برگ در نتاج برتر از درختان رویشگاه‌های مختلف که از طریق تولید مثل جنسی تولید و طی چهار سال در عرصه رشد کرده‌اند، بود.

مواد و روش‌ها

معرفی منطقه

محل اجرای طرح در ایستگاه تحقیقات البرز کرج واقع در جنوب شهر کرج در حدود ۷ کیلومتری از مرکز شهر بود. عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه شمالی، طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۴ دقیقه شرقی و ارتفاع از سطح دریا ۱۳۰۰ متر می‌باشد. میانگین بارندگی سالیانه ۲۵۰ میلی‌متر، میانگین درجه حرارت ۱۳/۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل مطلق درجه حرارت ۲۱/۷- سانتی‌گراد، حداکثر مطلق درجه حرارت ۴۱ درجه سانتی‌گراد و طبقه آب و هوایی با روش آمبرژه نیمه‌خشک با زمستان‌های معتدل تا سرد می‌باشد. هدایت الکتریکی خاک کمتر از یک دسی-زیمنس بر متر و اسیدیته خاک نیز ۷/۳ است.

روش اجرای پژوهش

تعدادی از درختان برتر به‌لحاظ فنوتیپی از رویشگاه‌های مختلف انتخاب و از آنها بذر تهیه شد. در انتخاب درختان سعی شد رویشگاه‌هایی مورد بررسی قرار گیرند که درختان علاوه بر وضعیت مطلوب رویشی، به‌لحاظ آب و هوا، اقلیم، طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با یکدیگر اختلافاتی را نشان دهند (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی جغرافیایی و آب و هوایی محل انتخاب درختان مادری پده

نام رویشگاه درخت مادری	تعداد پایه درخت	طول جغرافیایی شرقی	عرض جغرافیایی شمالی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	میانگین بارندگی سالانه (میلی‌متر)	میانگین دمای سالانه (سانتی‌گراد)
خوزستان-حمیدیه	۲	۴۸° ۲۵´	۳۱° ۳۰´	۵۰	۱۹۴/۵	۲۴/۲
خوزستان-گتوند	۵	۴۸° ۵۰´	۳۲° ۰۹´	۷۰	۲۹۵/۹	۲۴/۸
خوزستان-دزفول	۲	۴۸° ۲۰´	۳۲° ۱۵´	۸۸	۴۴۴/۳	۲۴
سمنان-گرمسار	۲	۵۲° ۲۵´	۳۵° ۱۸´	۱۰۰۰	۱۰۴	۱۸/۷
خراسان-سرخس	۳	۶۱° ۱۰´	۳۶° ۱۵´	۲۶۰	۲۰۳/۳	۱۷/۶
گلستان-داشلی‌برون	۲	۵۴° ۵۶´	۳۷° ۴۶´	۵۰	۲۰۱/۹	۱۷/۱
کرمان-بافت	۱	۵۶° ۴۵´	۲۸° ۵۸´	۱۸۷۰	۱۴۳/۱	۱۶/۱
سیستان-زابل	۱	۶۱° ۳۸´	۳۰° ۵۰´	۳۸۰	۶۵/۴	۲۲/۲
تهران-خجیر	۲	۵۱° ۴۵´	۳۵° ۳۹´	۱۳۲۰	۲۳۱/۹	۱۷/۶
لرستان-معمولان	۴	۴۷° ۵۶´	۳۳° ۲۷´	۹۳۵	۳۵۹/۹	۲۳/۳
اصفهان-ناژوان	۲	۵۱° ۳۸´	۳۲° ۳۸´	۱۶۰۰	۱۲۳/۸	۱۶/۶
گیلان-منجیل	۲	۴۹° ۲۶´	۳۶° ۴۰´	۳۰۰	۱۹۶/۴	۱۷/۳

Archive of SID

www.SID.ir

ابتدا بذرها در گلدانهای پلاستیکی حاوی ماسه بادی در داخل گلخانه کاشته شدند. آنگاه در اواخر آذرماه نهال‌ها در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه بادی، خاک رس و پیت ماس به‌نسبت ۱:۲:۳ بازکاشت و تا اواخر فروردین ماه تا زمان انتقال به زمین در گلخانه نگهداری و بعد نهال‌های بذری به عرصه کاشت منتقل شده و در فواصل ۱*۲ متر (فاصله بین ردیف دو متر و فاصله داخل ردیف یک متر) در زمین کشت شد. بعد از سه سال ارزیابی رشد تعداد ۵۰ ژنوتیپ برتر از ۱۲ درخت مادری با مبدأهای جغرافیایی مختلف (از هر رویشگاه چهار ژنوتیپ برتر و از درختان رویشگاه‌های حمیدیه و گتوند ۵ ژنوتیپ برتر) انتخاب شد. به‌منظور بررسی صفات ریخت‌شناسی برگ در سال چهارم بعد از کاشت زمانی که برگها شکل تکاملی خود را حفظ کرده‌اند در اواسط فصل رویش (اواسط تابستان ۱۳۹۴) اقدام به نمونه‌برداری از برگ درختان نتاج رویشگاه‌های مختلف شد. به این ترتیب که از هر پایه پنج برگ (حداقل ۵۰ برگ) در یک جهت مشخص و در ارتفاع میانی جمع‌آوری شده و بعد تعداد ۳۰ نمونه برگ به‌طور تصادفی (در قالب سه تکرار ۱۰ تایی) انتخاب شد و صفات ریخت‌شناسی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند (جدول ۲). همه اندازه‌گیری‌های طول و فاصله‌ها با کولیس دیجیتال انجام شد. سطح برگ با استفاده از شبکه نقطه‌چین اندازه‌گیری شد. سطح ویژه برگ از نسبت بین مجموع سطح برگ به وزن خشک برگ محاسبه شد.

به‌منظور تهیه مواد استخراجی آنزیم پراکسیداز، از برگ جوان نهال سه ساله ژنوتیپ‌های بذری که در ایستگاه تحقیقات البرز کرج وابسته به مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور کاشته شده بود، استفاده شد. برگهای جوان در اوایل فصل رشد (نیمه اول اردیبهشت ماه) که بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز صورت می‌گیرد جمع‌آوری و برای حفظ رطوبت در کیسه‌های نایلونی قرار داده شدند و بلافاصله در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد به‌روش الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (PAGE) مطالعه شدند. اطلاعات حاصل از بررسی آنزیم پراکسیداز به‌صورت باند لوکوس‌های مجزای آنزیمی برای ژنوتیپ‌های مختلف و درختان مادری روی صفحه ژل پلی‌آکریل‌آمید نمایان شد. بر روی ژل با شمارش تعداد باندهای آشکار شده در هر لوکوس ماتریس داده‌ها تشکل شد.

جدول۲- فهرست صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده درختان مورد مطالعه در مناطق تحت بررسی

ردیف	صفت مورد اندازه‌گیری	مقیاس	علامت اختصاری
۱	طول برگ	سانتی‌متر	*LL*
۲	حداکثر پهنای برگ	سانتی‌متر	*MLW*
۳	طول دمبرگ	سانتی‌متر	*PL*
۴	نسبت طول برگ به حداکثر پهنای برگ	نسبت	*LL/MLW*
۵	نسبت طول دمبرگ به طول برگ	نسبت	*PL/LL*
۶	سطح برگ	سانتی‌متر مربع	*LA*
۷	سطح ویژه برگ	سانتی‌متر بر گرم ماده خشک	*SLA*

روش آماری

به‌منظور آزمون نرمال‌بودن و همگنی واریانس داده‌ها به‌ترتیب از آزمون‌های کلموگروف- اسمیرنوف و لون با نرم‌افزار SPSS استفاده شد و برای تجزیه واریانس هریک از صفت‌های ریخت‌شناسی برگ از طرح آماری کاملا تصادفی استفاده شد. آزمون مقایسه میانگین‌ها به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار SAS انجام گردید. میانگین تعداد باند در لوکوس، هتروزیگوسیتی و درصد پلی-

Archive of SID
www.SID.ir

مورفیسم لوکوس‌ها با نرم‌افزار GeneAlex محاسبه شد (Peakal & Smouse, 2006). فاصله ژنتیکی برای ۱۲ رویشگاه از ژنوتیپ‌های مختلف پده براساس معادله نی (Nei, 1978) برآورد شد. دارنگار مربوط به ژنوتیپ‌های هر درخت و درختان رویشگاه‌های مختلف با نرم‌افزار MEGA ترسیم شد.

نتایج

نتایج ویژگی‌های ریخت‌شناسی برگ

نتایج ویژگی‌های ریخت‌شناسی برگ نتاج حاصل از درختان مادری رویشگاه‌های مختلف پده کاشته شده در ایستگاه البرز کرج که در مرحله تکاملی یا بلوغ بودند تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان دادند (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر مشخصه‌های ریخت‌شناسی برگ، نتاج درختان رویشگاه‌های لرستان، گلستان و گتوند به‌ترتیب با ۷/۳ ، ۶/۹ و ۶/۸ سانتی‌متر بیشترین طول برگ را داشتند. نتاج درختان رویشگاه‌های گلستان، اصفهان و لرستان به‌ترتیب با ۶/۳، ۶/۱ و ۶ سانتی‌متر بیشترین پهنای برگ را داشتند. کمترین طول و پهنای برگ نیز مربوط به نتاج درختان زابل به‌ترتیب با ۴ و ۳/۸ سانتی‌متر بود (جدول ۴).

بلندترین طول دمبرگ مربوط به نتاج درختان اصفهان و خجیر به‌ترتیب با ۳/۳ و ۳/۱ سانتی‌متر و کوتاه‌ترین طول دمبرگ نیز مربوط به نتاج درختان دزفول با ۲/۵ سانتی‌متر طول بود. بیشترین نسبت طول برگ به حداکثر پهنای برگ در نتاج درختان لرستان و خجیر به‌ترتیب با ۱/۲ و ۱/۱۹ و کمترین نسبت نیز مربوط به نتاج درختان اصفهان با ۰/۹۲ بود. همچنین بیشترین نسبت طول دمبرگ به‌طول برگ مربوط به نتاج درختان زابل با ۰/۶۷ و کمترین نسبت نیز مربوط به نتاج درختان لرستان و گلستان به‌ترتیب با نسبت ۰/۳۵ و ۰/۴۱ در مقایسه با سایر نتاج درختان رویشگاه‌های مختلف بود (جدول ۴). بیشترین سطح برگ مربوط به نتاج گتوند و لرستان به‌ترتیب با ۲۷/۲ و ۲۶/۵ سانتی‌متر مربع و کمترین مقدار سطح برگ نیز مربوط به نتاج درختان زابل و سرخس به‌ترتیب با ۱۵/۳ و ۱۷/۷ سانتی-متر مربع بود. سطح ویژه برگ نیز در نتاج درختان گلستان با ۱۴۴/۷ سانتی‌متر بر گرم ماده خشک بیشترین بود. درحالیکه نتاج درختان سرخس با ۶۳/۱ سانتی‌متر بر گرم ماده خشک کمترین مقدار را داشتند (جدول ۴).

نتایج بررسی تنوع نتاج درختان رویشگاه‌های مختلف پده با استفاده از آیزوزایم‌های پراکسیداز

نتایج حاصل از الکتروفورز آیزوزایم‌های آنزیم پراکسیداز از ژنوتیپ‌های برتر درختان ۱۲ رویشگاه پده نشان داد که آنزیم پراکسیداز به‌وسیله ۳ مقر ژنی کنترل می‌شود. به‌طوری‌که سه ناحیه فعالیت روی ژل ظاهر شد و تحت عنوان PX-A ، PX-B و PX-C مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳ آلل در PX-A، ۴ آلل در PX-B و ۵ آلل در PX-C مشاهده شد. در میان ژنوتیپ‌های ۱۲ رویشگاه مورد بررسی بیشترین میزان فراوانی آللی (Na) متعلق به ژنوتیپ-های رویشگاه زابل با میزان ۳/۳۳ و کمترین فراوانی آللی نیز متعلق به رویشگاه‌های گلستان و منجیل با ۰/۶۷ بود. درصد پلی‌مورفیسم لوکوس‌ها در رویشگاه‌های دزفول، گرمسار، سرخس و زابل به میزان ۱۰۰ درصد و در رویشگاه‌های حمیدیه، گتوند، گلستان، لرستان، اصفهان و منجیل تا ۳۳ درصد در نوسان بود (جدول ۵).

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس ویژگی‌های ریخت‌شناسی نهال‌های بذری پده در سال چهارم بعد از کاشت

منابع تغییرات	D.F.	*MLW*	*LL*	*LL/MLW*	*PL*	*PL/LL*	*LA*	*SLA*
تکرار	۲	۰/۰۲۵^{ns}	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۰۴^{ns}	۱۷/۵^{ns}	۰/۵۳^{ns}	۰/۵۵^{ns}	۰/۲۱^{ns}
رویشگاه نتاج	۱۱	۱/۱۸**	۲۴/۱**	۰/۰۲۳**	۶۷/۵**	۱/۹۹**	۳۳/۹**	۱۳۰۱/۳**
خطا	۲۲	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۰۱	۰/۷	۰/۵	۱/۷۳	۰/۹۵

*: معنی‌دار در سطح ۵٪، **: معنی‌دار در سطح ۱٪، ns: عدم معنی‌داری

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- دسته‌بندی میانگین مشخصه‌های ریخت‌شناسی نهال‌های بذری پده در سال چهارم بعد از کاشت

پروونانس	LL (cm)	MLW (cm)	LL/MLW	PL (cm)	PL/LL	LA (cm^2)	SLA (cm^2/gr)
حمیدیه	۵/۹ cd	۵/۴ de	۱/۰۸ cd	۲/۷ cde	۰/۴۷ def	۲۰/۶ d	۹۱/۷ bc
گتوند	۶/۸ b	۵/۹ bcd	۱/۱۶ b	۲/۹ bc	۰/۴۳ ef	۲۷/۲ a	۱۰۰ b
دزفول	۵/۸ cd	۵/۶ bcd	۱/۰۴ de	۲/۵ e	۰/۴۴ ef	۲۲/۲ cd	۹۳/۸ bc
گرمسار	۵/۵ d	۵/۴ de	۱ e	۳ bc	۰/۵۴ bc	۲۰/۵ d	۷۵/۵ cd
سرخس	۵/۷ cd	۵/۵ cde	۱/۰۳ de	۲/۹ bc	۰/۵۱ cd	۱۷/۷ e	۶۳/۱ e
گلستان	۶/۹ b	۶/۳ a	۱/۰۸ cd	۲/۸ bcd	۰/۴۱ fg	۲۲/۴ cd	۱۴۴/۷ a
کرمان	۵/۷ cd	۵/۷ cde	۱ e	۲/۸ bcd	۰/۴۹ cde	۲۰/۸ d	۸۹/۳ c
زابل	۴ e	۳/۸ e	۰۶/۱ cde	۲/۸ bcd	۰/۶۷ a	۱۵/۳ f	۸۰ cd
خجیر	۶/۶ b	۵/۵ cde	۱/۱۹ ab	۳/۱ ab	۰/۴۷ def	۲۰/۴ d	۷۵/۱ d
لرستان	۷/۳ a	۶ ab	۱/۲ a	۲/۶ de	۰/۳۵ fg	۲۶/۵ ab	۵/۸۵ cd
اصفهان	۵/۶ d	۶/۱ ab	۰/۹۲ f	۳/۳ a	۰/۵۸ b	۲۴/۴ bc	۸۷/۶ c
منجیل	۶/۱ c	۵/۴ de	۱۳/۱ bc	۲/۶ de	۰/۴۳ ef	۲۰/۳ d	۶۹/۲ de

حروف متفاوت بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ احتمال می‌باشد.

جدول ۵- الگوهای آللی در ژنوتیپ‌های ۱۲ رویشگاه و درختان والد بر اساس داده‌های آنزیمی

رویشگاه	تعداد آلل	آلل‌های با فراوانی≤۵٪	تعداد آلل مؤثر	ضریب شانون	آلل نادر	آلل‌های با فراوانی≥۲۵٪	آلل‌های با فراوانی ≥۵۰٪	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی قابل انتظار	درصد پلی مورفیسم
حمیدیه	۱	۱	۰/۸۸	۰/۳۴	۰	۰	۰	۰/۳۳	۰/۲۱	۳۳/۳
گتوند	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۴۴	۰/۴۳	۰	۰	۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۲۳	۳۳/۳
دزفول	۲/۶۷	۲/۶۷	۲/۴	۰/۸۸	۰	۰	۱/۳۳	۱	۰/۵۶	۱۰۰
گرمسار	۲/۶۷	۲/۶۷	۱/۸۳	۰/۷۳	۰	۰	۱/۶۷	۰/۴۲	۰/۴۴	۱۰۰
سرخس	۲/۶۷	۲/۶۷	۲/۳۸	۰/۸۶	۰	۰	۱/۳۳	۰/۸۳	۰/۵۳	۱۰۰
گلستان	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۵۳	۰/۱۹	۰	۰	۰	۰/۱۷	۰/۱۳	۳۳/۳
کرمان	۱/۶۷	۱/۶۷	۱/۵۶	۰/۵۸	۰	۰/۶۷	۱	۰/۶۷	۰/۳۸	۶۶/۷
زابل	۳/۳۳	۳/۳۳	۲/۹۳	۱/۱۲	۰	۱	۲/۳۳	۰/۸۳	۰/۶۵	۱۰۰
خجیر	۲/۶۷	۲/۶۷	۲/۵۲	۰/۷۵	۰	۰	۱/۳۳	۰/۶۷	۰/۴۳	۶۶/۷
لرستان	۱/۳۳	۱/۳۳	۱/۱۸	۰/۴۴	۰	۰	۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۲۴	۳۳/۳
اصفهان	۱	۱	۰/۸۹	۰/۳۵	۰	۰	۰	۰/۳۳	۰/۲۱	۳۳/۳
منجیل	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۲۳	۰	۰	۰	۰/۳۳	۰/۱۷	۳۳/۳
درختان والد	۳/۳۳	۳/۳۳	۲/۸۸	۱/۰۶	۰	۰/۳۳	۲	۰/۷۸	۰/۶۲	۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

بیشترین میزان آلل‌های با فراوانی بزرگتر و مساوی ۵۰٪ متعلق به ژنوتیپ‌های رویشگاه زابل با مقدار ۲/۳۳ بود. بیشترین میزان آلل مؤثر و ضریب شانون به‌ترتیب با مقادیر ۲/۹۳ و ۱/۱۲ متعلق به رویشگاه زابل بود. آلل-های با فراوانی کوچکتر و مساوی ۲۵٪ فقط در ژنوتیپ-های رویشگاه‌های زابل و کرمان به‌ترتیب به میزان ۱ و ۰/۶۷ مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در رویشگاه‌های دزفول، سرخس و زابل به‌ترتیب با ۱، ۰/۸۳ و ۰/۸۳ بود (جدول ۵).

الگوی تمایز در ژنوتیپ‌های برتر حاصل از درختان مادری از رویشگاه‌های مورد بررسی

برای تعیین الگوی تمایز در ژنوتیپ‌های برتر حاصل از درختان مادری رویشگاه‌های مختلف پده، ابتدا فاصله ژنتیکی بین مبدأ درختان و نیز بین ژنوتیپ‌ها محاسبه شد. سپس با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای شباهت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و نیز رویشگاه‌ها تعیین شد (شکل۱). همان‌طور که در شکل۱ دیده می‌شود دارنگار تجزیه خوشه‌ای برای نتاج درختان ۱۲ رویشگاه پده، سه خوشه اصلی را نشان می‌دهد. خوشه اول شامل ژنوتیپ-های رویشگاه‌های زابل، دزفول، خجیر، سرخس، گتوند و گرمسار می‌باشد. خوشه دوم شامل ژنوتیپ‌های رویشگاه‌های حمیدیه، منجیل و اصفهان و در خوشه سوم نیز ژنوتیپ‌های رویشگاه‌های کرمان، گلستان و لرستان قرار دارند (شکل ۱).

همچنین نتایج شباهت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های برتر و درختان والد آنها سه خوشه اصلی را نشان داد. همان‌طور که در شکل۲ دیده می‌شود برخی از ژنوتیپ-های برتر و والد آنها در یک خوشه قرارگرفتند، به‌عنوان مثال بیشتر ژنوتیپ‌های برتر از رویشگاه‌های گتوند، اصفهان، حمیدیه، گلستان و زابل به‌همراه درخت والد آنها در یک خوشه قرار گرفتند. در مقابل برخی از ژنوتیپ-های برتر مانند کرمان، دزفول و خجیر و درختان والد آنها در خوشه‌های مختلف قرار گرفتند (شکل ۲).

تجزیه واریانس مولکولی در ژنوتیپ‌های پده با استفاده از آنزیم پراکسیداز

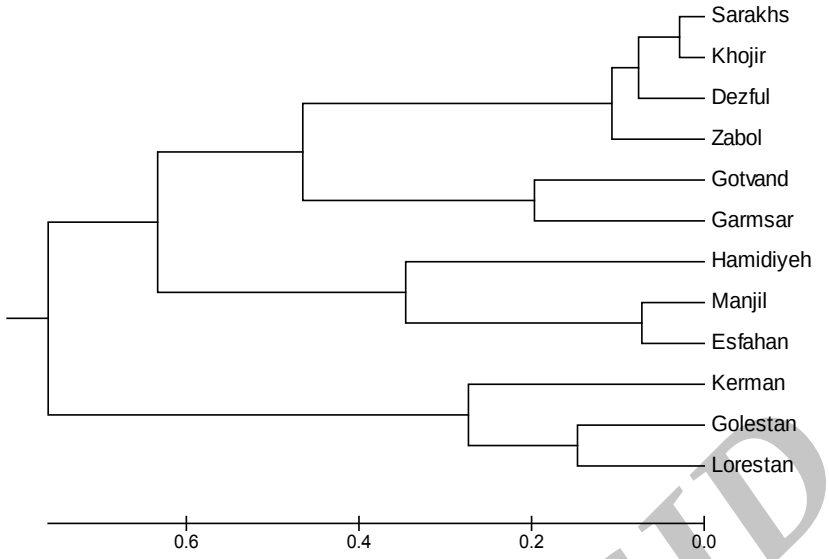
با بررسی نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای ۵۰ ژنوتیپ برتر از ۱۲ رویشگاه مختلف، سطح نسبتا بالایی از گوناگونی ژنتیکی در درون ژنوتیپ‌های برتر (۶۹ درصد) و میان درختان والد با مبدأ جغرافیایی مختلف (۳۱ درصد) به‌دست آمد (جدول۶). همچنین مقدار ضریب تنوع (Phi) درون جمعیتی (PhiPT) برابر ۰/۱۴۶ و میان درختان والد ۰/۳۰۷ بود که در سطح یک‌درصد تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۶).

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی داده‌های آنزیم پراکسیداز برای ژنوتیپ‌های ۱۲ رویشگاه پده

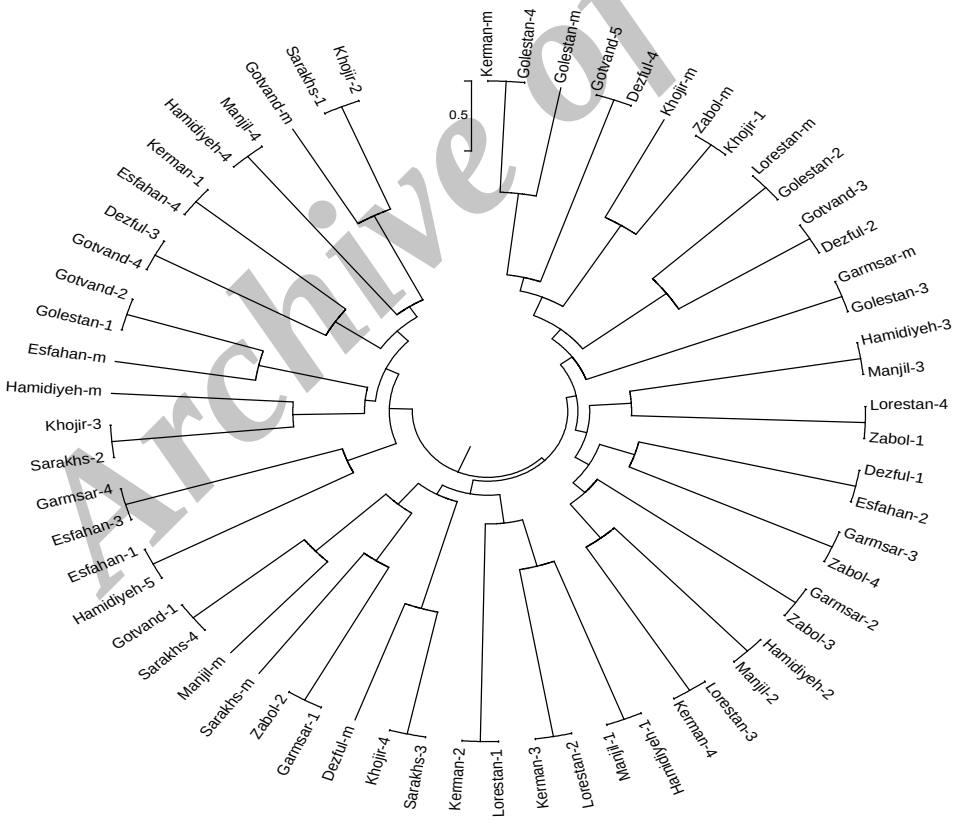
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	ضریب تنوع (Phi)	سطح احتمال
میان درختان والد	۱۱	۴۶/۱	۴/۱۲	۳۱	۰/۳۰۷	۰/۰۱۰
میان نتاج برتر درختان والد	۴۹	۷۲/۱	۱/۴۷	۶۹	۰/۱۴۶	۰/۰۱۰
کل	۶۱	۱۱۸/۲	۵/۵۹			

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- دارنگار حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش معدل گروهی (UPGMA) برای نتاج درختان رویشگاه‌های مختلف بر اساس ماتریس فاصله اقلیدسی



شکل ۲- دارنگار حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش معدل گروهی (UPGMA) برای نتاج برتر و درختان والد پده بر اساس ماتریس فاصله اقلیدسی

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

آزمون نتاج حاصل از درختان برتر در اغلب گونه‌ها به‌ویژه درختان دوپایه و دگرگشن مانند جنس صنوبر و بید منجر به گزینش ژنوتیپ‌ها و یا کلن‌های مطلوبی می‌شوند که قابلیت توانمندی در میزان عملکرد تولید چوب، تولید جست و تجدید کنده، شکل استوانه‌ای تنه، تکثیر غیرجنسی از طریق قلمه و مقاومت در برابر آفات و بیماریها را دارند. درختان انتخاب شده در مرحله آخر به‌عنوان درختان نخبه می‌توانند در عملیات دورگ‌گیری و یا به‌عنوان باغ بذر استفاده شوند (Shiji *et al*,. 1996). واکنش درختان پده در رویشگاه‌های مختلف کشور به رژیم‌های دمایی و اقلیمی، تفاوتهای مورفولوژیکی را در شکل برگها، شکل ساقه، شکل تاج و نیز میزان رشد نشان داده‌است (Calagari, 2010). در تمایز ژنتیکی گونه‌های صنوبر در جوامع طبیعی مهاجرت از طریق گرده و بذر نقش مهمی داشته، همچنین انتخاب طبیعی نیز بر روی این جمعیت‌ها عمل کرده و آنها را به شرایط محیطی منطقه سازگار کرده‌است و در نهایت سبب تغییر در ساختار ژنتیکی درختان در رویشگاه‌های مختلف شده‌است. در این ارتباط گزارش Dunlap و همکاران (۱۹۹۵) تغییرات ژنتیکی گونه صنوبر تریکوکارپا را تحت تأثیر عوامل محیطی و جغرافیایی تأیید می‌کند.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که صفات ریخت‌شناسی برگ در برخی از نتاج درختان مادری تفاوت معنی‌داری را به‌لحاظ آماری داشت. این سطح تنوع در عملیات اصلاحی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. با توجه به اینکه نهال‌های بذری همگی در عرصه‌ای در کرج کاشته شده بودند و از طرفی همین ژنوتیپ‌های بذری از درختانی هستند که منشأ جغرافیایی متفاوتی داشتند، بنابراین تنوع موجود در ویژگی‌های ریختی برگ و نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند اثرات ارثی نتاج و والد باشد.

کمترین ابعاد برگ (طول و پهنا) و سطح برگ مربوط به ژنوتیپ‌های دو رویشگاه زابل و سرخس بود. نتایج بررسی Calagari و همکاران (۲۰۱۰) نیز کاهش طول، پهنا و سطح برگ را در درختان توده‌های طبیعی این دو رویشگاه تأیید می‌کند. همچنین Homaie و همکاران (۲۰۱۴) نیز تفاوت معنی‌داری را در میان ژنوتیپ‌های بذری گونه پده با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیک و ریزمورفولوژیک به‌دست آوردند. بنابراین به‌طور آشکار می‌توان بیان کرد که هم درختان مادری در توده‌های طبیعی و هم نتاج آنها سطح برگ کوچکتری نسبت به درختان و نتاج سایر رویشگاه‌ها داشتند. از طرفی نتایج آیزوآنزیمی نیز نشان داد که این دو رویشگاه با بیشترین تعداد آلل مؤثر و ضریب شانون از سایر نتاج درختان دیگر متمایز شدند.

البته بررسی تسهیم گوناگونی ژنتیکی میان نتاج برتر و میان درختان والد سطح بالایی از گوناگونی ژنتیکی را نشان داد. این افزایش تنوع درون جمعیتی بالا را می‌توان به دگرگشن بودن این درختان نسبت داد. در این ارتباط Khaksar و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه درختان گونه افرایلت از سه رویشگاه با دامنه ارتفاعی متفاوت با استفاده از آنزیم پراکسیداز توانستند تنوع ژنتیکی را در درون و بین درختان این سه رویشگاه نشان دهند.

الگوی آللی در نتاج نهال‌های بذری حاصل از درختان ۱۲ رویشگاه مورد بررسی نشان داد که رویشگاه‌های دزفول، سرخس و زابل با بیشترین تعداد آلل مؤثر و هتروزیگوسیتی بالاترین سطح تنوع را داشتند که این می‌تواند در عملیات اصلاحی بین و درون گونه‌ای مورد توجه محققان قرار گیرد.

تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از نتاج درختان رویشگاه‌های مختلف سه خوشه عمده را نشان داد. ژنوتیپ‌هایی که دارای تعداد آلل مؤثر بیشتری بودند (ژنوتیپ‌های زابل، دزفول، خجیر و سرخس) در خوشه اول و ژنوتیپ‌های با تعداد آلل مؤثر کمتر (ژنوتیپ‌های حمیدیه، منجیل و اصفهان) نیز در خوشه سوم قرار گرفتند. نتاج درختان زابل در کنار رویشگاه‌های سرخس، خجیر و دزفول قرار گرفت. نتایج مطالعات Calagari و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داد که درختان این سه رویشگاه در یک گروه مجزا از سایر درختان متمایز شده‌بودند. تجزیه خوشه‌ای بین ژنوتیپ‌ها و درختان والد آنها نیز سه خوشه اصلی را نشان داد که الگوی شباهت بین ژنوتیپ‌های بذری درختان هر رویشگاه و والد آنها وجود نداشت و به‌غیر از ژنوتیپ‌های با مبدأ گتوند، اصفهان، حمیدیه، گلستان و زابل که به‌همراه درختان والد آنها در یک خوشه قرار گرفتند بقیه ژنوتیپ‌های برتر و درختان والد در خوشه‌های متفاوت پراکنده شدند. درختان والد این ژنوتیپ‌های بذری از نظر جغرافیایی با هم اختلاف داشتند ولی تنوع ژنتیکی داخل نتاج (ژنوتیپ‌های بذری) بیشتر از بین درختان والد بوده‌است. بررسی بر روی ۱۰ جامعه طبیعی گونه تریکوکارپا در امریکا نیز نشان می‌دهد که میانگین هتروزیگوسیتی داخل جوامع بیشتر از بین جوامع این گونه بوده‌است (Weber & Stetller, 1981).

منابع مورد استفاده

-Arens, P., Coops, H., Jansen, J. and Vosman, B., 1998. Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers, Molecular Ecology, 7: 11-18.

-Asadi, F. and Mirzaie-Nodoushan, H., 2011. Evaluation of different treatments in sexual reproduction *of Populus caspica* Bornm. for broadening its genetic basis in the nature. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 19(3): 441-452 (In Persian).

-Asadi, F., Naderi Shahab, M.A. and Mirzaie-Nodoushan, H., 2004. Identity and genetic diversity of *Populus* species clones using microsatellite marker. Pajouhes and Sazandegi, 66: 49-55 (In Persian).

-Barnes, B.V., 1966. The clonal growth habit of American aspens, Ecology, 47: 439-449.

-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(2): 115-122 (In Persian).

-Calagari, M., 2010. Selection of superior trees of *Populus euphratica* in the natural sites and stablishment of collection for germplasm reservation. Final Report of Project, Research Institute of Forests and Rangelands, 83p (In Persian).

-Calagari, M., Jalili, A., Abbas-azimi, A. and Salehi-Shanjani, P., 2014. Environmental effects of leaf morphology traits in the *Populus euphratica* Oliv, provenances of Iran. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 22(3): 369-380 (In Persian).

-Dunlap, J.M., Heilman, P.E. and Stettler, R.F., 1995. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. VIII. Leaf and crown morphology of native *P. trichocarpa* clones from four river valleys in Washington. Canadian Journal of Forest Research, 25: 1710-1725.

-Emam, M., Asadi-Corom, F., Mirzaie-Nodoushan, H., Jaimand, K. and Ghamari-Zare, A., 2014. Investigation of genetic variation of *Amygdalus scoparia* L. genotypes using some morphological, biochemical and seed storage proteins characteristics. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22(1): 34-42 (In Persian).

-Farmer, R.E. and Barnes, B.V., 1978. Morphological variation of families of trembling aspen in southeastern Michigan, The Michigan Botanist, 17: 141-153.

-Grover, A., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C. and Agarwal, S., 2000. Production of high temperature tolerant transgenic plants through manipulation of membrane lipids, Current Science, 79: 557–559.

-Homaie, M., Mirzaie-Nodoushan, H., Asadi-Corom, F., Bakhshi-Khaniki, Gh. R. and Calagari, M., 2014. Evaluation of half-sib progenies and their parents of *Populus euphratica* based on their morphologic and micro-morphologic traits. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 21(4): 768-779 (In Persian).

-Jafari-Mofidabadi, A. and Modirrahmati, A., 2000. Production of *Populus euphratica x Populus alba* hybrid poplar through ovary and ovule cultures plant. Silvae Genetica, 122: 13-15.

-Khaksar, R., Aldaghi, M., Salimi, A. and Espahbodi. K., 2015. Investigation on qualitative and quantitative changes of peroxidase isozyme in maple (*Acer velutinum*) at different altitudes of Mazandaran forests. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(2): 203-214 (In Persian).

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

-Peakal, R. and Smouse P.E., 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288–295.

-Robert, J.H. and Bishir, J., 1997. Risk analysis in

Archive of SID

www.SID.ir

clonal forestry, Canadian Journal of Forest Research, 85: 1136-1146.

-Rottenberg, A., Nevo, E. and Zhary, D., 2000. Genetic variability in sexually dimorphic and monomorphic population of *Populus euphratica* (*Salicaceae*). Canadian Journal of Forest Research, 30: 482-486.

-Shiji, W., Binghao, C. and Hugun, L., 1996. Euphrates poplar forest, China Environmental Science Press, 117 pp.

-Singh, N.B., Kumar, D., Gupta, R., Pundir, I. and Tornar, A., 2002. Intraspecific and interspecific hybridization in poplar for production of new clones, ENVIS Forestry Bulletin, 2(2): 11-16.

-Wang, W.X., Vinocur, B. and Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, Planta, 218: 1–14.

-Weber, J.C. and Stettler, R.F., 1981. Isoenzyme variation among ten (riparian) populations of *Populus trichocarpa* Torr. Et Gray in the pacific Northwest. Silvae Genetica, 30: 82-87.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of progenies of sexual reproduction of *Populus euphratica* provenances using leaf morphology and Isoenzyme markers

M. Calagari[1*], H. Mirzaie-Nodoushan[2], F. Asadi[3], and P. Salehi Shanjani[4]

1*- Corresponding author, Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R. Iran. E-mail: calagari@rifr-ac.ir
2- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R. Iran.
3- Assoc. Prof., Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Mazandaran, I.R. Iran.
4- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R. Iran.

Received: 3.01.2017 Accepted: 12.06.2017

Abstract

Because of adaptation to different ecological conditions, cross pollination and heterozygosity, *Populus euphratica* contains a large amount of genetic diversity, which could have an important role in superior phenotypes selection, in inter and intra specific hybridization processes. The main aim of this study was evaluation of leaf morphologic and Isoenzyme characteristics in several *P. euphratica* genotypes, produced by seed regeneration. A total of 50 superior seedlings from superior phenotypes of 12 parent trees of the species were selected. Seedlings evaluation was performed in a nursery located at Karaj research station, a city close to Tehran, Iran, during 2011 to 2015. In order to determine existing genetic variation, leaf morphology of seedlings and analysis of peroxidase isoenzyme were conducted. Peroxidase isoenzyme analysis was conducted on leaf extracts using polyacrylamid gel electrophoresis (PAGE). Analysis of variance showed significant differences among the seedlings of the parent trees for leaf morphologic traits. The most values of leaf length, leaf width and leaf area were observed on Gotvand and Lorestan originated seedlings, and the lowest value of the characters was observed on seedlings originated from Zabol habitat. Analysis of variance of superior genotypes from different habitats revealed within superior genotypes genetic variations (69%) and among habitats genetic variations (31%). Variation index (Phi) showed significant differences within progenies and superior parental trees. The most part of heterozygosity observed in Dezfol, Sarakhs and Zabol trees, with 1, 0.83, 0.83 values respectively. Maximum number of effective alleles and Shannon index belonged to Zabol habitat with 2.93 and 1.12 respectively.

Key words: Morphology characteristics, peroxidase isoenzyme , *Populus euphratica*, Seedling.

Archive of SID

www.SID.ir