

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، صفحه 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^۴

۱- کارشناس ارشد 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

۴- کارشناس ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی نور

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۰

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 پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز (PAGE) صورت گرفت. نتایج نشان داد که صفات تعداد دندان 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 (۱۴ هکتار) به ترتیب 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 بانندی 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

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

منابع تنوع زیستی پایه‌های پایداری زندگی بشری می‌باشند (Ganlin et al., 2006). تنوع زیستی مفهوم

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 برنامه‌های 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 مورفولوژیکی از قدیمی‌ترین ابزار طبقه‌بندی گیاهان می‌باشد (Espahbodi et al., 2006). استفاده از صفات مورفولوژیکی برگ از اقدامات لازم در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، تفکیک اکوتیپ‌ها و فعالیت‌های 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 الکتروفورزی این آنزیم استفاده کرده‌اند که بررسی تمایز ژنتیکی راش اروپایی *Fagus sylvatica* (Gomory et al., 1992) تنوع ایزوآنزیمی جمعیت‌های آن‌دمیک گونه *Astragalus submitis* و *Astragalus persicus* (Zarre et al., 2004) و تغییرات ژنتیکی جوامع پده *euphratica* (2007) و *Populus* (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 گونه‌های انحصاری مانند سفیدپلت، باید تحولی اساسی در مدیریت جنگل‌داری کشور با اندیشه‌ای نو مبتنی بر حفاظت اصولی از غنای ژنتیکی گیاهی این گونه‌ها انجام شود. در این تحقیق تنوع و تمایز ژنتیکی گونه سفیدپلت در سه رویشگاه میان بند جنگل‌های 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. پایه‌های نر و ماده در اواخر بهمن تا اواخر اسفند بواسطه شاتون‌های متفاوت (شاتون نر کوچکتر از شاتون ماده، دارای برگه تخم‌مرغی قهوه‌ای، مژه‌های بلند و ارغوانی و سرشار از گرده) از هم تفکیک شدند. در هر یک از مناطق مورد

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 ۴ درجه سانتیگراد)، جهت مطالعات آنزیمی به آزمایشگاه انتقال داده شد.

جهت عصاره‌گیری، نمونه‌ها را در هاون چینی مخصوص کاملاً خرد نموده و پس از اضافه کردن محلول عصاره‌گیری، توسط دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، ایزوآنزیم‌ها استخراج شدند تا مرحله شروع آزمایش‌های کمی و کیفی آنزیمی در دمای ۴ 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 (پلی‌اکریل‌آمید 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 داده‌ها (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS Ver, 17 انجام شد. تجزیه و تحلیل در مورد داده‌های الکتروفورتیکی (ژل‌های 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 (پلاستیسیته) نیز با استفاده از روش (Bruschi et al, 2003) طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$PI = 1 - \frac{x}{X}$$

PI = پلاستیسیته 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 کوفتتیک انجام شد. در نهایت دندروگرام حاصل از روش Wards با ضریب همبستگی کوفتتیک 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	۴۲۵	۳۶° ۲۹' ۱۱"	۵۱° ۱۹' ۱۲"	۱
استخرپشت نکا	۵۳۰	۳۶° ۳۵' ۰۷"	۵۲° ۳۸' ۱۲"	۱۴
پارک جنگلی گلستان	۵۲۰	۳۷° ۲۳' ۱۶"	۵۵° ۵۴' ۰۸"	۱۵



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق مورد مطالعه روی نقشه

جدول ۲- صفات مورفولوژیک و مقیاس‌های مورد استفاده در اندازه‌گیری

مقیاس	صفت مورفولوژیک	ردیف
سانتیمتر مربع	سطح برگ	۱
سانتیمتر	طول برگ	۲
سانتیمتر	حداکثر پهنای برگ	۳
سانتیمتر	طول دم‌برگ	۴
سانتیمتر	نسبت طول دم‌برگ به طول برگ	۵
عدد	تعداد دندانان اصلی	۶
سانتیمتر	فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ	۷
سانتیمتر	فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا رگبرگ اصلی	۸
میلیمتر	ضخامت برگ	۹
درجه	زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایینی	۱۰
درصد	ماده خشک برگ	۱۱
میلیمتر	حداکثر عمق دندانان برگ	۱۲
نسبت	نسبت طول برگ به پهنای برگ	۱۳

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها به لحاظ میانگین فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز تفاوت معنی‌داری را بین رویشگاه‌های مورد بررسی نشان داد. رویشگاه‌های مرزن‌آباد و گلستان

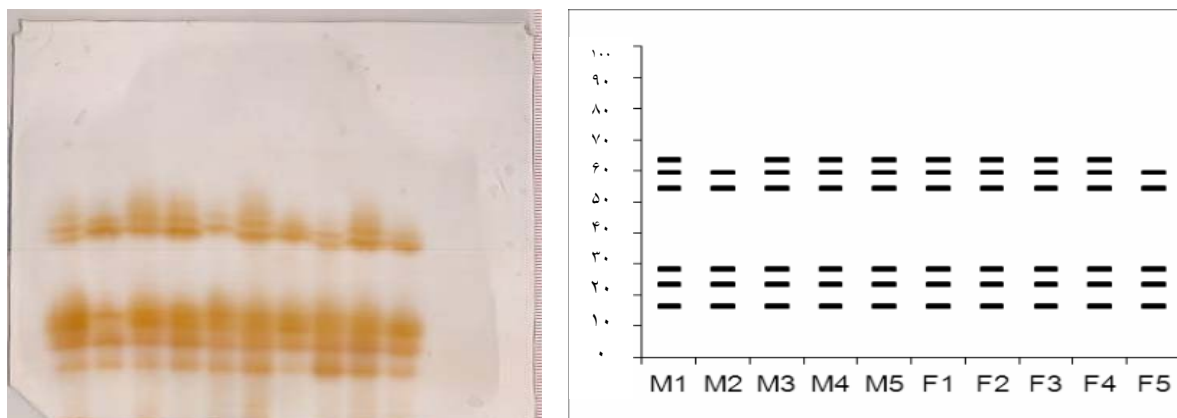
دارای بیشترین میانگین فعالیت کمی پراکسیداز و در گروه a و رویشگاه نکا با میانگین ۰/۰۴۶ به تنهایی در گروه b و دارای کمترین میانگین فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز می‌باشد (جدول ۳).

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

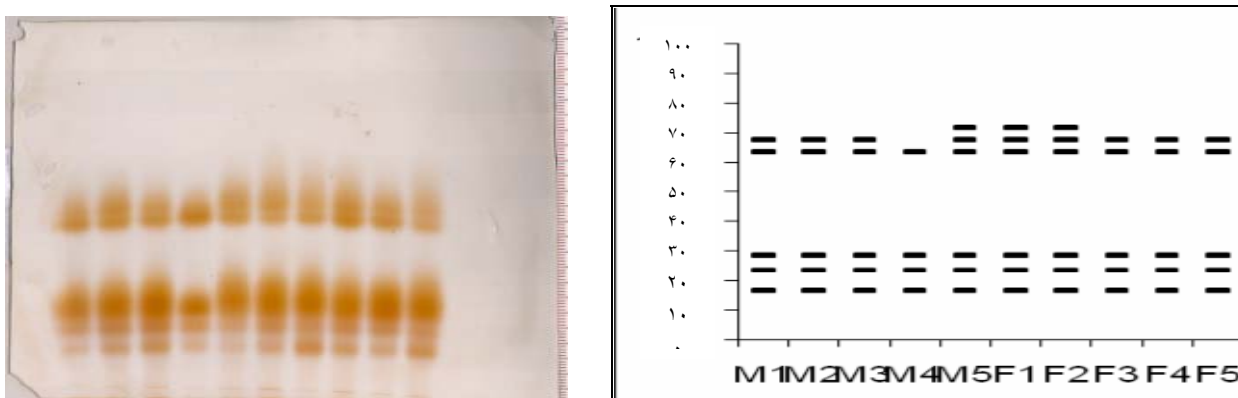
نام رویشگاه	میانگین
مرزن‌آباد چالوس	۰/۰۸۸ ± ۰/۰۱۸ ^a
پارک جنگلی گلستان	۰/۰۷۷ ± ۰/۰۳۸ ^a
استخرپشت نکا	۰/۰۴۶ ± ۰/۰۲۳ ^b

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 ۴۵ درصد). ناحیه دوم شامل ۶ باند با تحرک نسبی ۷، ۱۶، ۲۳، ۲۸، ۳۲ و ۳۵ درصد بود. باندهای شماره‌ی ۱۶، 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 ۶۶/۶۶ درصد در رویشگاه‌های نکا و گلستان دیده شد. ناحیه اول دارای ۹

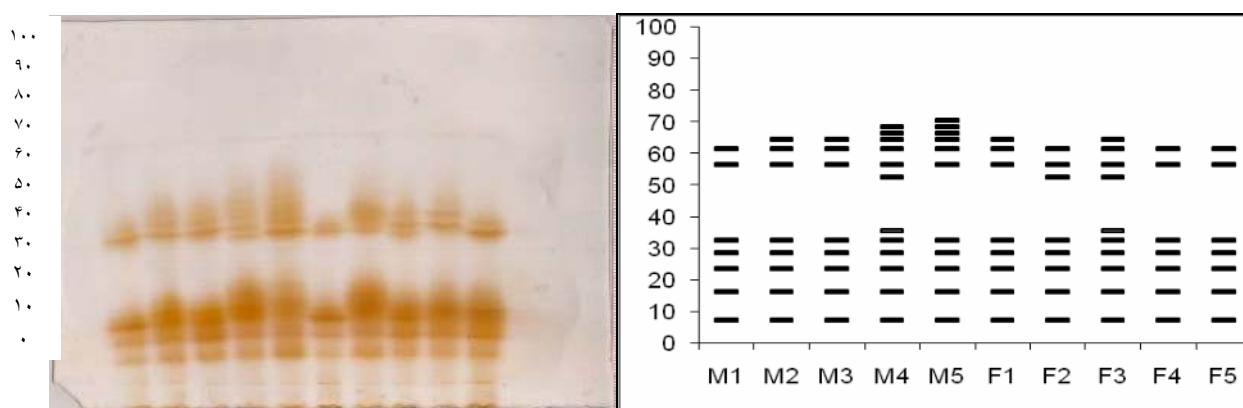
باند با تحرک نسبی ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۶۰، ۶۳، ۶۵، ۶۷، ۶۹ و ۷۱ درصد بود. از این میان باندهای با تحرک نسبی ۵۲، ۵۶، ۶۰، ۶۵ و ۶۹ درصد مختص رویشگاه گلستان و باند با تحرک نسبی ۷۱ درصد مختص رویشگاه مرزن‌آباد بود. باندهای با تحرک نسبی ۶۳ درصد و با فراوانی ۶۶/۸۶ و باند با تحرک نسبی ۶۷ درصد و فراوانی ۴۰ درصد در همه رویشگاه‌ها 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 تقریباً 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 ۴).



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



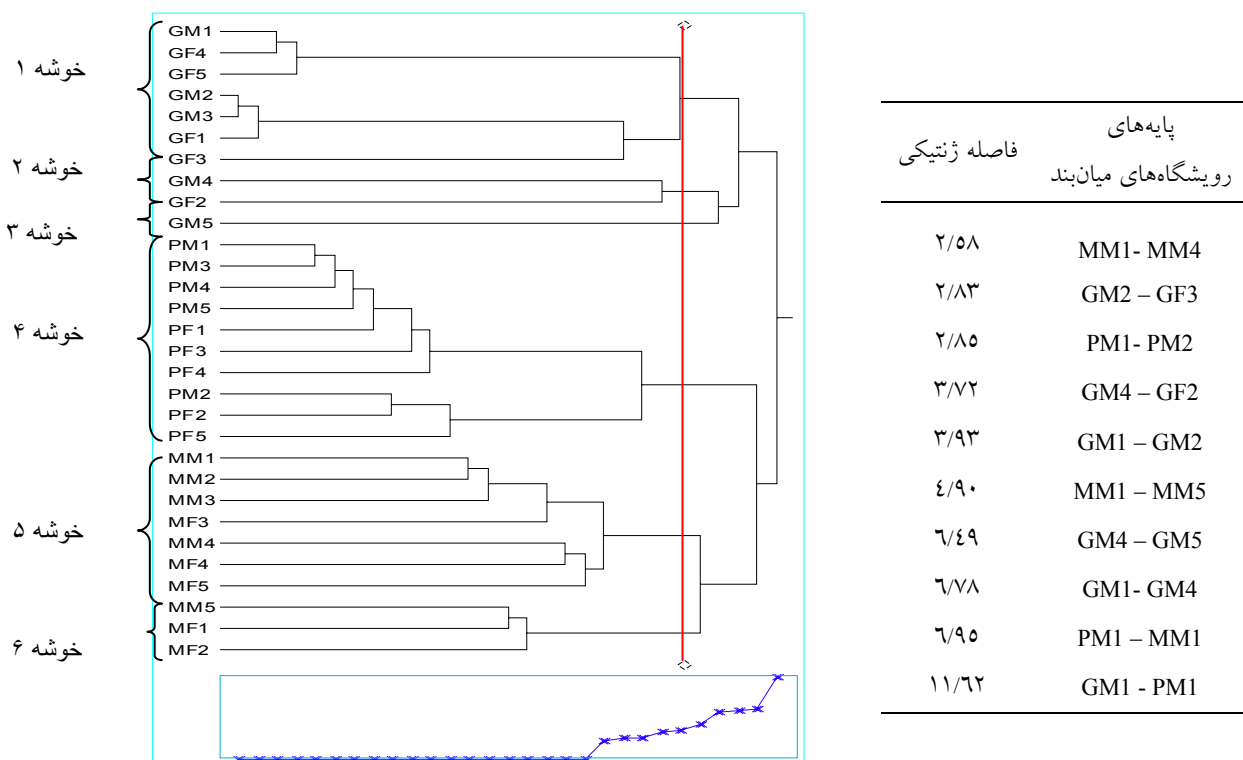
شکل ۳- زیموگرام باند الکتروفورزی و ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه گلستان

پایه‌ها در دو خوشه ۵ و ۶ قرار گرفتند و کلیه پایه‌های رویشگاه نکا در خوشه ۴ 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 ۴).

گروه بندی پایه‌های موجود در سه رویشگاه میان‌بند براساس فعالیت کیفی پراکسیداز با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش حداقل واریانس Ward's، ۶ خوشه را از یکدیگر متمایز نمود. پایه‌های رویشگاه گلستان با تفاوت در تعداد پایه‌ها در سه خوشه مجزا ۱، ۲ و ۳ قرار گرفتند. پایه‌های رویشگاه مرزن‌آباد نیز با تفاوت در تعداد

جدول ۴- نتایج گروه‌بندی پایه‌های داخل رویشگاه‌ها براساس فعالیت کیفی آنزیم پروکسیداز شاخه

خوشه بندی براساس فعالیت کیفی پراکسیداز		
رویشگاه	تعداد خوشه در فاصله ۵	تعداد خوشه در فاصله ۱۰
پارک جنگلی گلستان	۶	۳
مرزن‌آباد چالوس	۴	۳
استخر پشت نکا	۲	۲



شکل ۴- 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)

۵). در تشکیل مؤلفه اول صفات تعداد دندانان 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 ۶).

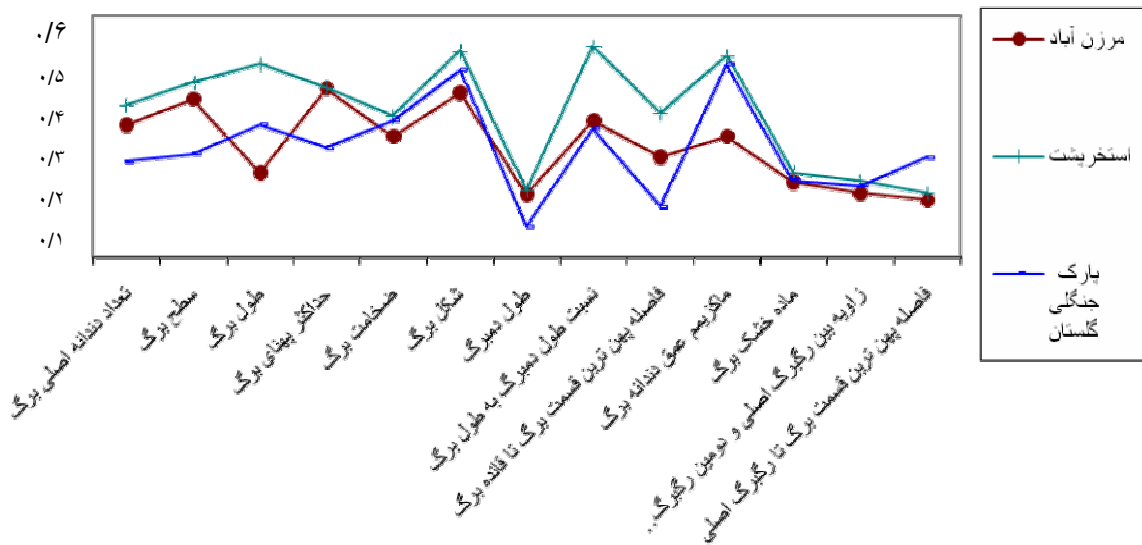
تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به منظور استفاده از متغیرهای ضروری که دارای بیشترین درصد واریانس هستند برای ۱۳ مشخصه مورفولوژیکی برگ از درختان سفیدپلت در مناطق مورد بررسی انجام شد. در صفات برگ مجموع ۸۵/۷۳۳ درصد واریانس به ۵ مؤلفه اول اختصاص پیدا کرد (جدول

جدول ۵- سهم صفات در ایجاد واریانس‌ها

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	سهم واریانس	واریانس تجمعی
۱	۵/۰۳۷	۳۸/۷۴۵	۳۸/۷۴۵
۲	۱/۸۳۲	۱۴/۰۸۹	۵۲/۸۳۴
۳	۱/۶۸	۱۲/۹۲۶	۶۵/۷۶۱
۴	۱/۴۳۸	۱۱/۰۶۵	۷۶/۸۲۵
۵	۱/۱۵۸	۸/۹۰۸	۸۵/۷۳۳

جدول ۶- تعیین صفات در تبیین مؤلفه‌ها

صفات	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم	مؤلفه چهارم	مؤلفه پنجم
تعداد دندانان اصلی برگ	۰/۸۱۸	۰/۰۹۴	-۰/۳۳	۰/۰۰۴	۰/۰۱۹
سطح برگ	۰/۹۱	۰/۱۴۵	۰/۰۱۷	-۰/۰۱	۰/۰۹۱
طول برگ	۰/۷۳۶	-۰/۱۳۹	۰/۲۲۸	۰/۴۹	-۰/۰۲۲
حداکثر پهنای برگ	۰/۳۵۹	۰/۱۶	۰/۷۷	-۰/۲۰۱	-۰/۱۲
ضخامت برگ	-۰/۰۹۵	۰/۹۱۸	-۰/۰۴۲	-۰/۱۲۹	۰/۰۶۷
شکل برگ	-۰/۲۶۶	-۰/۰۴۸	۰/۶۸۹	۰/۵۳۵	۰/۱۹۶
طول دمبرگ	۰/۸۷۶	-۰/۳۸۲	۰/۰۰۳	-۰/۰۳	۰/۰۷۶
نسبت طول دمبرگ به طول برگ	۰/۲۵۶	-۰/۳۲۴	-۰/۲۳۳	-۰/۸۲۳	۰/۱۱۱
فاصله پهن‌ترین قسمت برگ تا قاعده برگ	۰/۹۱۲	-۰/۰۰۷	۰/۰۹۴	۰/۲۳۹	۰/۱۴۸
حداکثر عمق دندانان برگ	۰/۳۵۴	۰/۷۲۴	۰/۳۰۶	-۰/۰۹۹	-۰/۳۲۲
ماده خشک برگ	۰/۸۴۴	۰/۲۵۱	-۰/۰۴۸	۰/۰۳۴	۰/۱۷
زاویه بین رگبرگ اصلی و دومین رگبرگ پایین	-۰/۵۲۹	۰/۲۲۶	۰/۵۰۹	۰/۲۷	۰/۳۰۵
فاصله پهن‌ترین برگ تا رگبرگ اصلی	-۰/۰۸۶	۰/۱۵	۰/۰۱۲	-۰/۱۸۸	۰/۹۰۹

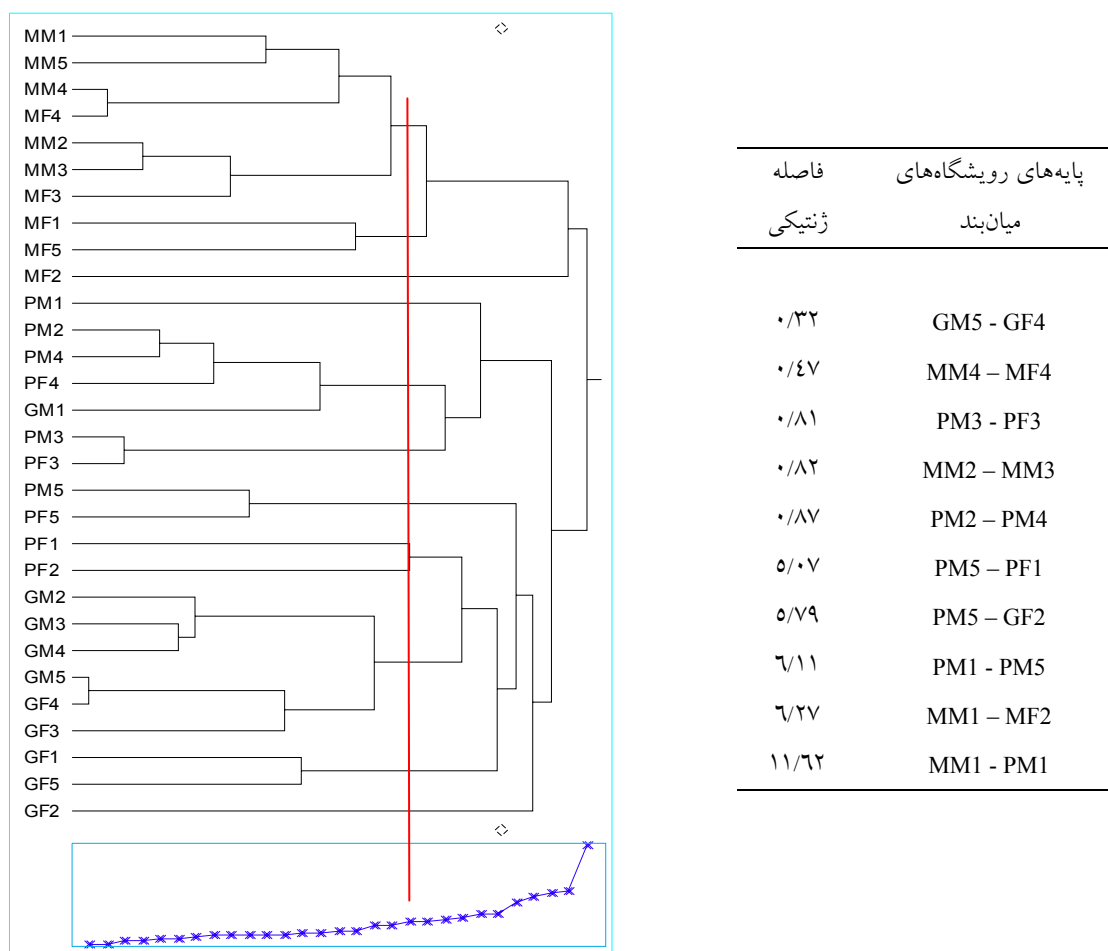


شکل ۵- پلاستیسیته صفات مورفولوژیک برگ درختان در مناطق مورد بررسی

کلیه‌ی پایه‌های رویشگاه مرزن در خوشه‌ی جداگانه ۱ قرار گرفتند. پایه‌های PM5 و PF5 بطور جداگانه در خوشه‌ی ۴ قرار گرفتند. پایه‌ی GF2 رویشگاه گلستان در خوشه‌ی ۶ قرار گرفت. سایر پایه‌های رویشگاه گلستان و نکا با تفاوت در تعداد پایه‌ها در دو خوشه جداگانه ۳ و ۵ قرار گرفتند (شکل ۶). بیشترین فاصله ژنتیکی بین پایه‌های یک رویشگاه مرزن آباد (MM1) و (PM1) نکا (11/62) و کمترین فاصله ژنتیکی بین پایه‌ی ۵ (GM5) و ۴ ماده‌ی (GF4) گلستان (۰/۳۲) دیده شد.

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

در رویشگاه‌های میان بند مرزن آباد، استخر پشت نکا و گلستان مجموعاً ۶ خوشه‌ی جداگانه مشخص شد. جز پایه‌ی MF2 مرزن آباد که در خوشه ۲ قرار گرفت



شکل ۶- دندروگرام و جدول فاصله ژنتیکی حاصل از تجزیه خوشه‌ای در میان‌بند براساس صفات مورفولوژی برگ

بحث

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 صرفاً 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 (Machon et al., 1997) (Salehi shanjani & Vendramin, 2007; Bogdanovic et al., 2006;

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* (Calagari et al., 2007) و *Zizyphus jujuba* Mill (Khakdaman et al., 2007) نشان داده است که مشخصه‌های مورفولوژیکی برگ‌ها در تعیین تمایز میان درختان در رویشگاه‌های مختلف نقش

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 نسبی ۶۳ و ۶۷ درصد با تفاوت در تعداد پایه‌ها در همه رویشگاه‌ها مشاهده شد. حضور این باندهای عمومی احتمالاً دلیلی بر منشا تکاملی یا اجداد عمومی پایه‌های انتخاب شده می‌باشند و یا اینکه این ایزوآنزیم‌ها 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 نسبی ۷، 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 رویشگاه‌های 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 بانندی 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 کلاسه‌های ژنتیکی جداگانه قرار داد. همچنین قرار گرفتن پایه‌ها درون هریک از این رویشگاه‌ها در خوشه‌های 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

Manjuntha et al., 2003; همچنین پژوهش‌های فراوانی با اشاره به رابطه بین گوناگونی فراوانی آلی برخی آنزیم‌ها و شرایط محیطی، به نقش احتمالی سازگاری آن آل‌ها تأکید می‌کند (Gomory et al., 1992; Comps et al., 1990, 1991) در تعیین کاراترین صفات جهت بررسی تنوع مورفولوژیکی صفات دارای کمترین پلاستیسیته (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 دندان 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 پایه‌ها براساس صفات مورفولوژیکی برگ و فعالیت کیفی پراکسیداز براساس حضور و عدم حضور باندها، تمایز ژنتیکی بالا و کلاسه‌های ژنتیکی متعددی را نشان داد؛ با توجه به قرار گرفتن کلیه پایه‌های 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 بانندی پراکسیداز تعداد

(Hosseini, 1998) و به همراه گونه‌هایی نظیر انجیلی (*Gleditschia caspica*) و لیلکی (*Parrotia persica*) بجا مانده از دوران سوم زمین‌شناسی می‌باشد (Marvi Mohajer, 2005) و تاریخ تکاملی زیادی برای این گونه برآورد می‌شود. بطور کلی درختان جنس صنوبر بدلیل دوپایه بودن و افزایش تلاقی درون و بین گونه‌ای از یک طرف و قابلیت درختان صنوبر در پراکنده نمودن وسیع بذرها و گرده اختلاف ژنتیکی و جریان ژنی بالایی دارند (Calagari et al., 2007) و در تمایز ژنتیکی گونه سفیدپلت در جوامع طبیعی مهاجرت از طریق گرده و بذر (خصوصاً گرده) می‌تواند نقش مهمی را ایفا کند. از نتایج 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 بازسازی کلیه‌ی جمعیت‌های این گونه آندمیک و کم نظیر جنگل‌های باستانی هیرکانی را که ذخیره‌گاه ژنتیکی نادر بسیاری از گونه‌ها در مقیاس جهانیست را گوشزد می‌کند. در نهایت، ذکر این نکته لازم است که برای بررسی بیشتر و دقیقتر تفاوت‌های ژنتیکی، استفاده از سایر نشانگرها، به‌ویژه نشانگرهای مولکولی نظیر RAPD، RFLP، AFLP و EST به‌منظور نقشه‌برداری کامل از ژنوم سفیدپلت ضروری به نظر 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 occidentale* L.) using protein-isoenzyme- electrophoretic analysis, Genetic Resource Crop Evolution, 10:722-73.

را نشان داد. به لحاظ تنوع درون جمعیتی رویشگاه گلستان بیشترین و رویشگاه نکا کمترین تنوع درون جمعیتی را نشان داد. رویشگاه پارک گلستان چه از لحاظ غنای خاکی (خاک قهوه‌ای آهکی و آبرفتی) (Jalilvand, 1988) و چه از لحاظ اقلیمی که در مرز بین چندین نوع آب و هوا (Akhami, 2004) و حفاظتی است شرایط را برای یک تنوع زیستی بالا فراهم کرده است. حضور تنوع گونه‌های با سرشت متفاوت در این پارک مؤید این امر است. در این خصوص Babaie و همکاران (2010) تنوع ژنتیکی بیشتری را برای رویشگاه درخت آزاد گلستان نسبت به رویشگاه‌های نور مازندران و گمل‌گیلان با مطالعه ایزوآنزیمی پراکسیداز برگ نشان دادند. یافته‌های این تحقیق از میان پایه‌های نر و ماده به لحاظ الگوی باندی و خوشه‌ای پراکسیداز درون جامعه اختلافی نشان نداد و دلیل آن می‌تواند ناشی از عدم وابستگی این صفت به نوع جنسیت باشد (Calagari et al., 2007). عدم اختلاف حضور باندهای ایزوآنزیمی در پایه‌های درخت نر و ماده پده (Calagari et al., 2007) و (Rottenberg et al., 2000) نیز گزارش شده است. گونه سفیدپلت به صورت قطعات جدا در مناطقی با تنوع جغرافیایی و اقلیمی گسترده وجود دارد. تنوع جغرافیایی و اقلیمی عوامل بسیار موثر بر ایجاد تنوع ژنتیکی اند (Dunlap et al., 1995). همچنین تاریخ تکاملی گونه‌ها نقش بسیار موثری در ایجاد تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها دارد و یک گونه می‌تواند در اثر تکامل چند هزار ساله تفاوت‌های ژنتیکی در راستای سازگاری محیطی با محیط‌های متنوع پیدا کند که نقش مهمی در پایداری آن جمعیت‌ها دارد. گونه سفیدپلت از جنس صنوبر، گونه مختص جنگل‌های هیرکانی و معروف به فسیل زنده است

- 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 Forest and Rangeland 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,

- 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. Assessment 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., Slyphen, 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 Systematics 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 Doktorgrades 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 differentiation, 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.

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

H. Fallah¹, M. Tabari^{*2}, D. Azadfar³ and F. Babaie⁴

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.