دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۳۸-۲۲۷ (۱۳۸۹)

بررسی و مقایسه تنوع ژنتیکی سرخدار (*Taxuss baccata* L.) با استفاده از پراکسیداز شاخه و برگ

لیلا کریمی[1]* و داوود آزادفر[2]

۱*- مربی، دانشکده جنگلداری و فناوری چوب، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
پست الکترونیک: LL.Karimi@Gmail.com
۲- استادیار، دانشکده جنگل‌داری و فناوری چوب، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۹/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۰۹/۲۱

چکیده

گونه سرخدار (*Taxus baccata* L.) از معدود سوزنی‌برگان بومی ایران و باقی‌مانده از بقایای رویش‌های دوران سوم زمین‌شناسی است. این گونه به علت بهره‌برداری‌های مفرط و همچنین کند رشد بودن، امروزه با خطر انقراض مواجه است و پایه‌های باقی‌مانده آن دارای ارزش ژنتیکی بالایی هستند. وجود تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های یک گونه بهترین راه‌کارها را جهت حفظ تنوع جمعیت‌ها و یافتن پایه‌های مادری برتر برای ذخایر بذری ارائه می‌کند. این تحقیق با هدف بررسی و مقایسه تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم درون‌گونه‌ای سرخدار براساس آنزیم پراکسیداز دو اندام شاخه و برگ، معرفی بهترین اندام جهت مطالعه تنوع ژنتیکی و شناسایی پایه‌های شاخص درختان سرخدار منطقه افراتخته زرین‌گل علی‌آباد استان گلستان با استفاده از آنزیم پراکسیداز انجام شد. جهت این بررسی نمونه‌برداری هم‌زمان از رویش‌های دو ساله شاخه و برگ ٤٢ پایه در قالب سه جمعیت انجام گردید. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، از آنها عصاره تهیه شد. اندازه‌گیری فعالیت کمی پراکسیداز با اسپکتروفتومتر و مطالعه کیفی با الکتروفورز به روش PAGE (پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز) انجام گرفت. نتایج نشان داد که درختان سرخدار منطقه افراتخته تنوع ژنتیکی نسبتاً خوبی دارند. از نظر فعالیت کمی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵ درصد بین شاخه و برگ مشاهده شد، به‌طوری که این میزان در شاخه (۰/۰٦٦) بیشتر از برگ (۰/۰۲۰) بود. همچنین تعداد باندهای ایزوآنزیمی شاخه (۱۲ باند) بیشتر از باندهای ایزوآنزیمی برگ (٦ باند) بود. نتایج آنالیز خوشه‌ای نیز گروه‌بندی بیشتری را در شاخه (۱۲ گروه) نسبت به برگ (۸ گروه) نشان داد. بنابراین اندام شاخه در مقایسه با اندام برگ از توانایی تفکیک و گروه‌بندی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی درختان سرخدار برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، سرخدار، پراکسیداز، شاخه، برگ، افراتخته.

مقدمه

گونه سرخدار (*Taxus baccata* L.) متعلق به خانواده Taxaceae، از دسته بازدانگان همیشه‌سبز بدون رزین است که به‌طور وسیع در نواحی معتدله نیمکره شمالی پراکنده شده است (Price, 1990). این گونه بومی اروپا، قفقاز، شمال افریقا و جنگل‌های شمال ایران است (زارع، ۱۳۸۰). در ایران در ارتفاعات ۱۸۰۰-۹۰۰ متری از سطح دریا در جنگل‌های شمال، از آستارا تا علی‌آباد گسترش دارد و تنها در ناحیه زرین‌گل به حالت جنگلی یعنی متشکل از چندین توده تقریباً خالص، یافت می‌شود. سرخدار در اغلب خاک‌ها رشد

می‌کند ولی در خاک‌های رسوبی بهتر رشد می‌نماید، در خاک‌های ضعیف و خشک رشد خوبی ندارد. مقاومت آن به آلودگی هوا زیاد است (داراب‌یزدانی و همکاران، ۱۳۸٤). گونه‌یست سایه‌پسند که اغلب در ارتفاعات و مناطق کوهستانی، در عمق دره‌های تاریک، در شیب‌های تند و دامنه‌های سنگلاخی و در اقلیم نیمه‌مرطوب تا مرطوب و سرد ظاهر می‌شود. معمولاً در رویشگاه‌هایی که اکثراً پوشیده از مه و رطوبت جو بالاست، رشد می‌کند (رستمی شاهراجی و یوسف‌پور رشتی، ۱۳۸۱). دیرزیستی آنها بسیار زیاد بوده و تا ۲۰۰۰ سال می‌رسد، پایه‌های باقیمانده آن ارزش ژنتیکی زیادی داشته و به علت بهره‌برداری مفرط چوب و نیز کند رشد بودن در فهرست گونه‌های در معرض خطر انقراض قرار گرفته‌اند. همچنین از گیاهان مهم دارویی محسوب می‌شود (زارع، ۱۳۸۰). ماده تاکسول (Taxol) که اغلب از پوست این درخت استخراج می‌شود، یک ترکیب دارای فعالیت بی‌نظیر ضد سرطانی است و در درمان انواع سرطان‌های سینه و تخمدان بسیار مؤثر است (وردیان‌ریزی، ۱۳۸۷). تنوع در جنگل‌ها و گوناگونی ژنتیکی در درختان و درختچه‌ها برای سازگاری مستمر گونه‌ها به شرایط محیطی و نیز برای حفظ توان اصلاح ویژگی‌های مورد نظر انسان ضروری می‌باشد (صالحی شانجانی و ثاقب‌طالبی، ۱۳۸۳).

تعیین کمیت و ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جمعیت و بین جمعیت‌های یک گونه این امکان را فراهم می‌کند تا بهترین روش‌های حفظ و نگهداری تنوع جمعیت‌ها را شناخت (حافظی شاهرودیان، ۱۳۸۸). گروه‌های مختلفی از نشانگرها شامل صفات ظاهری، پروتئین‌های ذخیره‌ای، آیزوزایم‌ها، انواع نشانگرهای DNA و اخیرا نیز خصوصیات سیتوژنتیک برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند که هر یک دارای مزایا و معایب خاصی هستند. آیزوزایم‌ها یا ایزوآنزیم‌ها یکی از نشانگرهای مفید مولکولی- بیوشیمیایی هستند که به دلیل مزایای بسیار و ازجمله همبارز بودن، سادگی، دقت کافی، سرعت بالا و هزینه نسبتا کم به‌طور بسیار گسترده برای بررسی تنوع ژنتیکی، طبقه‌بندی و تعیین روابط فیلوژنتیک در گیاهان بکار رفته‌اند. آیزوزایم‌ها، انواع مختلف مولکولی یک آنزیم هستند که توسط مکان‌های ژنی مختلف رمزگذاری می‌شوند، ولی فعالیت بیوشیمیایی مشابهی دارند. امروزه انواع مختلف نشانگرهای دقیق DNA با داشتن چندشکلی فراوان، مستقل بودن از شرایط و مرحله رشد و فراوان بودن تعداد، معرفی شده‌اند. اما آیزوزایم‌ها به‌عنوان فرآورده‌های مستقیم ژن و با داشتن سودمندی‌های فراوان هنوز هم ارزش‌های کاربردی خود را در مطالعات ژنتیک و به‌نژادی حفظ نموده‌اند (میردریکوند و همکاران، ۱۳۸۳). در دهه ۱۹۵۰، نشانگرهای مولکولی قابل مشاهده توسط الکتروفورز پروتئین‌ها تحول شگرفی را ایجاد نمودند. آیزوزایم‌ها به‌طور گسترده در بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی گیاهان زراعی بکار گرفته شدند. همچنین الکتروفورز آنزیم‌ها برای توصیف ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفت (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦). در ضمن Guzina (۱۹۷٤)، از پلی‌مورفیسم پراکسیداز و استراز جهت تفکیک ژنوتیپ‌های *Populus deltoides* استفاده کرد. در کره Chung و همکاران (۱۹۹۹)، ساختار و تنوع ژنتیکی ٦ جمعیت کره‌ای از *Taxus cuspidata* را با استفاده از آلوزایم‌ها بررسی کردند و سطوح متوسطی از تنوع آلوزایمی را در آنها مشاهده کردند. میانگین پلی‌مورفیسم لوکوسی ٤٥ درصد و میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۱۹۲ بدست آمد که این سطوح در گونه‌هایی با ویژگی‌های

اکولوژیکی و دوره زندگی مشابه مورد مقایسه قرار گرفتند. علاوه بر این،، جمعیت‌های کره‌ای بندرت سطوح بالاتری از تنوع ژنتیکی را نسبت به جمعیت‌های *T. brevifolia* که در غرب ایالات متحده و کانادا پراکنده می‌باشند، دارا هستند. جعفری مفیدآبادی و جورابچی (۱۳۸۰) در مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهان باززایی شده از کشت کالوس در پده، از الکتروفورز آنزیم پراکسیداز و روش ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که بین گیاهان باززایی شده با والد مادری تفاوت‌های ژنتیکی وجود دارد. آزادفر (۱۳۷۷) در بررسی تنوع ژنتیکی درختان گیلاس وحشی با استفاده از نشانگر پراکسیداز به این نتیجه رسید که اندام شاخه با ۱۷ باند دارای پلی‌مورفیسم بالاتری نسبت به جوانه با ۱۳ باند است. ایرانمنش و همکاران (۱۳۸۸)، در بررسی و مقایسه فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز در اندام‌های مختلف گونه بارانک به این نتیجه رسیدند که از نظر فعالیت کمی اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد بین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاخه و برگ وجود دارد. همچنین تعداد باندهای ایزوآنزیمی شاخه بیشتر از برگ بود. کلاگری (۱۳۸٦) با بررسی ایزوآنزیمی آنزیم پراکسیداز، تغییرات ژنتیکی جوامع پده را به روش ژل پلی‌اکریل‌آمید بررسی نمود. نتایج حاصل از فعالیت کیفی آنزیم پراکسیداز در ۱۱۰ درخت از ۱۱ رویشگاه و ظهور باندها، الگوهای ایزوآنزیمی متفاوتی را نشان داد. همچنین براساس آنالیز خوشه‌ای، جوامع مورد مطالعه به سه دسته تقسیم شدند.

از آن جایی‌که تاکنون مطالعه قابل توجهی بر روی تنوع ژنتیکی درختان سرخدار ایران با استفاده از روش‌های ایزوآنزیمی انجام نشده است، این تحقیق با هدف بررسی و مقایسه تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم درون‌گونه‌ای سرخدار براساس آنزیم پراکسیداز دو اندام شاخه و برگ، معرفی بهترین اندام جهت مطالعه تنوع ژنتیکی درختان سرخدار و شناسایی پایه‌های شاخص جهت استفاده در تلاقی‌ها و قلمه‌گیری برای حفظ و بالا بردن تنوع در منطقه افراتخته جنگل‌های زرین‌گل علی‌آباد استان گلستان انجام گردید.

مواد و روشها

رویشگاه جنگلی افراتخته در حدود ٦۰ کیلومتری جنوب شرقی گرگان و در اطراف روستای ییلاقی افراتخته علی‌آباد کتول در استان گلستان بین طول جغرافیایی ٥٤' ٥٤° و ۰۷' ٥٥° شرقی و عرض جغرافیایی ٤٦' ٣٦° و ٥۰' ٣٦° شمالی و در ارتفاع ۱۲۰۰ تا ۱۷٥۰ متر بالاتر از سطح دریا واقع شده است. شیب عمومی منطقه ٤۰ تا ٤٥ درصد و جهت آن عمدتاً شمال شرقی است.

پس از بررسی رویشگاه و ارزیابی عرصه مورد تحقیق، ابتدا منطقه براساس وسعت به ۳ ناحیه مختلف تقسیم شد و در هر یک از آنها یک جمعیت به‌طوری که معرف آن ناحیه باشد شناسایی و درختانی که در فواصل ۱۰ تا ۱٥ متری از یکدیگر قرار داشتند برای نمونه‌برداری انتخاب و شماره‌گذاری شدند. بر این اساس در این رویشگاه سه جمعیت با نام‌های افراتخته ۱، ۲ و ۳ (A1, A2, A3) به‌ترتیب با ۱۰، ۲۰ و ۱۲ پایه انتخاب شدند. سپس از رویش‌های دو ساله اندام‌های شاخه و برگ نمونه‌برداری شد. برای عصاره‌گیری یک گرم از برگ و شاخه سرخدار بطور جداگانه در داخل هاون چینی کاملاً خرد شده و ۳ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری به آن اضافه شد. عصاره‌ها به مدت ٤۸ ساعت در یخچال با دمای ۳ درجه سانتی‌گراد

نگهداری و سپس در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور (در دقیقه) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و از قسمت شفاف رویی برای مطالعات کمی و کیفی آنزیم‌ها استفاده گردید (کروری، ۱۳۷۸). مطالعات کمی آنزیم پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۳۰ نانومتر طبق روش Worthington (Worthington, 1892) و مطالعات کیفی با استفاده از الکتروفورز عمودی به روش PAGE (پلی اکریل‌آمید ژل الکتروفورز (۱۲٪ با اسیدیته ۷) صورت گرفت (آزادفر، ۱۳۷۷). از هر نمونه ٤٠ میکرولیتر از عصاره تهیه شده داخل چاهک‌ها تزریق شد. دستگاه با شدت جریان ۵۰ میلی آمپر تنظیم شد. زمان جداسازی ایزوآنزیم‌ها حدود ۱۰ ساعت و میزان حرکت عصاره در ژل نیز ۱۰ سانتیمتر بود. بعد از رنگ آمیزی ژل‌ها، از آنها عکس گرفته شد و تمامی باندهای ظاهر شده در نرم‌افزار Excel کشیده شدند.

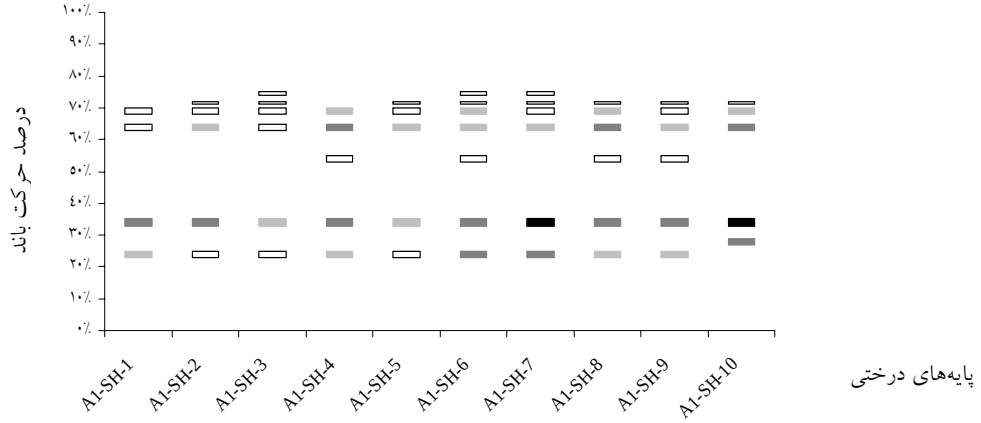
بررسی فعالیت کیفی آنزیم با استفاده از الگوهای ایزوآنزیمی انجام شد. گروه‌بندی باندهای ایزوآنزیمی با استفاده از آنالیز خوشه‌ای و به روش مربع فاصله اقلیدسی براساس فاصله شروع هر باند نسبت به مبدأ، ضخامت و شدت رنگ به همراه فعالیت کمی آنزیم در نرم‌افزار SPSS انجام شد. همچنین مقایسه میانگین فعالیت کمی آنزیم در دو اندام شاخه و برگ در این نرم‌افزار انجام شد.

نتایج

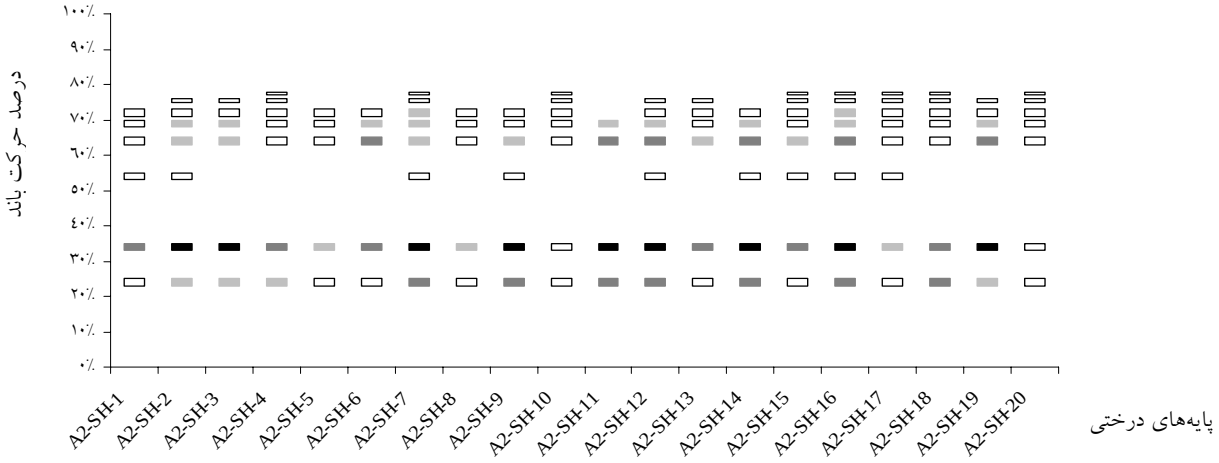
مقایسه الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز دو اندام شاخه و برگ در ۳ جمعیت مورد مطالعه تنوع نسبتاً خوبی را نشان داد. تعداد باندهای ایزوآنزیمی در نمونه‌های شاخه ۱۰ باند بود، در حالی که این تعداد در نمونه‌های برگ ٦ باند بود. باندها در تمامی الگوهای ایزوآنزیمی در ۳ ناحیه حرکتی سبک، متوسط و سنگین قرار گرفتند. در شاخه بیشتر باندها در ناحیه حرکتی سبک (آندی) و در برگ بیشتر باندها در ناحیه کاتدی واقع شدند (شکل‌های ۱و ۲). همچنین، بررسی الگوها جهت تعیین باندهای عامل تنوع نشان داد که شاخه با ۱۰ باند نسبت به برگ با ٦ باند دارای تعداد باندهای بیشتری جهت ایجاد تنوع در پایه‌ها هستند. علاوه بر این، با توجه به الگوهای ایزوآنزیمی، هر پایه از نظر فعالیت کیفی شاخه و برگ دارای الگوی باندی مختص به خود است. همچنین باندهای مشترک و مستقلی در بین پایه‌ها مشاهده شد که بر این اساس تعداد ۷ پایه از نظر نمونه‌های شاخه و برگ به‌عنوان پایه‌های دارای الگوی باندی شاخص شناسایی شدند، یعنی الگوی مشابه آنها در پایه‌های جمعیت‌ها مشاهده نشد (جدول۱). از این میان ٤ پایه A1-4, A1-6, A1-10 و A3-4 به‌عنوان پایه شاخص از نظر هر دو اندام شاخه و برگ شناسایی شدند. به‌طوری که برای حفظ و بالا بردن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، می‌توان از این پایه‌ها برای قلمه‌گیری (تکثیر غیرجنسی) و یا استفاده در تلاقی‌ها (تکثیر جنسی) بهره برد.

جدول۱- پایه‌های درختی دارای الگوی باندی شاخص در دو اندام شاخه و برگ

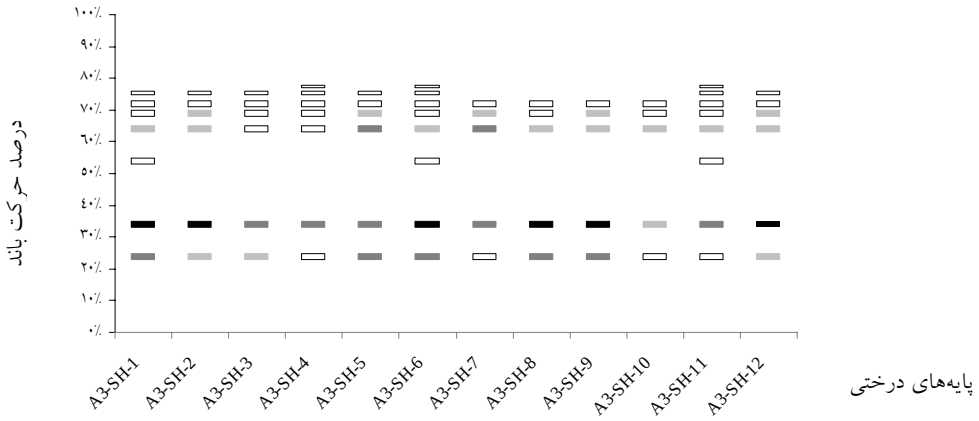
اندام	پایه‌های درختی
شاخه	A1-1, A1-4, A1-6, A1-10, A2-11, A3-1, A3-4
برگ	A1-4, A1-6, A1-10, A2-6, A3-3, A3-4, A3-11



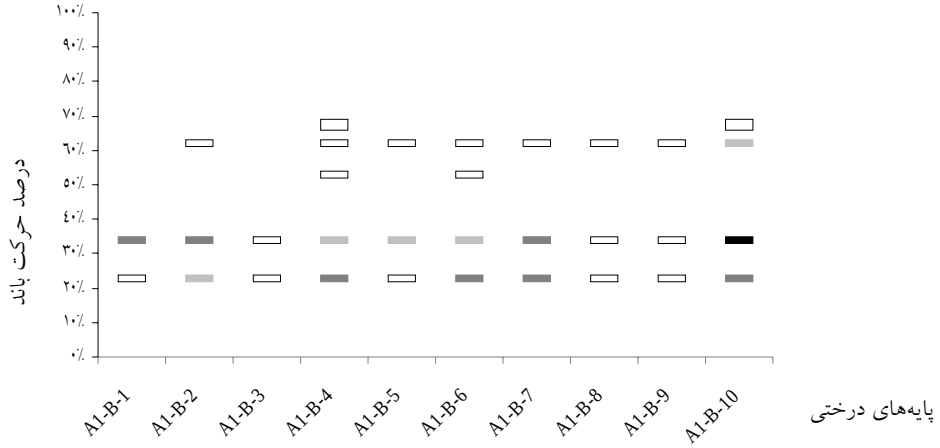
شکل۱- الف- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز شاخه در پایه‌های جمعیت ۱ منطقه افراتخته



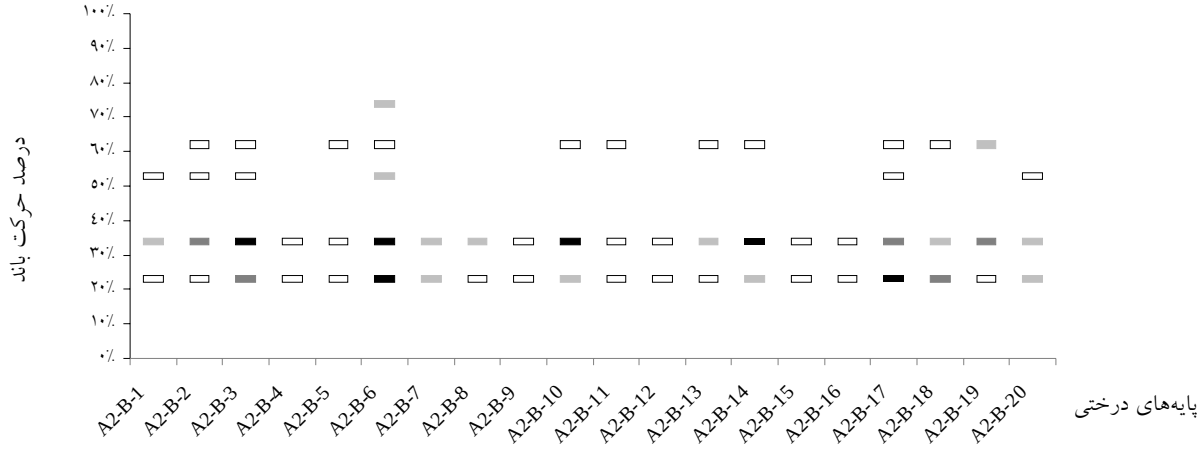
شکل۱- ب- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز شاخه در پایه‌های جمعیت ۲ منطقه افراتخته



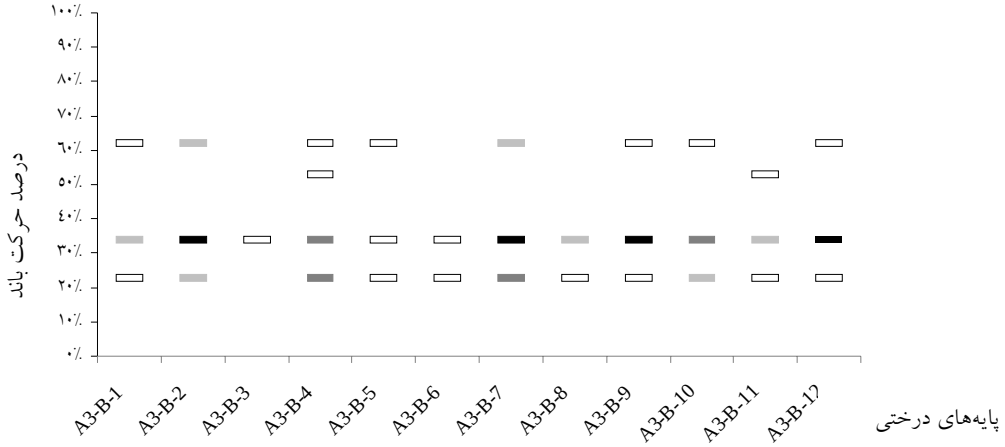
شکل۱- ج- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز شاخه در پایه‌های جمعیت ۳ منطقه افراتخته



شکل۲- الف- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز برگ در پایه‌های جمعیت ۱ منطقه افراتخته



شکل۲- ب- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز برگ در پایه‌های جمعیت ۲ منطقه افراتخته



شکل۲- ج- الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز برگ در پایه‌های جمعیت ۳ منطقه افراتخته

جدول۲- مقایسه میانگین فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز شاخه و برگ با آزمون t-test

	F	معنی‌داری	t	درجه آزادی	اشتباه معیار	معنی‌داری
فعالیت آنزیمی شاخه و برگ	٦/٤٥١	۰/۰۱۳	۹/۱۹۷	۸۲	۰/۰۰۵۰۵	۰/۰۰۰*

*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد

روند تغییرات کمی آنزیم پراکسیداز در نمونه‌های برگ مشابه نمونه‌های شاخه به دست آمد ولی میانگین فعالیت آنزیمی در شاخه ۰/۰٦٦ و در برگ ۰/۰۲۰ بود. مقایسه میانگین فعالیت کمی آنزیم با استفاده از آزمون t نشان داد که در سطح ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های شاخه و برگ وجود دارد (جدول۲).

گروه‌بندی درختان سرخدار، در سه جمعیت رویشگاه مورد مطالعه براساس آنالیز خوشه‌ای در اندام شاخه و برگ به صورت دندروگرام مشخص شد و درختان پس از تعیین خط برش براساس شباهت‌های ژنتیکی به خوشه‌ها تقسیم شدند. در این میان درختان در گروه‌های مستقل و مشترکی قرار گرفتند (شکل۳). بر این اساس شاخه با ۱۲ خوشه دارای گروه‌بندی بالاتری نسبت به برگ با ۸ خوشه بود. از آنجا که تعداد پایه‌های جمعیت‌های مورد مطالعه با هم مساوی نبودند از نسبت تعداد دسته‌های مستقل و مشترک به تعداد کل افراد در جمعیت‌ها جهت مقایسه استفاده گردید و این نسبت‌ها با عنوان نسبت تنوع کلاسه‌های مستقل و مشترک در جدول‌های آورده شد. همانطور که در جدول‌های شماره ۳ و ٤ نشان داده شده است تنوع ژنتیکی به دست آمده در کل رویشگاه و در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه در اندام شاخه بیشتر از اندام برگ بود.

جدول۳- میزان تنوع ژنتیکی براساس پراکسیداز اندام شاخه در جمعیت‌های منطقه افراتخته

جمعیت	تعداد پایه	تعداد دسته مستقل	تعداد دسته مشترک	نسبت تنوع کلاسه‌های مستقل	نسبت تنوع کلاسه‌های مشترک	نسبت تنوع کلاسه‌های کل
افراتخته ۱	۱۰	٤	۳	۰/٤	۰/۳	۰/۷
افراتخته ۲	۲۰	۰	۸	۰	۰/٤	۰/٤
افراتخته ۳	۱۲	۰	٦	۰	۰/۵	۰/۵
منطقه	٤۲	٤	۸	۰/۰۹۵	۰/۱۹	۰/۲۸

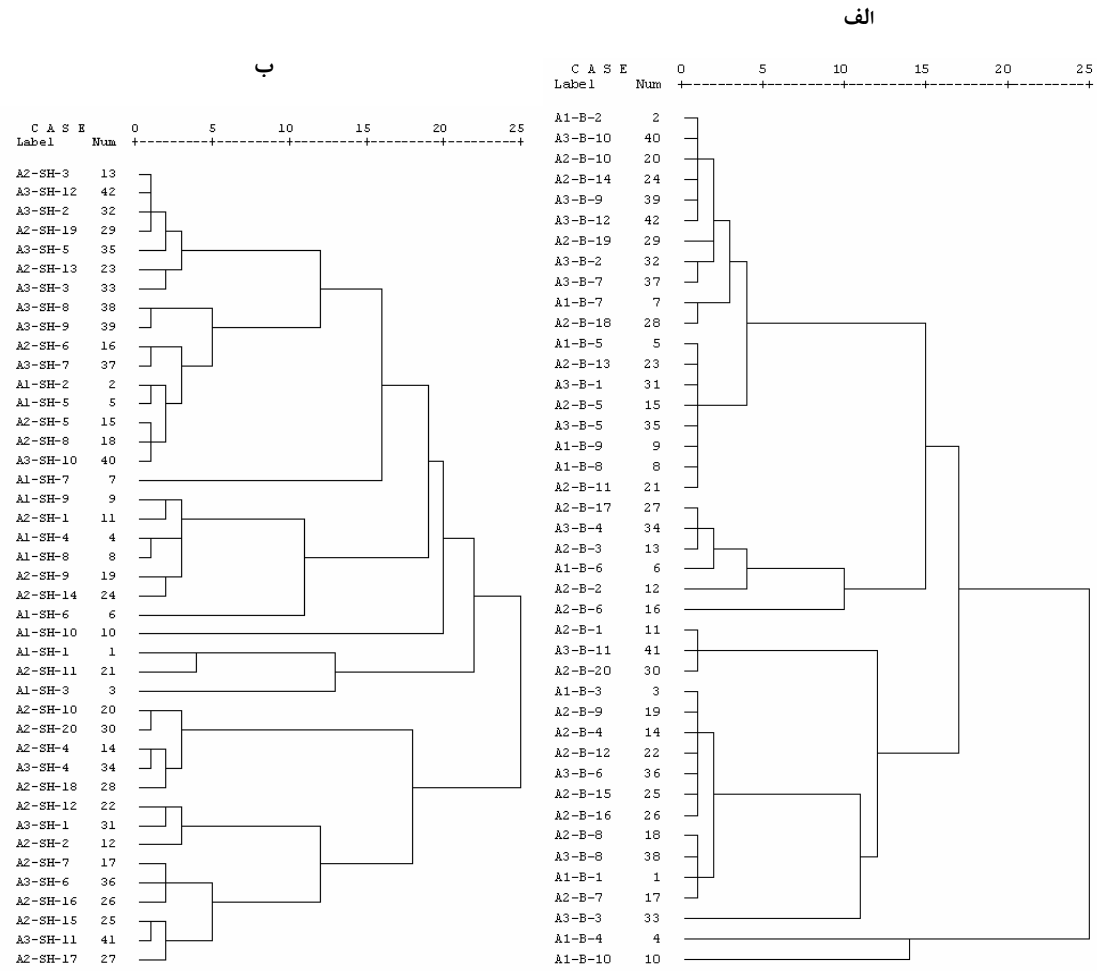
جدول٤- میزان تنوع ژنتیکی براساس پراکسیداز اندام برگ در جمعیت‌های منطقه افراتخته

جمعیت	تعداد پایه	تعداد دسته مستقل	تعداد دسته مشترک	نسبت تنوع کلاسه‌های مستقل	نسبت تنوع کلاسه‌های مشترک	نسبت تنوع کلاسه‌های کل
افراتخته ۱	۱۰	۲	۳	۰/۲	۰/۳	۰/۵
افراتخته ۲	۲۰	۱	٤	۰/۰۵	۰/۲	۰/۲۵
افراتخته ۳	۱۲	۱	٤	۰/۰۸۳	۰/۳۳	۰/٤۱
منطقه	٤۲	٤	٤	۰/۰۹۵	۰/۰۹۵	۰/۱۹

بحث

تنوع ژنتیکی، پایه و اساس تنوع زیستی است و به‌طور نزدیکی با توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌هایی که زیرگونه‌ها، نژادها و اکوتیپ‌ها را تشکیل می‌دهند مرتبط است (Sreekumer & Renuka, 2006). یکی از نشانگرهای مهم که در بررسی‌های تنوع ژنتیکی کاربرد وسیعی دارد، نشانگر پراکسیداز است که به دلیل فراوانی باندهای ایزوآنزیمی یکی از مناسبترین نشانگرها برای تفکیک ژنتیکی درختان است (Gril *et al.*, 1981؛ Gril, 1982). نتایج مطالعات کمی و کیفی سه جمعیت مورد مطالعه منطقه افراتخته براساس دو اندام شاخه و برگ در این تحقیق با استفاده از نشانگر پراکسیداز، تفاوت‌هایی را از نظر ژنتیکی بین پایه‌های جمعیت‌های مختلف نشان داد.

نتایج مطالعات و بررسی‌های الگوهای ایزوآنزیمی و دندروگرام‌های رسم شده براساس پراکسیداز شاخه و برگ در رویشگاه افراتخته حاکی از وجود تفاوت‌های ژنتیکی بین درختان بود. در بررسی و مقایسه تنوع موجود در دو اندام شاخه و برگ، نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی به دست آمده در کل رویشگاه و در هر یک از جمعیت‌ها در شاخه بیشتر از برگ بود. همچنین اندام شاخه با ایجاد ۱۰ باند ایزوآنزیمی نسبت به برگ با ٦ باند دارای پلی‌مورفیسم بالاتری بود. بنابراین تفکیک و گروه‌بندی انجام شده براساس این اندام نیز بهتر انجام می‌گیرد. علاوه بر این،، نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اندام شاخه با ۱۲ گروه نسبت به اندام برگ با ۸ گروه از قدرت تفکیک بالاتری برخوردار است.



شکل۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای فعالیت کمی و کیفی پراکسیداز (الف- شاخه، ب- برگ) در منطقه افراتخته

همان‌طور که می‌دانیم قسمت‌های مختلف گیاه دارای الگوهای پروتئینی ثابت نیستند، بلکه هر قسمت گیاه دارای الگوهای پروتئینی خاص خود است که این الگو می‌تواند معرف سیستم فیزیولوژیک آن قسمت از گیاه باشد. معمولاً نمونه شاخه در درختان معرف قسمت پایدار گیاهی، نمونه برگ معرف قسمت ناپایدار و تولید کننده غذا (فتوسنتز) است (کروری، ۱۳۷۸) که این نکته تأکیدی بر این امر است که اندام شاخه با توجه به پایداری بیشتر اندام مناسب‌تری جهت مطالعات آنزیمی می‌باشد.

ایرانمنش و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز در اندام‌های مختلف گونه بارانک به این نتیجه رسید که از نظر فعالیت کیفی، تعداد باندهای به دست آمده در اندام شاخه بیشتر از برگ بود و علت کمتر بودن فعالیت آنزیمی نمونه‌های برگ نسبت به شاخه را ناشی از فصل نمونه‌برداری می‌دانند. زیرا در این زمان (اواخر تابستان) فصل رویش گیاهی رو به پایان است و برگ‌ها به زمان خزان خود نزدیک می‌شوند. نتایج این بررسی در روی گونه سرخدار نیز تایید می‌کند که

هم‌چنان شاخه دارای پلی‌مورفیسم بالاتری است ولی این نظر که فصل رویش در میزان فعالیت آنزیم تأثیر دارد ممکن است در مورد پهن‌برگان که خزان‌کننده هستند قابل قبول باشد، در صورتی که این نتیجه در مورد سرخدار همیشه‌سبز نیز نشان داد که با وجود خزان نداشتن، باز هم اندام برگ فعالیت کمتری نسبت به شاخه دارد. همچنین مطالعات آزادفر (۱۳۷۷) در بررسی تنوع ژنتیکی درختان گیلاس وحشی با استفاده از نشانگر پراکسیداز نشان داد که اندام شاخه با ۱۷ باند دارای پلی‌مورفیسم بالاتری نسبت به جوانه با ۱۳ باند است.

بنابراین براساس نتایج این بررسی، درختان سرخدار منطقه افراتخته دارای تنوع نسبتاً خوبی هستند و اندام شاخه از پلی‌مورفیسم و قابلیت تفکیک بالایی در بررسی تنوع برخوردار است. هم‌چنین با توجه به دندروگرام‌های به‌دست آمده، تمامی پایه‌ها دارای منشأ ژنتیکی یکسانی بوده به‌طوری که آنزیم پراکسیداز قادر به شناسایی اکوتیپی جدید در منطقه نبود. در ادامه توصیه می‌شود، میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی در توده‌های جنگلی این گونه به کمک مطالعات مولکولی DNA دنبال شود. در امر حفاظت گونه نیز، حفظ این ذخایر ژنتیکی برای نسل‌های آینده الزامیست که از طریق کمک به تجدید حیات طبیعی پایه‌ها بخصوص پایه‌های دارای الگوی شاخص و استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی می‌توان جمعیت‌های با تنوع کمتر را با کمک پایه‌های شاخص سایر جمعیت‌ها، غنی‌تر ساخت.

منابع مورد استفاده

- آزادفر، د.، ۱۳۷۷. بررسی اکولوژیک و کلاسه‌بندی ژنتیکی درختان گیلاس وحشی (*C. avium*) در جنگل تحقیقاتی واز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، ۱۵۷ صفحه.
- ایرانمنش، ی.، علی‌احمد کروری، س.، اسپهبدی، ک. و آزادفر، د.، ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز در اندام‌های مختلف گونه بارانک (*Sorbus torminalis* L. Crantz). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۷: ۱۵۵-۱٦۵.
- جعفری مفیدآبادی، ع.، و جورابچی، ع.، ۱۳۸۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی در سوماکلن‌های جدید در صنوبر پده *Populus euphratica* OLIV. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۷:.۲۷-٤۰
- حافظی شاهرودیان، س.، ۱۳۸۸. تنوع ژنتیکی سرو زربین در توده‌های شمال کشور به کمک نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده جنگلداری و فناوری چوب، ۱۸۸ صفحه.
- داراب‌یزدانی، د.، شهنازی، س.، رضازاده، ش.ع. و پیرعلی، م.، ۱۳۸٤. مروری بر گیاه سرخدار *Taxus baccata* L. فصلنامه گیاهان داروئی، ۱۵: ۸-۱.
- رستمی شاهراجی، ت. و یوسف‌پور رشتی، م.، ۱۳۸۱. مطالعه زادآوری طبیعی سرخدار (*Taxus baccat* L.) در منطقه درفک-گیلان. پژوهش و سازندگی،۵۷-۵٦: ۱۹-۱۵.
- زارع، ح.، ۱۳۸۰. گونه‌های بومی و غیربومی سوزنی‌برگ ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ٤۹۸ صفحه.
- صالحی شانجانی، پ. و ثاقب طالبی، خ.، ۱۳۸۳. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و کمی و کیفی توده‌های راش ایران از دیدگاه حفاظت ژن. تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۲: ۱۸٤-۱٤۷.
- کروری، س.، ۱۳۷۸. مجموعه مقالات بررسی نحوه پاسخ آنزیم‌ها در درختان جنگلی به تغییرات عوامل زیست محیطی. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ۳۳۳ صفحه.
- کلاگری، م.، جعفری مفیدآبادی، ع.، طبری، م. و حسینی، م.، ۱۳۸٦. بررسی تغییرات ژنتیکی جوامع پده با استفاده از آنزیم پراکسیداز. تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۵: ۱۲۲-۱۱۵.

– میردریکوند، م.، نعمت‌زاده، ق.ع.، اعلمی، ع. و قره‌یاضی، ب.، ۱۳۸۳. مطالعه تنوع ژنتیک برنج‌های ایرانی توسط نشانگرهای آیزوزایم. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۵: ۱۵۳– ۱٤۳.

– نقوی، م.ر.، قره‌یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق.، ۱۳۸٦. نشانگرهای مولکولی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۳۳٤ صفحه.

– وردیان‌ریزی، م.ر.، حاجی‌آخوندی، ع.، رضازاده، ش.ع.، خانوی، م. و پیرعلی‌همدانی، م.، ۱۳۸۷. جداسازی Taxuspinanane G از سرشاخه‌های گیاه سرخدار (*Taxus baccata* L.). فصلنامه گیاهان داروئی، ۲۸: ۱۲٤–۱۲۰.

– Chung, M.G., Oh, G.S. and Chung, J.M., 1999. Allozyme variation in Korean population of *Taxus cuspidate* (Taxaceae). Scandinavian Journal of Forest Research, 14: 103-110(8).

– Grill, D., Bauer, E., Idobernig H. and Klansek, E., 1981. Peroxidase- Isoenzymemuster in vier Pinus species phyton, Austria. 22: 233- 241.

– Grill, D., 1982. Die Peroxidase- isoenzymemuster von *Picea alba* and *larix decidua*. 22: 201- 211.

– Guzina, V., 1974. Genetic polymorphism of the isoenzymes of peroxidase and esterase in *populus deltiides topola*. 18: 170-176.

– Price, R.A., 1990. The genera of Taxaceae in the southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum, 71: 69-91.

– Sreekumer, V.B. and Renuka. C., 2006. Assessment of genetic diversity in calamus thwaitesii BECC. (Arecaceae) using RAPD markers. Syst. Ecol. 34, 397- 405.

– Worthington Biochemical Corporation. 1972. Enzyme Manual Worthington. pp.43-45.

Consideration and comparison of genetic diversity of English yew species (*Taxus baccata* L.) by using branch and leaf peroxidase

L. Karimi[1]* and D. Azadfar[2]

1*- Corresponding author, M.Sc., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran, Email: LL.Karimi@Gmail.com
2- Assist. Prof., Gorgan Uiversity of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R.Iran

Received: 01. 06.2010 Accepted: 11.11.2010

Abstract

English yew (*Taxus baccata* L.) species is one of the rare native conifers of Iran and remained from tertiary third growth period. Due to excessive exploitation and also for slow growing, now a days the species is facing extinction treat and remaining individuals have high genetic value. Genetic diversity existence between populations of one species display the best ways for diversity conservation of the populations and for finding plus maternal individuals for seed stores. This research was done with the aim of evaluation and comparison of genetic diversity and polymorphism of yew, based on branch and leaf peroxidase, verifying best organ for genetic diversity study and for recognition of index individuals of yew in Afratakhte location of Zarin Gol in Aliabad of Golestan province (IRAN). Contemporaneous sampling from biennial growth of branch and leaf of 42 individuals were taken based on three populations. Extracts were prepared from the samples immediately after the sampling. Measurements of quantitative activities were done by spectrophotometer and qualitative studies with electrophoresis by PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) method. Results showed that yew trees have rather well genetic variation in Afratakhte location. For quantitative activity, significant differences were observed between branch and leaf organs at 95% level of probability, so that enzyme activity in branch (0.066) was more than that of leaf (0.020). Also the number of branch isoenzymatical bands (12 bands) was more than that of leaf (6 bands). Results of cluster analysis also showed more grouping in branch (12 groups) than leaf (8 groups). Therefore, branch organ, comparing with leaf organ has higher ability for separation and grouping in considering of genetic diversity of yew trees.

Key words: Genetic Diversity, Taxus, Peroxidase, Branch, Leaf, Afratakhte.