دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۹۲-۸۳ (۱۳۸۹)

بررسی تنوع ژنتیکی درختان آزاد با استفاده از ایزوآنزیم پراکسیداز برگ در سه رویشگاه جلگه‌ای شمال ایران

فریبا بابایی[۱]، سید غلامعلی جلالی*[۲] و داوود آزادفر[۳]

۱- کارشناس ارشد جنگل‌داری، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، نور
۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، نور پست الکترونیک: gholamalij@yahoo.com
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان

تاریخ دریافت: ۸۸/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۰۳/۲۳

چکیده

برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی گونه آزاد *Zelkova carpinifolia* براساس فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز, ۳۰ پایه درختی از سه استان گیلان, مازندران و گلستان, انتخاب و نمونه‌های برگ در یک برای از تاج درخت و ارتفاع یکسان از زمین, برداشت شد. پس از عصاره‌گیری از نمونه‌ها, بررسی کمی آنزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV و بررسی کیفی آن با استفاده از روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز (PAGE) انجام شد. در بررسی کمی آنزیم, بیشترین میزان فعالیت مربوط به رویشگاه مازندران و کمترین میزان فعالیت مربوط به رویشگاه گلستان بود؛ با این حال, تجزیه واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌داری را بین سه رویشگاه نشان نداد. در بررسی کیفی آنزیم با توجه به الگوی باندی, سه اکوتیپ قابل تفکیک است. تجزیه خوشه‌ای داده‌های کیفی, پایه‌های مورد بررسی را در ٦ گروه قرار داد و محاسبه فاصله ژنتیکی بیشترین فاصله را با وجود تشابه اکولوژیکی، بین پایه‌های رویشگاه گلستان و کمترین فاصله ژنتیکی را بین پایه‌های رویشگاه گیلان نشان داد که مؤید تنوع درون جمعیتی بیشتر رویشگاه گلستان و مناسبتر بودن شرایط این رویشگاه نسبت به دو رویشگاه دیگر برای گونه آزاد است. در صورتی‌که رویشگاه گیلان و مازندران الگوی باندی یکنواخت‌تر و تنوع کمتری را نشان دادند. نتایج این تحقیق لزوم حفاظت و بکارگیری روش‌های مؤثر برای حفظ تنوع ژنتیکی این گونه را یادآور می‌شود.

واژه‌های کلیدی: درخت آزاد، تنوع ایزوآنزیمی، الکتروفورز عمودی، اسپکتروفتومتر، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

جنگل‌های هیرکانی با بیش از ۱۳۰ گونه درختی و درختچه‌ای (ثابتی، ۱۳۷٤) ۱۵ درصد از جنگل‌های ایران را به خود اختصاص داده‌اند. تنوع توپوگرافی و حضور پوشش گیاهی از ارتفاع نزدیک به سطح دریا تا ارتفاع حدود ۲۸۰۰ متر به همراه تنوع اقلیمی در طول گستره این منطقه رویشی، سبب شکل‌گیری یکی از مهمترین ذخیره-گاه‌های ژنتیکی زیست‌کره با تعداد گونه‌های انحصاری بالا شده است. اما طی سالیان اخیر تخریب، بهره‌برداری بی‌رویه و قاچاق چوب، سبب کاهش مساحت ۳/۷ میلیون

هکتاری جنگل‌های هیرکانی به مساحت حدود ۱/۸ میلیون هکتاری شده که در بر دارنده بخش مهمی از ذخایر ژنتیک گیاهی کشور بوده است. یکی از گونه‌های با ارزش و در معرض خطر جنگل‌های هیرکانی، گونه آزاد (*Zelkova carpinifolia*) از خانواده *Ulmaceae* است (Jalili & Jamzade, 2000) که در گذشته جمعیت‌های خالصی را در سطح وسیع در جنگل‌های جلگه‌ای شمال ایران تشکیل می‌داد، اما متأسفانه در دهه‌های اخیر بعلت تخریب زیستگاه و همچنین بهره‌برداری‌های بی‌رویه، تنوع آن رو به کاهش نهاده است. این گونه باقیمانده دوران سوم زمین‌شناسی است که از آن به‌عنوان فسیل زنده یاد می‌شود (Kavadaz & Cooner, 2004). پراکنش آن در جنگل‌های شمال ایران، از آستارا تا گلیداغی به صورت توده‌ای و پراکنده است. درخت آزاد ازجمله درختان بلند قامت مناطق معتدله می‌باشد که ارتفاع آن به ۲۵ـ ۳۵ متر و قطرش به بیش از یک متر می‌رسد (ثابتی، ۱۳۷٤؛ خاتم‌ساز، ۱۳٦۹) و گونه‌ای نادر و ارزشمند در ترکیب و تنوع عناصر رویشی در جنگل‌های خزری می‌باشد. با توجه به روند سریع تخریب و نابودی جنگل‌ها، به‌ویژه گونه‌های نادر و ارزشمند، باید تحولی اساسی در مدیریت جنگل‌داری کشور صورت گیرد و با اندیشه‌ای نو مبتنی بر اصول توسعه پایدار، برای حفاظت اصولی از غنای ژنتیک گیاهی، گام مؤثری برداشته شود.

در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی (Bruschi *et al.*, 2003)، ایزوآنزیمی (Clarke *et al.*, 2008, Bogdanovic *et al.*, 2006) و مولکولی (Banu *et al.*, 2010؛ King *et al.*, 2009) معمول است. آنزیم پراکسیداز ازجمله مهمترین آنزیم‌ها، در سیر تحولات فیزیولوژیک گیاهان می‌باشد که در بسیاری از تحقیقات به‌عنوان شاخص تغییرات اکولوژیک در درون گیاه معرفی شده‌است (Grambow & Eberman *et al.*, 1996; Langebeck, 1983) و نقش مهمی در رشد و نمو و تمایز گیاهی بازی می‌کند (Bardat & Yazdani, 1988)، این آنزیم به دلیل تعدّد باندها و نیز امکان وضوح باند برای مطالعات ایزوآنزیمی همواره از جایگاه خاصی برخوردار است. بسیاری از محققان برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان از تفسیر زیموگرام‌های الکترفورزی این آنزیم استفاده کرده‌اند. بررسی خصوصیات دو گونه *Ulmus minor* و *U. pumila* با استفاده از نشانگرهای آیزوزایمی (Cogolludo-Agustin *et al.*, 2000)، تنوّع ایزوآنزیمی گونه *Rrynoutria* از خانواده‌ی *Polygonaceae* (Mardak *et al.*, 2005) و تنوّع ایزوآنزیمی جمعیت‌های اندمیک گونه‌های *Astragalus submitis* و *Astragalus persicus* (Zarre *et al.*, 2004, 2007) نمونه‌هایی از این دسته مطالعات به شمار می‌روند.

تحقیق حاضر در مورد گونه آزاد که یکی از گونه‌های ارزشمند در ترکیب عناصر رویشی جنگل‌های خزری است، انجام شد. در این مطالعه نقش آنزیم پراکسیداز در بررسی تنوع ژنتیکی گونه آزاد در سه رویشگاه جلگه‌ای در شمال ایران، به منظور برنامه‌ریزی مدیریت حفاظت و احیا، مورد بررسی قرار گرفت.

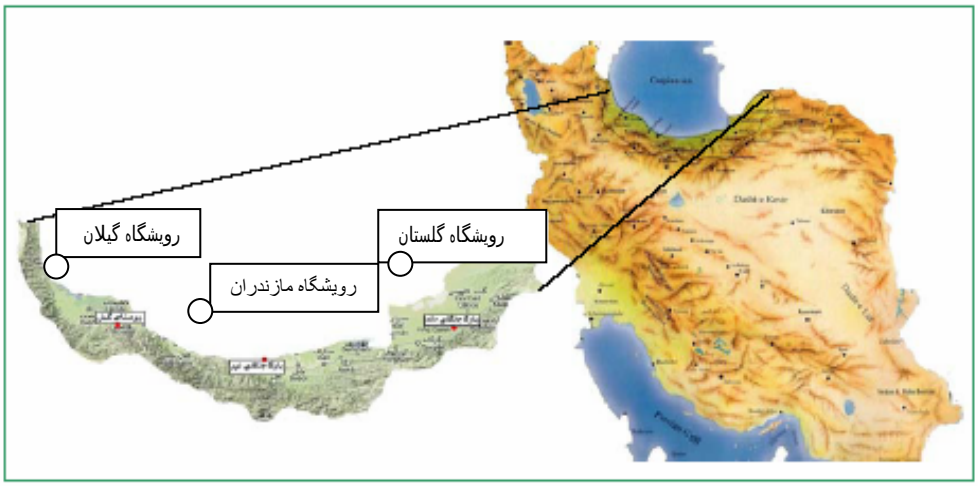
مواد و روشها

نمونه‌برداری

ابتدا سه رویشگاه جلگه‌ای درخت آزاد در سه استان شمالی گیلان، مازندران و گلستان انتخاب شد (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول ۱- ویژگی مناطق مورد مطالعه

منطقه	رویشگاه	ارتفاع از سطح دریا (m)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	میانگین دمای سالیانه (°C)	میانگین بارش سالیانه(mm)
استان گیلان	روستای گمل(G)	۵۰	۳۷° ۸´ ۳۳″	۵۰° ۱´ ٤۷″	۱۷/٤	۱٤۳۰
استان مازندران	پارک جنگلی نور (N)	۰	۳٦° ۳٤´ ۵۲″	۵۲° ۰۲´ ۵۳″	۱۸/٤	۸۵۰
استان گلستان	پارک جنگلی دلند (D)	۲۰۰	۳۷° ۰۲´ ٤۸″	۵۵° ۰۵´ ۲۵″	۲۱/۸	۵۷۵



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق مورد مطالعه روی نقشه

در هر یک از مناطق مورد بررسی ۱۰ پایه سالم درخت آزاد انتخاب و نمونه‌های برگ در یک برای نسبت به تابش آفتاب و ارتفاع معین از سطح زمین برداشت گردیدند. کلیه نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت به صورت جداگانه در یخدان حاوی یخ خشک (دمای ٤ درجه سانتیگراد) برای مطالعات آنزیمی به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

مطالعات آزمایشگاهی

پس از تهیه نمونه‌های مورد نظر، آنها 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 و تا زمان انجام آزمایش‌های کمی و کیفی، در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Korori, 1989.).

مطالعات کمی 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) و طبق روش کروری و ابرمن انجام شد (Korori & Eberman 1991؛ Hames & Rickwood, 1999).

روشهای آماری

فعالیت کمی پراکسیداز با استفاده از تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS Ver 11.5 بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌های الکتروفورتیکی (ژل‌های تهیه شده) به صورت کیفی و با تفسیر باندهای ایزوآنزیمی براساس حضور و عدم حضور باندها انجام شد. گروه‌بندی فعالیت کیفی پراکسیداز با استفاده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌ها و به روش Ward's با استفاده از نرم‌افزار JMP انجام و نتایج حاصل به صورت دندروگرام ترسیم شد.

نتایج

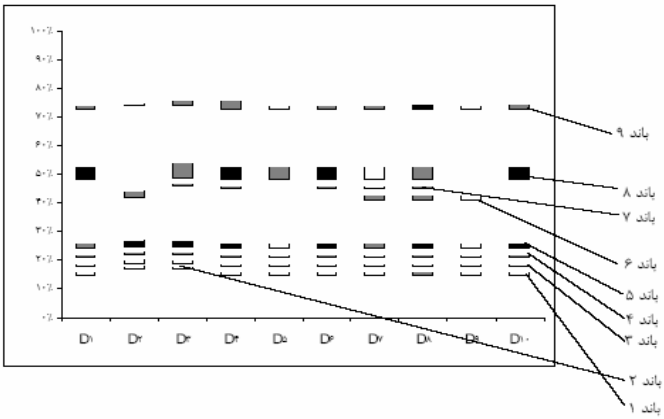
میانگین فعالیت آنزیمی در سه رویشگاه گیلان، مازندران و گلستان به‌ترتیب ۰/۰٦۱۳، ۰/۰۸۹۸ و ۰/۰٤۹۳ می‌باشد. کمترین میزان فعالیت کمی در پایه شماره ۹ رویشگاه گلستان (۰/۰۰۰۹) و بیشترین میزان فعالیت در پایه شماره ۱ رویشگاه مازندران (۰/۲۱٦۷) دیده شد. گرچه تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت معنی‌داری را در سه رویشگاه مورد بررسی نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس فعالیت کمی پراکسیداز در برگ

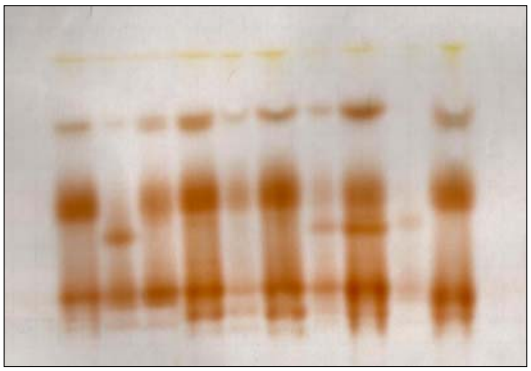
پارامتر مورد بررسی		مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز برگ	بین گروهها	۰/۰۰۹	۲	۰/۰۰٤	۱/۲۸۳	۰/۲۹٤
	درون گروهها	۰/۰۹۱	۲۷	۰/۰۰۳		
	کل	۰/۱۰۰	۲۹			

در بررسی کیفی پراکسیداز در نمونه‌های برگ در کل، ۹ باند مجزا مشاهده شد باندهای شماره ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ در منطقه مولکول‌های سنگین، باندهای٦، ۷ و ۸ در منطقه مولکول‌های متوسط و باند ۹ در منطقه مولکول‌های سبک واقع شده است.

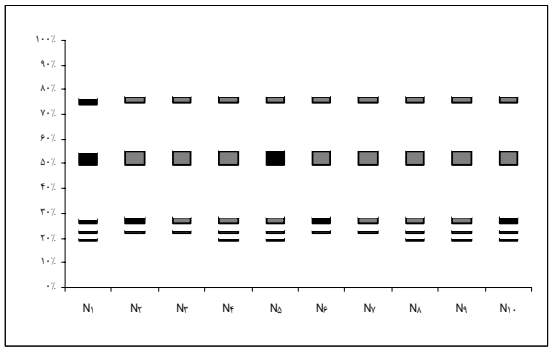
باند شماره ۱ دارای ٤۰٪ فراوانی یا حضور بود. ۱۲ اصله از درختان این باند را نداشتند که عبارتند از: درختان شماره ۱، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ پارک جنگلی دلند به همراه پایه-های شماره ۷، ۸، ۹ و ۱۰ رویشگاه گیلان. جالب آن‌که هیچ کدام از پایه‌های پارک جنگلی نور این باند را نداشتند. فراوانی باند شماره ۲ نیز ۲۳٪ بود و حدود ۷ اصله از درختان این باند را داشتند که شامل پایه‌های ۲ و ۳ پارک جنگلی دلند به همراه پایه‌های ۷، ۸ و ۹ رویشگاه گیلان بود و پایه‌های پارک جنگلی نور این باند را نداشتند. فراوانی باند شماره ۳ حدود ۸٦٪ بود و تمام پایه‌ها به استثنای پایه‌های شماره ۲، ۳، ٦ و ۷ نور دارای این باند بودند. فراوانی باند شماره ٤، ۵ و ۹ نیز ۱۰۰٪ بوده که می‌توان این باندها را به‌عنوان باند پایه فیزیولوژیک در نظر گرفت. فراوانی باند شماره ٦ حدود ۳٦٪ بود و ۱۱ تا از پایه‌ها شامل پایه‌های ۲، ۷، ۸ و ۹ دلند می‌شود. هیچ کدام از پایه‌های رویشگاه نور این باند را نداشتند. در رویشگاه گیلان نیز تمام پایه‌ها به استثنای پایه‌های شماره ۲، ۹ و ۱۰ این باند را دارند. فراوانی باند ۷ نیز ۲۰٪ بود و فقط شامل ٦ تا از پایه‌های رویشگاه دلند (۲، ۳، ٤، ٦، ۷ و ۸) می‌شود و هیچ کدام از پایه‌های رویشگاه گیلان و پارک جنگلی نور این باند را نداشتند. باند شماره ۸ فراوانی ۹٦٪ داشت و به استثنای پایه شماره ۹ دلند



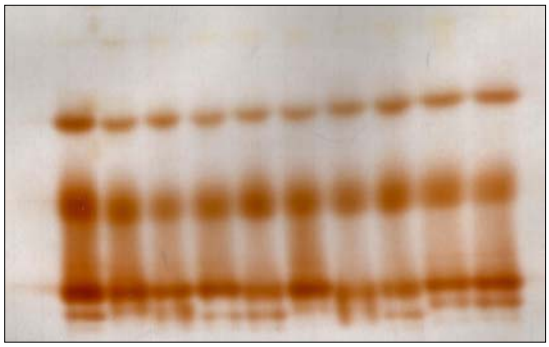
نمودار ۱- زیموگرام الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه دلند



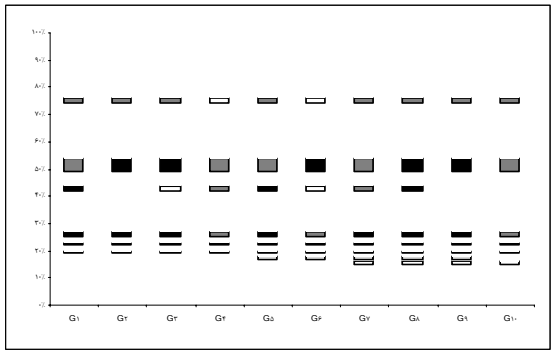
شکل ۲- ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه دلند



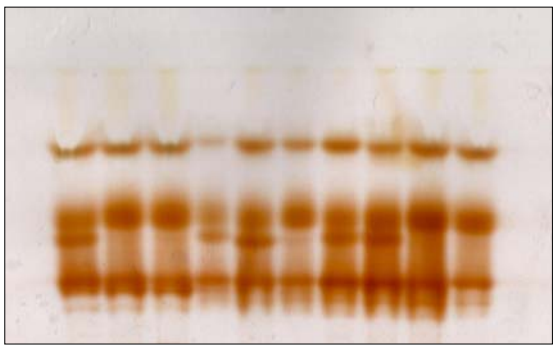
نمودار ۲- زیموگرام الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه مازندران



شکل ۳ - ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه مازندران



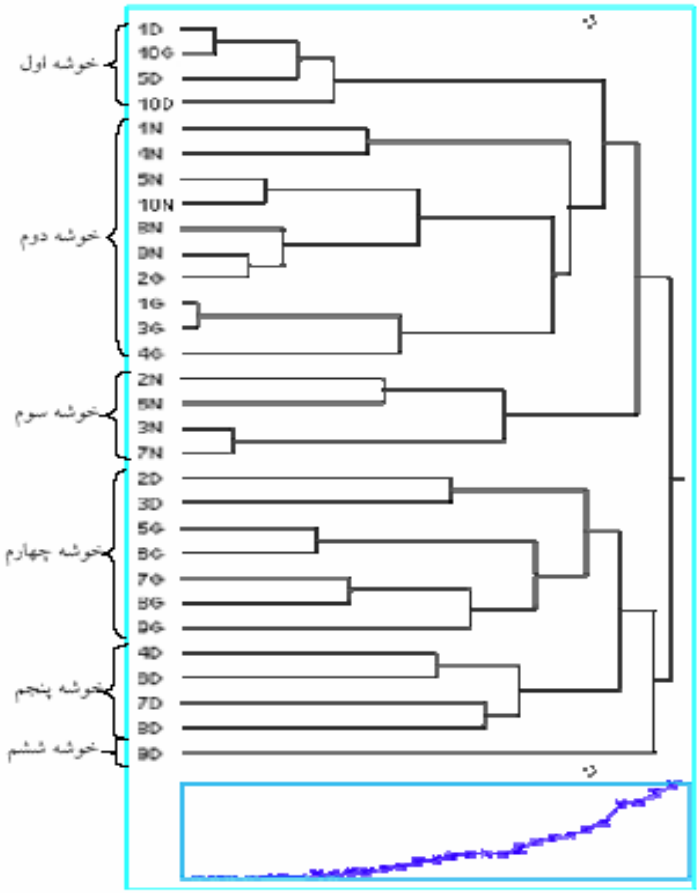
نمودار ۳- زیموگرام الکتروفورزی آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه گیلان



شکل ٤- ژل الکتروفورز آنزیم پراکسیداز برگ در رویشگاه گیلان

تمام پایه‌ها این باند را داشتند (نمودار۱-۳ و شکل ۱تا ۳). گروه‌بندی پایه‌های موجود در سه رویشگاه مورد بررسی براساس فعالیت کیفی پراکسیداز با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward's، شش خوشه را از یکدیگر متمایز نمود که خوشه اول پایه‌های ۱، ۵ و ۱۰ پارک جنگلی دلند به همراه پایه ۱۰ رویشگاه گیلان، خوشه سوم پایه‌های ۲، ۳، ٦

و ۷ پارک جنگلی نور، خوشه چهارم پایه‌های ۲ و ۳ پارک جنگلی دلند به همراه پایه‌های ۵، ٦، ۷، ۸ و ۹ رویشگاه گیلان، خوشه پنجم پایه‌های ٤، ٦، ۷ و ۸ پارک جنگلی دلند و خوشه ششم پایه ۹ پارک جنگلی دلند را شامل می‌شود و سایر پایه‌ها در خوشه دوم قرار گرفتند. بیشترین مقدار فاصله ژنتیکی (که با استفاده از روش اقلیدسی محاسبه شد)، با وجود تشابه شرایط اکولوژیکی، در بین پایه‌های ۱ و ۲ (٦/٤٦) و همچنین ۲ و ۹ (۵/۷۸) رویشگاه گلستان و کمترین فاصله ژنتیکی نیز در بین پایه‌های ۱ از پارک جنگلی نور، پایه ۱۰ از رویشگاه گیلان (۰/۰٤۹) و پایه‌های ۱ و ۳ (۰/۰٤۱) رویشگاه گیلان مشاهده شد.



نمودار ٤- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای آنزیم پراکسیداز برگ درختان آزاد در مناطق مورد بررسی (D= پایه‌های پارک جنگلی دلند، N= پارک جنگلی نور و G= رویشگاه گیلان).

بحث

ایزوپروتئین‌ها و ایزوآنزیم‌ها حساسترین عامل برای جداسازی و تفکیک تاگزونومی گیاهان محسوب می‌شوند و مثل اثر انگشت معرف شناسایی جنس، گونه و زیرگونه هستند (Mandal *et al.*, 2000؛ Barriere, 1985؛ Bergman *et al.*, 1983) بنابراین در بسیاری از تحقیقات، فعالیت کمی و کیفی ایزوآنزیم پراکسیداز در گیاهان مبنای طبقه‌بندی ژنتیکی قرار داده شده است (ایرانمنش و همکاران، ۱۳۸۵ و

۱۳۸۸؛ کروری، ۱۳۷۸؛ Machon *et al.*, 1997; Bogdanovic *et al.*, 2006; Manjuntha *et al.*, 2003).

استفاده از فعالیت کمی و کیفی پراکسیداز در این تحقیق نشان داد که حضور و عدم حضور باندها با فراوانی‌های مختلف و میزان متفاوت فعالیت آنزیم، سه اکوتیپ جداگانه را به وجود می‌آورد. با اینکه از لحاظ کمی تفاوت معنی‌داری بین سه رویشگاه وجود ندارد، اما بیشترین میانگین فعالیت کمی پراکسیداز، مربوط به رویشگاه مازندران و کمترین میانگین مربوط به رویشگاه گلستان بود که می‌تواند مؤید تفاوت ژنتیکی این سه رویشگاه از یکدیگر باشد.

حضور باند شماره ۷ در رویشگاه گلستان، عدم حضور باند شماره ۸ با فراوانی ۹۶٪ در پایه‌های ۲ و ۹ این رویشگاه (نمودار۱ و شکل۲) و کمترین میزان فعالیت آنزیم در پایه ۹ این رویشگاه که در یک خوشه جداگانه نیز طبقه‌بندی شده‌بود (نمودار ٤) می‌تواند آن را از دو رویشگاه دیگر متمایز سازد.

رویشگاه مازندران نیز به علت عدم حضور باندهای شماره ۱، ۲ و ٦ از دو رویشگاه دیگر قابل تفکیک است (نمودار ۲ و شکل ۳). بنابراین رویشگاه گلستان دارای تنوع بیشتری به لحاظ الگوی ایزوآنزیمی نسبت به دو رویشگاه دیگر بود (نمودار ۱ و شکل ۲). در صورتی‌که رویشگاه گیلان و مازندران الگوی باندی یکنواخت‌تری را ارائه دادند (نمودارهای ۲، ۳ و شکل‌های ۳، ٤). بیشترین فاصله ژنتیکی نیز با وجود تشابه رویشگاه، در بین پایه‌های رویشگاه گلستان وجود داشت و کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به رویشگاه گیلان بود.

با توجه به اینکه مناطق مورد بررسی دارای شیب اکولوژیکی متفاوتی به لحاظ شرایط جغرافیایی و آب و هوایی هستند (جدول ۱) و آنزیم پراکسیداز نیز شاخص تغییرات اکولوژیک در بسیاری از تحقیقات (Grambow & Eberman *et al.*, 1996; Langebeck, 1983) معرفی شده‌است، می‌توان علت تفاوت در باندهای ایزوآنزیمی را به تفاوت در شرایط اکولوژیکی بین سه رویشگاه نسبت داد (کلاگری و همکاران، ۱۳۸٦؛ ایرانمنش، ۱۳۸۰). با این وجود زمانی که تغییرات با وجود تشابه شرایط اکولوژیکی در بین پایه‌های یک جمعیت زیاد باشد، می‌توان آن را ناشی از تفاوت ژنتیکی پایه‌ها نسبت به یکدیگر دانست (Mayer & Eshlok, 1991) که در این صورت رویشگاه گلستان دارای تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به دو رویشگاه دیگر بود، که اثبات قطعی این موضوع نیازمند مطالعات مولکولی در این زمینه می‌باشد.

تنوع بیشتر رویشگاه گلستان می‌تواند ناشی از شرایط حاکم بر این رویشگاه باشد. درخت آزاد گونه‌ای خشکی‌پسند، کندرشد و نورپسند بوده که طالب خاک‌های سبک، غنی و عمیق است و نسبت به زهکشی پایین خاک حساس است (Kavadaz & Connor, 2004). رویشگاه اصلی این گونه در جنگل‌های نیمه‌نم‌پسند شمال ایران یعنی در شرق جنگل‌های هیرکانی است. بنابراین می‌توان گفت که این گونه نسبت به شرایط رویشگاهی پارک جنگلی دلند سازگارتر است، در صورتی‌که رطوبت بالا در رویشگاه گیلان شرایط نامساعدتری را به لحاظ اقلیمی و ادافیکی، برای گونه آزاد به وجود آورده که می‌تواند باعث کاهش تنوع آن شده باشد. همچنین وسعت رویشگاه دلند نسبت به دو رویشگاه دیگر بسیار بیشتر بوده و درخت آزاد، گونه غالب در این رویشگاه می‌باشد و سطح تنوع زیستی نیز معمولا در بین جمعیت‌های بزرگتر بیشتر است (Machon *et al.*, 1997)، در صورتی که درخت آزاد در دو رویشگاه دیگر در جمعیت‌های کوچک و به صورت توده‌ای و پراکنده حضور دارد که این امر می‌تواند تلاقی درون گروهی را افزایش داده

و باعث تشابه الگوی ایزوآنزیمی پایه‌ها شده باشد. تخریب رویشگاه نیز یکی از دلایل کاهش تنوع ژنتیکی در بین این جمعیت‌ها می‌باشد (الوانی‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۸). درصد پوکی بذر نیز در این گونه بالا بوده و قوه نامیه آن پایین است (Iskender *et al.*, 2006)، در رویشگاه گیلان و پارک جنگلی نور در اثر کوبیدگی خاک به علت آمد و شد مسافران و بازدیدکنندگان و رطوبت بالاتر خاک، بذرهای ریخته شده حتی اگر دارای قوه نامیه باشند باز هم از شانس کمتری برای رشد و نمو برخوردارند که این امر باعث کاهش جوانه‌زنی بذرها شده و لزوم انجام عملیات مراقبتی نظیر قرق کردن محل‌های زادآوری و خراش سطحی برای کاهش کوبیدگی خاک و استقرار بهتر نهال‌ها را یادآور می‌شود.

برای حفاظت از گونه‌های نادر و در معرض خطر، افزایش تنوع ژنتیکی یکی از راهکارهای پذیرفته شده و معمول است که برای نیل به این هدف دانستن سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به سهولت استفاده و ارزانتر بودن نشانگرهای بیوشیمیایی نسبت به نشانگرهای مولکولی، نتایج چنین تحقیقاتی می‌تواند سطح تنوع جمعیت‌ها را تخمین زده و در انتخاب سطح نمونه مناسب برای مطالعات تنوع ژنتیکی کمک شایانی بنماید (Machon *et al.*, 1997). با توجه به تأثیر بیماری مرگ نارون روی این گونه و تخریب شدید آن در سال‌های اخیر، ایجاد باغ‌های بذر با استفاده از پایه‌های نادر و دارای الگوی ایزوآنزیمی متفاوت نسبت به سایر پایه‌ها در هر رویشگاه و جنگل‌کاری با استفاده از بذرهای بدست آمده از آن‌ها، می‌تواند منجر به افزایش تنوع ژنتیکی و حفاظت از این گونه نادر و با ارزش جنگل‌های شمال ایران شود که دست‌خوش تخریب و نابودی قرار گرفته است.

توجه به این نکته ضروریست که انجام این تحقیق صرفا با بررسی یک نشانگر بیوشیمیایی (ایزوآنزیم پراکسیداز) انجام شده و بررسی تفاوت‌های ژنتیکی با استفاده از ایزوآنزیم‌ها نسبت به پارامترهای قابل اندازه‌گیری و کمی دشوارتر می‌باشد (Manjuntha *et al.*, 2003). با این وجود، در بسیاری از تحقیقات انجام شده (کلاگری و همکاران، ۱۳۸٦؛ ایرانمنش و همکاران، ۱۳۸۵ و ۱۳۸۸ ,.Zarre *et al* ; 2007 & 2004) استفاده از آنزیم پراکسیداز، تنوع موجود بین گونه‌ها را به خوبی نشان داده‌است. لازم به ذکر است که استفاده از نشانگرهای مولکولی نظیر RAPD، RFLP، AFLP و EST برای نقشه‌برداری کامل از ژنوم در چنین تحقیقاتی ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

در پایان از خانم مهندس لیلا کریمی و آقای مهندس حامد یوسف‌زاده برای همکاری و کمک‌هایشان برای انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع مورد استفاده

– الوانی‌نژاد، س.، طبری، م.، اسپهبدی، ک. و تقوایی، م.، ۱۳۸۸. وراثت‌پذیری صفات نهال‌های یکساله بلوط ایرانی. مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۷: ۲۱۸–۲۲۸.

– ایرانمنش، ی.، علی‌احمد کروری، س.، اسپهبدی، ک.، آزادفر، د.، ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز در اندام‌های مختلف گونه بارانک (*Sorbus torminalis* L. Crantz)، مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۷: ۱۵۵–۱٦۷.

– ایرانمنش، ی.، علی احمد کروری، س.، عمادیان، س. ف.، آزادفر، د. و اسپهبدی، ک.، ۱۳۸۵. بررسی نقش مطالعات آنزیمی در جداسازی اکوتیپ‌های بارانک. مجله تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱٤(٤): ۲۹۲– ۳۰۵.

– ثابتی، ح.، ۱۳۷٤. درختان ودرختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه یزد، ۸۱۰ صفحه.
– خاتم‌ساز، م.، ۱۳٦۹. فلور ایران (خانواده نارون). شماره‌ی ٤. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ۲۵ صفحه.
– علی احمد کروری، س.، ۱۳۷۸. مجموعه مقالات بررسی پاسخ انزیم‌ها در درختان جنگلی به تغییرات عوامل زیست محیطی. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، شماره ۲۰۸، تهران، ۳٦۸ صفحه.
– کلاگری، م.، جعفری مفیدآبادی، ع.، طبری، م. و حسینی، س،م.، ۱۳۸٦. بررسی تغییرات ژنتیکی جوامع پده با استفاده از آنزیم پراکسیداز، تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۵(۲): ۱۱۵–۱۲۲.
– Bardat, P.H and Yazdani, R., 1988. Genetic expression for monoterpense in clones of *Pinus silvestrise* grow on defferent sites. candinavian Journal of Forest Research, 3: 25-36.
– Barrier, G., 1985. The genitival ecological variability of beech (*Fagus silvatica* L.) Mitt. D. BFA f. Forest. U. Holzwirtschaft (Hamburg), 150: 24- 50.
– Bergmann, F., 1985. Experiments of possibilities for genetic certification of forest seed, Theo. Apple. Genet., 43: 222-225.
– Banu, S.D., Lagu, M. and Gupta S.V., 2010. Phylogeographical studies in disjunct populations of *Symplocos laurina* Wall. using cytoplasmic PCR-RFLP approach. Tree Genetics and Genomes, 6:13–23
– 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 Systematics 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.
– Clarke, J.B., Sargent, D.J., Boskovi, R.I., Belaj, A. and Tobutt K.R., 2008. A cherry map from the inter – specific cross *Prunus avium* ‘ Napoleon’ × *P.nipponica* based on microsatellite, gene–specific and isoenzyme marker. Tree Genetics and Genomes, 4: 256-267.
– Cogolludo-Agustin, M.A., Agundez, D. and Gil, L., 2000. Identification of native and hybrid elms in Spain using isozyme gene markers. Heredity, 85: 157-166.
– Eberman, R. and Korori, S.A.A., 1991. Temperature dependent alternation of peroxidase and amylase isoenzymes in *Quercuse Robur*. Phyton, 31: 121-128.
– Eberman, R., Cobinger., Burner U. and Korori, S.A.A, 1996. The peroxidase – Oxidase reaction. Plant Peroxidase, Iv International Symposium, Viemna – AUSTRIA, PP: 0- 13
– Grambow, H.J. and Langebeck-Schwich, B., 1983. The relationship between oxidase activity peroxidase activity, hydrogen peroxidase and phenolic compounends in the degradation of Indole 3-acetic asid in vitro, Plant, 157. 131-137.
– Hames, B.D. and Rickwood, D., 1999. Gel-electrophoresis of proteins, a practical approach second edition, Oxfored University Press.
– Iskender. E., Zeynalov. Y., Ozaslan. M., Incik F. and Yayla F., 2006. Investigation and introduction of some rare and threatened plants from Turkey, Biotechnol. 60-68
– Jalili, A. and Jamzad, Z., 2000. Red Data Book of Iran. Iranian Research Institute of Forest and Rangeland, 748 p.
– Kavadase, E.V. and Connor, S., 2005. *Zelkova carpinifolia* (Pallas) C.Koch in Holocene sediments of Georgia An hndicator of climatic optima, Palaeobotany and palynology, 133: 69-89.
– King, A.R., Harris L., Karp S. *and* Barker H.A.J., 2009. Characterization and inheritance of nuclear microsatellite loci for use in population studies of the allotetraploid *Salix alba–Salix fragilis* complex, Tree Genetics & Genomes, 6: 73-81.
– Korori, S.A.A., 1989. Dissertationsarbeit Zur Eelangung des Dokorgrades and der Universtat fer Badenkult in Wien Enginereicht Von Frou Dipl.Ing
– Mayer, E. and Eshlok, P., 1991. Principles of Systematic Zoology. 511p.
– Machon, N., Lefrance, M., Bilgerl, nL., Mazer, S. and Sarr, A., 1997. Allozyme variation in ulmus species from France: Analysis of differnation, Heredity, 78: 12-20.
– Mandal, A.B., Maiti, A., Chowdhury, B. and Elanchezhian, R., 2000. Isozyme Markers in Varietal Identification of Banana. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37: 599-604.
– Manjuntha, B.R., Virupakshi, S. and Naik, G.R., 2003. Peroxidase isozyme polymorphism in popular sugarcane cultivar. Gurrent Science, 85: 1347- 1349
– Mardak, B., Bimova, K., Pysek, P., Stepanek, J. and Plackova I., 2005. Isoenzyme diversity in reynoutria (*Polygonaceae*) taxa, escape frame sterility hybridization. Plant Systematics and Evolution, 253: 219-230.
– 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 Systematics and Ecology, 32: 675 -684

Genetic variation investigation on *Zelkova carpinifolia*, from three Iranian north lowland habitats using leaf peroxidase

F. Babaie[1] S.G. Jalali*[2] and D. Azadfar[3]

1- M.SC., Natural Resources College, Tarbiat Modarres University, Noor, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Natural Resources College, Tarbiat Modarres University, Noor, I.R.Iran
Email: gholamalij@yahoo.com
2- Assis. Prof., Agricultural and Natiral Resources Univerity of Gorgan, Gorgan, I.R.Iran

Received: 16.11.2009 Accepted:12.06.2010

Abstract

In order to investigate genetic diversity in *Zelkova carpinifolia* population, sampling of leaves of 30 trees in three lowland habitats were done. For evaluating enzyme activities in the leaves, the samples extracted immediately and peroxidase studied quantitatively and qualitatively. Quantitative studies accomplished by spectrophotometer (in 530 NM wave lengths) and qualitative studies performed by polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE). Quantitative activity analyzed with ANOVA method and showed no significant differences in the three habitats, but Mazandaran habitat showed the most average quantitative activity. Grouping of isoenzyme bands showed three ecotypes in three habitats. All trees of the habitats were classified into 6 groups using Ward method of cluster analysis on quantitative data. Assessing genetic distance showed the most distance between Golestan habitat individuals and the least genetic distance in Guilan habitat. Mazandaran and Guilan habitats exhibited low level of isoenzyme pattern relative to Golestan habitat. Golestan habitat had the most within group diversity and is suitable for *Zelkova carpinifolia* development. Result emphasized on utilizing of the most effective approaches for conservation of genetic biodiversity of the species.

Key words: *Zelkova carpinifolia*, Isoenzyme variation, Electrophoresis, Spectrophotometer, Cluster analysis.