

بررسی ویژگی‌های مولکولی و مورفولوژیکی بذور درختان بدفرم و خوش‌فرم راش (*Fagus orientalis* Lipsky) در راشستان‌های خزری

پروین صالحی شانجانی^{۱*}، محمدحسن عصاره^۱ و محسن کلاگری^۱

^۱ عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

(تاریخ دریافت: ۵ / ۵ / ۸۸، تاریخ تصویب: ۱ / ۱۰ / ۸۸)

چکیده

در این پژوهش پنج ویژگی مورفولوژیکی و چهار لوکوس میکروساتلایتی پلی‌مورف برای بررسی تنوع و تمایز ژنتیکی و مورفولوژیکی ۶۰۰ بذر از شش جمعیت راش (*Fagus orientalis* Lipsky)، هر جمعیت ۱۰۰ بذر از ۱۰ درخت خوش‌فرم و بدفرم، بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میان نمونه‌های مختلف بذرهای راش تمام جمعیت‌ها از نظر همه صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در حالی که اختلاف صفات مورد بررسی در میان درختان خوش‌فرم و بدفرم در توده‌های مختلف معنی‌دار نیست. گروه‌بندی جمعیت‌ها یا گروه‌های درختان راش خوش‌فرم و بدفرم هر جمعیت بر اساس صفات مختلف فندقه و بذر، توسط آنالیز (UPGMA) و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام گرفت. هیچ روند کلینالی در گوناگونی ویژگی‌های بذر و فندقه در بین فرم‌های مختلف تنه درخت یا جمعیت‌های رویشگاه‌های مختلف یافت نشد، به طوری که ضریب همبستگی بسیار ناچیزی بین ماتریس‌های فاصله مورفولوژیکی و جغرافیایی ($R^2=0/02$ ، $P=0/270$) که توسط آزمون Mantel محاسبه شده بود به دست آمد. این نتایج نشان داد بر خلاف فرضیه ما، هیچ اکوتیپی در جنگل‌های راش ایران بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی بذر و فندقه قابل شناسایی نیست. همچنین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها بر اساس میانگین فاصله ژنتیکی بذور هر درخت بررسی شد. بررسی ویژگی‌های میکروساتلایتی تمایز جمعیتی متوسط ولی معنی‌داری (Fst: ۰/۱۳ تا ۰/۲۲) را میان خانواده‌های درختان بدفرم و خوش‌فرم به‌ویژه در جمعیت‌های اسالم و خیرود نشان داد که حاکی از وجود ساختار خویشاوندی متمایزی میان بذور ژنوتیپ‌های بدفرم و خوش‌فرم بود. از این گذشته وجود روند کلینال در ویژگی‌های ژنتیکی به‌وسیله آزمون Mantel ثابت شد، به طوری که ضریب همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و جغرافیایی از نظر آماری معنی‌دار شد ($R^2=0/136$ ، $P=0/04$). ضریب همبستگی بسیار ناچیزی بین ماتریس‌های فاصله مورفولوژیکی و ژنتیکی ($R^2=0/028$ ، $P=0/140$) محاسبه شده بود که از نظر آماری معنی‌دار نشد. نتایج این پژوهش حاکی از ژنتیکی بودن بخشی از تفاوت‌های فنوتیپی در فرم درخت است. بر این اساس می‌توان گفت که ویژگی‌های مورفولوژیکی کارایی کمتری از ویژگی‌های ژنتیکی در بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها دارند.

واژه‌های کلیدی: *Fagus orientalis* Lipsky، تنوع و تمایز ژنتیکی، میکروساتلایت، مورفولوژی.

مقدمه و هدف

جنگل‌های آمیخته و خالص راش (*Fagus orientalis* Lipsky) از مهم‌ترین، غنی‌ترین و زیباترین جنگل‌های ایران به‌شمار می‌روند. جنگل‌های راش ۱۷/۶ درصد از سطح جنگل‌های هیرکانی و ۲۳/۶ درصد تعداد و حدود ۳۰ درصد از حجم درختان جنگلی ایران را تشکیل می‌دهند (رسانه و همکاران ۱۳۸۰). بنابراین از نظر اقتصادی، توده‌های راش با ارزش‌ترین توده‌ها هستند و بیشترین مقدار تولید چوب در ایران را به خود اختصاص می‌دهند. کاهش مساحت این جنگل‌ها طی دهه‌های اخیر نشان می‌دهد که حفاظت بسیاری از جمعیت‌های در خطر که از لحاظ مختلف اقتصادی، اکولوژیکی، جنگل‌شناسی یا ژنتیکی اهمیت دارند، ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است. یکی از مهم‌ترین اهداف شیوه جنگلداری که جنگل‌های ایران از ۴۰ سال قبل با آن مدیریت شده‌اند، استفاده از توان اقتصادی جنگل‌ها است. بر اساس این هدف، بسیاری از مجریان پرورش جنگل یا نشانه‌گذارها با انتخاب درختان خوش‌فرم، به دخالت در توده‌ها پرداخته‌اند، به‌طوری‌که صالحی شانجانی و ناقب‌طالبی (۱۳۸۳) با مقایسه جمعیت‌های طبیعی مدیریت‌نشده با جمعیت‌های تحت مدیریت راش نشان دادند که با دستکاری توده‌های راش در جمعیت‌های مدیریت‌شده (به شیوه تدریجی-پناهی)، گستره قطر درختان بسیار محدودتر از جمعیت‌های مدیریت‌نشده و حتی مدیریت‌شده براساس عملیات پرورش جنگل مثل برش‌های اصلاحی و آزادسازی و برش‌های بهداشتی (جنگل‌های خیرود) است. آنها وضعیت مشابهی نیز در ویژگی‌های کیفی مثل شاخه‌دهی، شکل تنه و شاخه‌بندی تنه، گزارش کردند به‌طوری‌که در جمعیت‌های مدیریت‌شده به شیوه تدریجی-پناهی، با تلاش در تغییر ساختار توده‌ها از ناهمسال به همسال، مناسب‌ترین درختان برای تولید چوب نگهداری شده‌اند. تحقیقات دلفان ابادری (۱۳۸۱) در قطعات شاهد و دست‌نخورده منطقه لنگا در کلاردشت نیز گویای تنوع بیشتر سنی، قطری، ساختاری و خصوصیات کیفی درختان راش موجود نسبت به قطعات دست‌خورده است. تجربیات قبلی در جنگل‌های اروپا ثابت کرده که انتخاب درختان یا توده‌ها برای نمونه‌برداری و

مطالعات مدیریت که بر اساس قوانین استاندارد جنگلداری صورت گرفته است ممکن است موجب از دست رفتن بخش‌هایی از تنوع ژنتیکی شود که برای فرایندهای سازگاری آینده ضروری است (Hamrick *et al.*, 1992). سازگاری محیطی جوامع ارتباط مستقیمی با ساختار و تنوع ژنتیکی آنها دارد.

شناخت گوناگونی و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای (۱) شناخت گوناگونی موجود و توانایی آن برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی، (۲) برآورد هر گونه فرسایش تنوع ژنتیکی، (۳) مشاهده شواهدی از فشارهای تکاملی شکل‌دهنده تنوع ژنتیکی و (۴) انتخاب ژنوتیپ‌ها و توده‌هایی که باید حفاظت شوند، الزامی است (Thormann *et al.*, 1994). تعیین ویژگی‌های منابع ژنتیکی به‌وسیله دسترسی به سیستم‌های نشانگرهای مولکولی بسیار تسهیل شده است. ویژگی‌های مورفولوژیکی اگرچه از نخستین نشانگرهای به‌کاربرده شده در مدیریت ژرم‌پلاسم هستند، دارای محدودیت‌هایی چون پلی‌مورفیسم پایین، توارث‌پذیری کم، تأخیر در ظهور و حساسیت به عوامل محیطی، هستند (Smith & Smith, 1992). درحالی‌که نشانگرهای DNA چنین محدودیت‌هایی ندارند و از آنها می‌توان برای تعیین گوناگونی در سطح DNA استفاده کرد و به‌خوبی ثابت شده که ابزار مفیدی برای تشخیص بین ژنوتیپ‌های خویشاوند هستند. نشانگرهای ملکولی گوناگونی برای تعیین تنوع و روابط ژنتیکی در دسترس قرار دارد که بر اساس هدف و مهارت‌ها و امکانات می‌توان از آنها استفاده کرد. میکروساتلایت‌ها به‌علت سهولت آنالیز در وسعت گسترده، پرکاربردترین نشانگرهای ملکولی در بررسی منابع ژنتیکی هستند (Tautz, 1989).

ویژگی‌های مورفولوژیکی بذر، به‌علت پایداری در بسیاری از گونه‌های گیاهی ابزار قابل اعتمادی برای پژوهش‌های تاکسونومیک و نیز شناسایی ارقام مختلف گیاهی به‌شمار می‌آید (Fenner & Thompson, 2005). پژوهش‌های مقایسه‌ای بسیاری در مورد بررسی تنوع ژنتیکی به‌وسیله نشانگرهای مختلف ژنتیکی و مورفولوژیکی گونه‌های مختلف درختی گزارش شده و نتایج متفاوتی به‌دست آمده است (Bruschi *et al.*, 2003; Andrew *et al.*, 2003).

شامل طول و قطر فندقه به‌وسیله کولیس با دقت دهم میلی‌متر، وزن فندقه، وزن بذر و وزن پوسته، برای ۱۰ بذر از هر درخت به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت هزارم گرم اندازه‌گیری شد و ژنوتیپ همه بذور با استفاده از میکروساتلایت‌های هسته‌ای تعیین شد.

DNA کل از بذرها و جوانه‌های خواب درختان (۱۰۰ میلی‌گرم به‌عنوان ماده اولیه) با استفاده از کیت Nucleospin plant (Germany, Macherey Negel) جدا شد. عصاره‌ها (یک میکرولیتر به ازای هر چاهک) به‌وسیله دستگاه الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد (W/V) با نیروی برق ۱۰ ولت در سانتی‌متر به مدت یک ساعت و بافر TEA X ۵۰ حاوی ۰/۵ mgml⁻¹ اتیدیوم برآمید کنترل شده و ژل‌ها پس از عکس‌برداری با یک اسکنر UVP تجزیه شدند. میکروساتلایت‌های FS1-15، FS1-11، FS3-04 و FS1-03 (جدول ۲) ارائه شده توسط Pastorelli et al. (2003)، از طریق PCR تکثیر شدند. برای تکثیر با PCR محیط فرایند (Tris-HCl، pH=۹، ۱۰۰ mM KCL، ۵۰ mM MgCl₂، ۱۵ mM؛ از هر داکسی نوکلئوزیدتری فسفات ۲۰۰ μM؛ از هر پرایمر ۰/۴ μM و Taq DNA polymeras یک واحد) با حجم نهایی ۲۵ μl تهیه شد. پس از نگهداری محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، محلول واکنش در معرض چرخه‌های دمایی زیر قرار گرفت: ۳۰ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، سپس فراورده‌های تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه نگهداری شدند. در این کار از دستگاه PCR مدل Perkin Elmer 9700 استفاده شد. طول قطعات تکثیر شده توسط تسوالی‌یاب خودکار Alf Express, Pharmacia اندازه‌گیری و نتیجه توسط برنامه نرم‌افزاری Fragment Manager 1.2 Pharmacia بررسی شد.

(Beyene et al., 2005; Bucheyeki et al., 2009). این یافته‌ها نشان می‌دهند برای ارائه هر گونه راهبرد حفاظتی و اصلاحی، بررسی مجموعه‌ای از ویژگی‌های هر گونه، بسیار بارز است. در راش نیز برخی پژوهش‌های مقایسه‌ای با هدف بررسی تمایز تاکسونومیک بین گونه‌ای گزارش شده است (Denk et al., 2002; Denk, 2003; Denk, 2004; Denk et al., 2005). تحقیقات درباره ساختار ژنتیکی جمعیت‌های راش خزری به‌وسیله نشانگرهای بیوشیمیایی و مولکولی که همگی از نشانگرهای خنثی هستند حاکی از تنوع ژنتیکی زیاد این گونه بوده است (Salehi Shanjani et al., 2002; Salehi Shanjani et al., 2004; Salehi Shanjani & Vendramin, 2005; Salehi Shanjani et al., 2008). تاکنون ویژگی‌های فنوتیپی این جمعیت‌ها که از ویژگی‌های سازگاری محسوب می‌شوند، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (Etemad & Marvi Mohadjer, 2004). از این‌رو در این پژوهش با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی بذر، تنوع ژنتیکی و نیز ارتباط آن با تمایز درختان بدفرم و خوش‌فرم مورد بحث قرار گرفته است، چراکه چنگالی شدن یکی از نقایص غالب در راش است که ممکن است سبب بدفرمی تنه و کاهش ارزش تجاری درخت شود. در توده‌های راش، درختانی با مورفولوژی خاص تنه (مثل تنه‌های چنگالی) اغلب به‌صورت گروهی مشاهده می‌شوند که علت آن انتشار محدود گرده و به‌ویژه بذر، در توده‌های طبیعی و ساختار فAMILI است. هدف از اجرای این پژوهش، بررسی ارتباط ویژگی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی بذر و فندقه راش با گروه‌های اکوجغرافیایی و فرم درخت است.

مواد و روش‌ها

در گستره پراکنش راش در ایران شش جمعیت (جدول ۱) انتخاب و در هر جمعیت بذره‌های ۱۰ درخت مادری بدفرم (چنگالی) و خوش‌فرم (میان‌رو)، از هر درخت ۷ بذر، به‌عنوان نسل نتاج جمع‌آوری شد. ویژگی‌های فندقه و بذر

جدول ۱- ویژگی‌های مکانی توده‌های راش مورد بررسی

منطقه	ارتفاع از سطح دریا (m)	نام اختصاری	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)	جهت شیب	ترکیب جنگلی: درصد راش	تاج پوشش (%)	سطح دخالت
گرگان	۶۰۰	گ-۶۰۰	۳۶°۴۲'	۵۴°۰۶'	NW, N	۳۲	۹۰	مدیریت شده *
نکا	۱۴۰۰	ن-۱۴۰۰	۳۶°۲۲'	۵۳°۳۳'	NW, N	۶۰	۸۰	مدیریت نشده
نکا	۹۰۰	ن-۹۰۰	۳۶°۲۹'	۵۳°۲۷'	NW, N	۷۲	۹۰	مدیریت شده *
سنگده	۱۴۰۰	س-۱۴۰۰	۳۶°۰۳'	۵۳°۱۴'	W, SW	۷۱	۷۰	مدیریت شده *
خیرود	۱۲۰۰	خ-۱۲۰۰	۳۶°۳۲'	۵۱°۳۹'	SE	۷۶	۹۰	مدیریت شده **
اسالم	۶۰۰	الف-۶۰۰	۳۷°۴۱'	۴۸°۴۸'	N	۳۷	۷۰	مدیریت شده *

* مدیریت به روش پناهی، ** مدیریت تحت برش‌های آزادسازی

جدول ۲- ویژگی‌های چهار مارکر میکروساتلایت هسته‌ای (۳۰) به کار رفته برای بررسی تمایز درختان بدفرم و خوش‌فرم راش

لوکوس	توالی پرایمر 5'-3'	دمای اتصال	غلظت MgCl ₂	تکرار	اندازه آلل‌های مشاهده شده	تعداد آلل‌ها	Gene Bank Accession no.
FS1-15	TCAAACCCAGTAAATTTCTCA GCCTCAATGAACTCAAAAAC	۶۰	۲۵	(GA) ₂₆	۸۳-۱۳۳	۱۲	AF528095
FS1-03	CACAGCTTGACACATTCCAAC TGGTAAAGCACTTTTTCCCACT	۶۰	۱۵	(GA) ₁₈	۸۶-۱۱۲	۱۲	AF528090
FS1-11	TGAATTCAATCATTGACCATTTC GGAAGGGTGCTTCAATTTGG	۶۳	۲۵	(GA) ₁₅	۹۸-۱۲۰	۹	AF528091
FS3-04	AGATGCACCACTTCAAATTC TCTCCTCAGCAACATACCTC	۶۰	۱۵	(GCT) ₅ (GTT) ₃ (GCT) ₆	۱۹۲-۲۰۴	۴	AF528092

جاکارد^۱ و برای تعیین ادغام گروه‌ها از روش UPGMA استفاده شد.

داده‌های مولکولی: پس از اینکه برای هر فرد، ژنوتیپ‌های دیپلوئید شماره‌گذاری و فراوانی‌های آللی محاسبه شد، بررسی تمایز ژنتیکی درختان خوش‌فرم و بدفرم راش توسط نرم‌افزار GeneAlex (Peakal & Smouse, 2006) با معیارهای زیر انجام گرفت: میانگین تعداد آلل بر لوکوس (N_a)، تعداد آلل‌های نادر (N_r)، تعداد مؤثر آلل‌ها (N_e)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار از معادله هاردی-وینبرگ (H_e)، ضریب لقاح درون گروهی یا اندیکس ثبوت^۲ F_{is} . انحراف فراوانی‌های ژنوتیپی از نسبت‌های هاردی-وینبرگ با استفاده از نرم‌افزار

- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مورفولوژیکی: مقادیر آماری صفات اندازه‌گیری شده برای طول، قطر و وزن فندقه، وزن بذر و وزن پوسته، شامل میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات با نرم‌افزار Excel محاسبه شد. تجزیه واریانس داده‌های صفات مورفولوژیکی برای رویشگاه‌های مورد بررسی و نیز بین درختان خوش‌فرم و بدفرم انجام گرفت و سپس مقایسه میانگین‌های صفات برای رویشگاه‌های مورد بررسی به روش آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد با نرم‌افزار SAS نسخه ۶/۲ صورت پذیرفت. اطلاعات حاصل از صفات اندازه‌گیری شده برای درختان خوش‌فرم و بدفرم توده‌های مختلف راش با روش آماری چندمتغیره تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2004) مورد تحلیل قرار گرفت. برای بررسی تشابه ژنتیکی فاصله بین افراد از ضریب

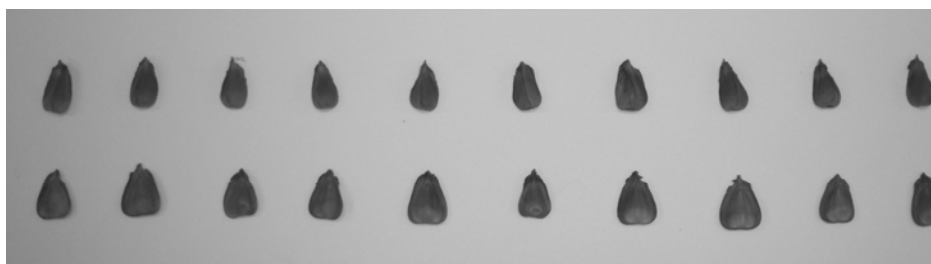
1- Jacard

2- Fixation Index

permutation (Excoffier *et al.*, 1992) بررسی شد. به منظور تعیین رابطه همبستگی بین جفت فواصل ژنتیکی، مورفولوژیکی و جغرافیایی از آزمون (Mantel 1967) و نرم افزار GeneAlex استفاده شد.

نتایج

- ویژگی‌های مورفولوژیکی
درخت راش دارای فندقه کوچک سه گوش به طول ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر است که به صورت تکی یا جفتی در گریبان خاگردار به طول ۱/۵ تا ۲/۵ سانتی‌متر قرار می‌گیرد و به طور معمول حاوی یک بذر است. در موارد استثنا، شکل مسطح فندقه نیز مشاهده شده است. تنوع محسوسی در اندازه و وزن فندقه و بذر در میان فندقه‌های یک درخت و نیز میان درختان یک رویشگاه دیده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱- نمای دو ردیف بذر، هر ردیف متعلق به یک درخت و دو درخت متعلق به یک توده

اسالم-۶۰۰) تا ۱۰/۳ میلی‌متر (درختان بدفرم اسالم-۶۰۰)؛ و وزن فندقه از ۱۶۶ (درختان خوش‌فرم اسالم-۶۰۰) تا ۲۴۲ میلی‌گرم (درختان خوش‌فرم نکا-۱۴۰۰) متغیر بود. سنگین‌ترین بذر و فندقه متعلق به درختان خوش‌فرم نکا-۱۴۰۰؛ بلندترین فندقه از درختان بدفرم خیرود-۱۲۰۰ و پهن‌ترین فندقه متعلق به درختان اسالم-۶۰۰ بود.

نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌های صفات مورفولوژیکی نشان داد بین رویشگاه‌های مورد بررسی از نظر صفات وزن و طول فندقه، وزن بذر و وزن پوسته، اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ وجود دارد (جدول ۳). درحالی‌که بین درختان خوش‌فرم و بدفرم به لحاظ صفات مورفولوژیکی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. آزمون مقایسه میانگین‌های صفات مورفولوژیکی برای رویشگاه‌های

GENEPOP نسخه 3.4D (Raymond & Rousset, 1995) به دست آمد. آنالیز مقایسه میانگین با تی تست جفتی برای بررسی اختلافات آماره‌های تنوع ژنتیکی بین گروه‌های درختان بدفرم و خوش‌فرم توده‌های مختلف با نرم‌افزار spss انجام شد. شباهت ژنتیکی میان جمعیت‌ها بر اساس معادله (Nei 1978) برآورد شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS-pc و روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (Gower, 1966) با استفاده از داده‌های حاصل از ماتریکس شباهت ژنتیکی انجام شد. ساختار ژنتیکی جمعیتی کل نمونه‌ها با استفاده از گوناگونی در میان کل جمعیت‌ها (Fst) و تسهیم گوناگونی ژنتیکی میان گروهی با استفاده از آزمون واریانس مولکولی (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) توسط نرم‌افزار (ARLEQUIN) (Schnieder *et al.*, 1997; Schnieder *et al.*, 2000) محاسبه شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون

با توجه به گوناگونی در اندازه و وزن فندقه و بذر، برای بررسی وجود ارتباط گوناگونی آنها با فرم درخت و نیز نوع رویشگاه، بررسی ۶ توده گرگان-۶۰۰، نکا-۱۴۰۰، نکا-۹۰۰، سنگده-۱۴۰۰، خیرود-۱۲۰۰ و اسالم-۶۰۰ (جدول ۱) انجام گرفت و به طور متوسط ۱۰ درخت بدفرم (چنگالی) و خوش‌فرم (میانرو) انتخاب و ویژگی‌های کمی آنها اندازه‌گیری شد. گستره میانگین وزن پوسته فندقه از ۷۲/۷ (درختان بدفرم نکا-۹۰۰) تا ۹۰/۴ میلی‌گرم (درختان خوش‌فرم نکا-۱۴۰۰)؛ وزن بذر از ۹۰/۴ (درختان خوش‌فرم اسالم-۶۰۰) تا ۱۵۱/۷ میلی‌گرم (درختان خوش‌فرم نکا-۱۴۰۰)؛ طول فندقه از ۱۵/۴ (درختان خوش‌فرم اسالم-۶۰۰) تا ۱۷/۹ میلی‌متر (درختان بدفرم خیرود-۱۲۰۰)؛ قطر فندقه از ۷/۷ (درختان خوش‌فرم

مورد بررسی نشان داد رویشگاه نکا- ۱۴۰۰ با ۸۶/۵ میلی گرم وزن پوسته فندقه، ۱۴۱/۱۸ میلی گرم وزن بذر و نیز ۲۲۷/۷۱ میلی گرم وزن فندقه در گروه اول قرار می‌گیرد (جدول ۴). از نظر طول فندقه رویشگاه خیرود- ۱۲۰۰ با ۱۷/۵۲ میلی متر در گروه اول و رویشگاه نکا- ۱۴۰۰ با ۱۶/۶۲ میلی متر در گروه سوم قرار دارد. به لحاظ قطر فندقه نیز اختلاف معنی داری میان رویشگاه‌های مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده بذر راش در هر یک از رویشگاه‌های مورد بررسی بر اساس فرم تنه

میانگین مربعات صفات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن پوسته فندقه	وزن بذر	طول فندقه	قطر فندقه	وزن فندقه
رویشگاه	۵	۱۳۱۵/۸۰**	۱۲۸۶۴/۸۴**	۳۳/۷۱**	۱۳/۱۰ ns	۱۶۸۵۲/۵۱**
فرم درخت (خوش فرم و بدفرم)	۱	۱۷۸/۲۲ ns	۲۴۸۸/۵۳ ns	۱/۲۰ ns	۴/۷۷ ns	۱۳۳۴/۸۲ ns
اثر متقابل رویشگاه × فرم درخت	۵	۹۶۶/۳۵**	۸۵۴۴/۰۵**	۹/۷۸**	۳۲/۶۹*	۱۴۷۸۹/۰۷**
خطا	۵۷۸					

** و * به ترتیب معنی دار در سطح ۱ درصد و ۵ درصد، ns غیر معنی دار

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده بذر راش در هر یک از رویشگاه‌های مورد بررسی به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (سطح معنی داری ۰/۰۵ احتمال)

میانگین صفات					رویشگاه
وزن پوسته فندقه (میلی گرم)	وزن بذر (میلی گرم)	طول فندقه (میلی متر)	قطر فندقه (میلی متر)	وزن فندقه (میلی گرم)	
۸۲/۳۶ ab	۱۲۶/۲ b	۱۶/۹۱ bc	۸/۳۵ a	۲۰۸/۵۶ bc	گ-۶۰۰
۸۶/۵۳ a	۱۴۱/۱۸ a	۱۶/۶۲ c	۸/۸ a	۲۲۷/۷۱ a	ن-۱۴۰۰
۷۵/۷۹ c	۱۳۰/۴۵ b	۱۶/۹۸ bc	۸/۰۵ a	۲۰۶/۲۴ bc	ن-۹۰۰
۷۹/۲۶ bc	۱۱۷/۲۶ c	۱۷/۰۹ b	۸/۲۸ a	۱۹۶/۵۲ cd	س-۱۴۰۰
۷۹/۱ bc	۱۳۱/۶۶ b	۱۷/۵۲ a	۸/۸۲ a	۲۱۰/۷۶ b	خ-۱۲۰۰
۸۰/۹۵ b	۱۰۷/۱۳ d	۱۵/۶۷ d	۸/۹۹ a	۱۸۸/۰۸ d	الف-۶۰۰

نشانه‌های مورد استفاده است که برای برآورد شاخص‌های ژنتیکی از آنها استفاده شد. مقایسه میانگین تعداد آلل‌ها در لوکوس، تعداد آلل‌های نادر و عمومی و برآوردهای تنوع ژنتیکی در میان توده‌های مختلف یا خانواده‌های بدفرم و خوش فرم درختان در جدول ۵ نشان داده شده است. میانگین تعداد آلل در لوکوس از ۵ آلل در خانواده درختان خوش فرم توده نکا-۹۰۰ تا ۸ آلل در خانواده درختان بدفرم توده گرگان-۶۰۰ متغیر بود.

- ویژگی‌های مولکولی

در شش توده گرگان-۶۰۰، نکا-۱۴۰۰، نکا-۹۰۰، سنگده-۱۴۰۰، خیرود-۱۲۰۰ و اسالم-۶۰۰، بذرها درختان بدفرم و خوش فرم با استفاده از چهار میکروساتلایت هسته‌ای (جدول ۲) بررسی شد و در کل ۳۷ آلل متفاوت در چهار میکروساتلایت هسته‌ای F1-03، F1-11، F3-04 و FS1-15 مشاهده شد که حاکی از پلی مورفیسم بالا

انتظار (He)، اختلاف بیشتری بین خانواده‌های درختان خوش‌فرم و بدفرم هر توده نشان دادند. مقایسه میانگین با آزمون t جفتی برای هر شش توده مورد بررسی، اختلافات معنی‌داری بین گروه‌های درختان بدفرم و خوش‌فرم از نظر تعداد آلل در لوکوس ($p=0/935$)، تعداد مؤثر آلل ($P=0/810$)، اندیکس شانون ($p=0/686$)، هتروزیگوزیتی مورد انتظار ($p=0/620$)، هتروزیگوزیستی مشاهده‌شده ($p=0/711$) و اندیکس ثبوت ($p=0/093$)، نشان نداد.

همه توده‌ها تنوع ژنتیکی زیادی نشان دادند. مقدار میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۴۰ (سنگده-۱۴۰۰) تا ۰/۵۹ در اسالم-۶۰۰ متغیر بود. از شش توده مورد بررسی، در سه توده (گرگان-۶۰۰، نکا-۹۰۰ و خیرود-۱۲۰۰) تفاوتی از نظر هتروزیگوسیتی بین درختان بدفرم و خوش‌فرم وجود نداشت، در دو توده (نکا-۱۴۰۰ و اسالم-۶۰۰) تنوع درختان خوش‌فرم و فقط در یک توده (سنگده-۱۴۰۰) تنوع درختان بدفرم، بیشتر بود. از میان مقادیر برآوردهای مختلف تنوع ژنتیکی، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) نسبت به اندیکس شانون و هتروزیگوسیتی مورد

جدول ۵- برخی ویژگی‌های ژنتیکی بذرهای گروه‌های خوش‌فرم و بدفرم توده‌ها، بر اساس لوکوس‌های میکروساتلایت هسته‌ای

توده	گرگان	گرگان	نکا	نکا	نکا	نکا	سنگده	سنگده	خیرود	خیرود	اسالم	اسالم
ارتفاع	۶۰	۶۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۴۰	۱۲۰	۱۲۰	۶۰	۶۰
فرم تنه درختان	خوش‌فرم	بدفرم	خوش‌فرم	بدفرم	خوش‌فرم	بدفرم	خوش‌فرم	بدفرم	خوش‌فرم	بدفرم	خوش‌فرم	بدفرم
کد	G-1-600	G-2-600	N-1-1400	N-2-1400	N-1-900	N-2-900	S-1-1400	S-2-900	K-1-1200	K-2-1200	A-1-600	A-2-600
تعداد آلل در لوکوس	۶/۰۰	۸/۰۰	۷/۲۵	۵/۷۵	۵/۰۰	۶/۵۰	۶/۲۵	۷/۲۵	۷/۵۰	۶/۲۵	۶/۷۵	۵/۲۵
تعداد آلل‌های عمومی	۳/۰۰	۳/۷۵	۳/۵۰	۲/۷۵	۳/۵۰	۲/۷۵	۲/۵۰	۳/۲۵	۳/۷۵	۲/۷۵	۳/۷۵	۳/۰۰
تعداد آلل‌های مؤثر	۲/۵۷	۲/۸۹	۲/۶۶	۲/۴۵	۲/۷۲	۲/۵۴	۱/۸۱	۲/۶۵	۲/۵۸	۲/۵۲	۲/۹۲	۱/۹۶
اندیکس شانون	۱/۱۷	۱/۲۹	۱/۱۸	۱/۰۲	۱/۰۶	۱/۱۰	۰/۸۸	۱/۲۳	۱/۲۵	۱/۰۸	۱/۲۵	۰/۹۰
تعداد آلل‌های نادر	۰/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۳/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
Fis	۰/۰۶	-۰/۰۱	-۰/۰۸	-۰/۰۷	-۰/۰۵	-۰/۰۲	-۰/۰۲	-۰/۱۱	۰/۰۴	-۰/۱۱	-۰/۰۱	-۰/۱۲
Ho	۰/۵۴	۰/۵۷	۰/۶۰	۰/۵۴	۰/۵۶	۰/۵۳	۰/۴۱	۰/۴۰	۰/۵۵	۰/۶	۰/۶	۰/۴۹
He	۰/۵۹	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۵۱	۰/۵۵	۰/۵۶	۰/۴۰	۰/۵۸	۰/۵۶	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/۴۴

۶۰۰، ۰/۱۹۸ در اسالم-۶۰۰ و ۰/۱۹۹ در نکا-۹۰۰ تا ۰/۲۱۷ در سنگده-۱۴۰۰ متغیر بود. در همه موارد اندیکس‌های تمایز ژنتیکی از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نسبت به صفر داشتند ($p > 0/001$). مقایسه گروه‌های خوش‌فرم و بدفرم هر توده به وسیله تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تمایز ژنتیکی در میان

- تمایز ژنتیکی بذور درختان خوش‌فرم و بدفرم بر اساس داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی بررسی تمایز ژنتیکی گروه‌های درختان خوش‌فرم و بدفرم هر توده، حاکی از تمایز ژنتیکی محسوس در این گروه‌ها در هر توده است، به طوری که مقدار F_{st} که معیار بررسی تمایز ژنتیکی است، از ۰/۱۲۲ در نکا-۱۴۰۰، ۰/۱۹۲ در گرگان-

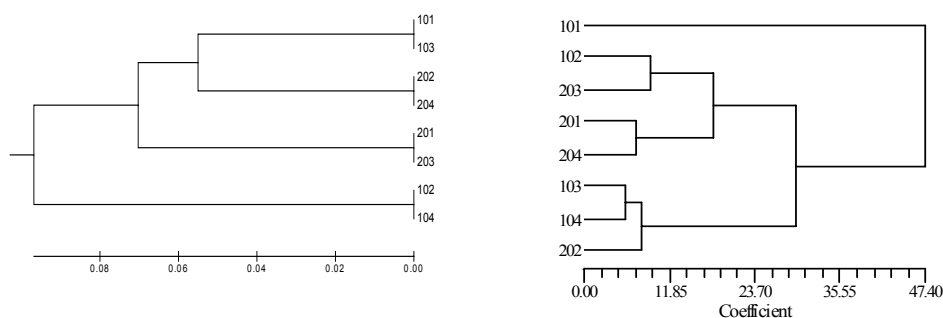
دیگر جمعیت‌ها جدا شدند. به‌همین ترتیب دو جمعیت یادشده به‌وسیله مؤلفه اصلی دوم از یکدیگر متمایز شدند. نمودار تشکیل‌شده نشان‌دهنده تطابق نسبی تمایز ژنتیکی با فاصله جغرافیایی است. تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA بر مبنای هر پنج صفت مورفولوژیکی اندازه‌گیری‌شده در هر توده نیز انجام گرفت (منحنی‌های سمت راست شکل‌های ۲ تا ۷). در همه جمعیت‌ها به جز جمعیت خیرود-۱۲۰۰، گروه‌بندی متمایزی بین درختان خوش‌فرم و بدفرم مشاهده نشد. از فاصله مورفولوژیکی بین جمعیت‌ها برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد (نمودار بالا شکل ۸). سه مؤلفه اول ۷۵ درصد واریانس‌ها را به خود اختصاص دادند. بررسی الگوی تمایز جمعیت‌های مورد بررسی بر اساس صفت مورفولوژیکی، تمایزی از نظر فرم درخت یا موقعیت جغرافیایی توده‌ها نشان نداد.

گروه‌های مذکور توده‌های اسالم-۶۰۰ و خیرود-۱۲۰۰ از نظر آماری معنی‌دار است (جدول ۶). برای تشریح الگوی تمایز، از فاصله ژنتیکی بر اساس برآورد unbiased (Nei, 1978) بین خانواده‌های درختان خوش‌فرم و بدفرم راش استفاده شد. همچنین از فاصله ژنتیکی در تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA استفاده شد. منحنی‌های تشکیل‌شده نشان داد در دو توده (اسالم-۶۰۰ و خیرود-۱۲۰۰)، درختان بدفرم و خوش‌فرم در خوشه‌های جداگانه دسته‌بندی می‌شوند که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی درختان خانواده‌های بدفرم و خوش‌فرم است (منحنی‌های سمت چپ شکل‌های ۲ تا ۷). از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد (نمودار پایین شکل ۸). سه مؤلفه اول ۸۴ درصد واریانس‌ها را به خود اختصاص دادند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، گروه‌های خوش‌فرم و بدفرم جمعیت‌های اسالم و خیرود به‌وسیله مؤلفه اصلی اول از

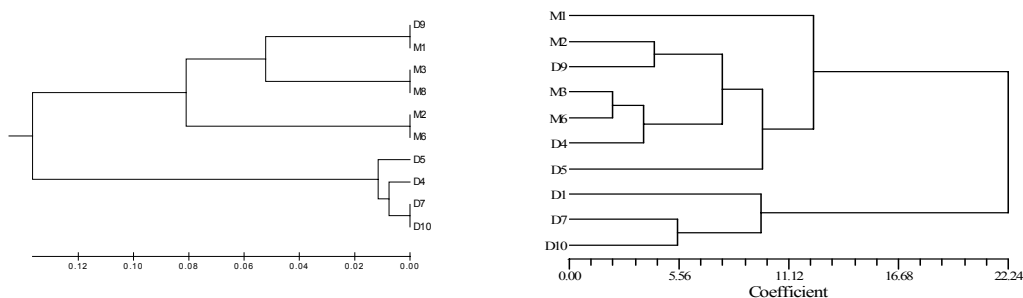
جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های میکروساتلایت‌های هسته‌ای بذورهای درختان خوش‌فرم و بدفرم جمعیت‌های مورد بررسی

Prob. احتمال	درصد واریانس	مجموع مربعات	درجه آزادی	گ-۶۰۰
۰/۲۷۴	۰/۸۹	۴/۰۳۶ns	۱	۶۰۰-گ
۰/۲۵۳	۰/۵۵	۲/۷۳۶ns	۱	۱۴۰۰-ن
۰/۶۴۲	۰/۰۲	۲/۸۳۶ns	۱	۹۰۰-ن
۰/۲۷۱	۰/۷۴	۲/۲۷۹ns	۱	۱۴۰۰-س
۰/۰۱۱	۱۲/۰۹	۹/۹۵۷*	۱	۱۲۰۰-خ
۰/۰۲۰	۷/۳۳	۸/۰*	۱	۶۰۰-الف

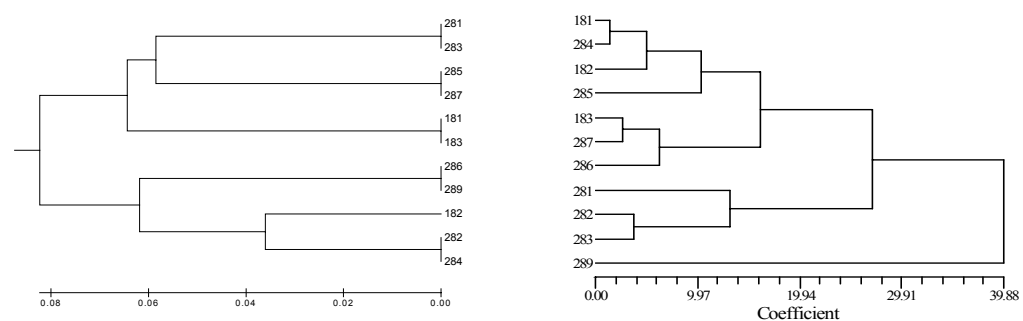
* معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ns غیر معنی‌دار



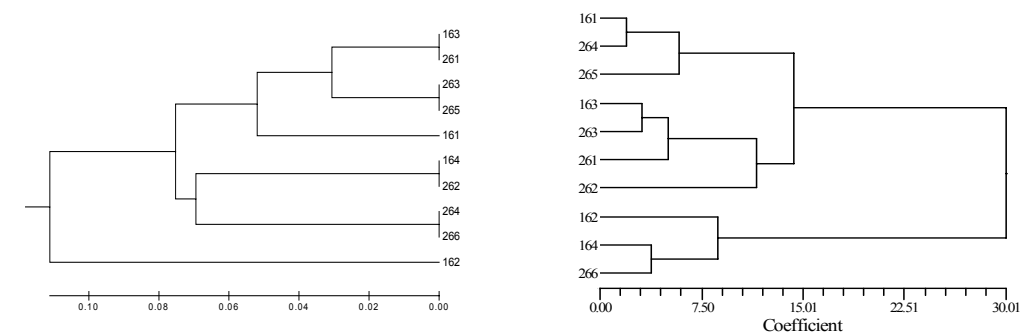
شکل ۲- دندروگرام درختان خوش‌فرم (۱۰۱ تا ۱۰۴) و بدفرم (۲۰۱ تا ۲۰۴) حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل چپ) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل راست) بذرها در توده اسالم-۶۰۰



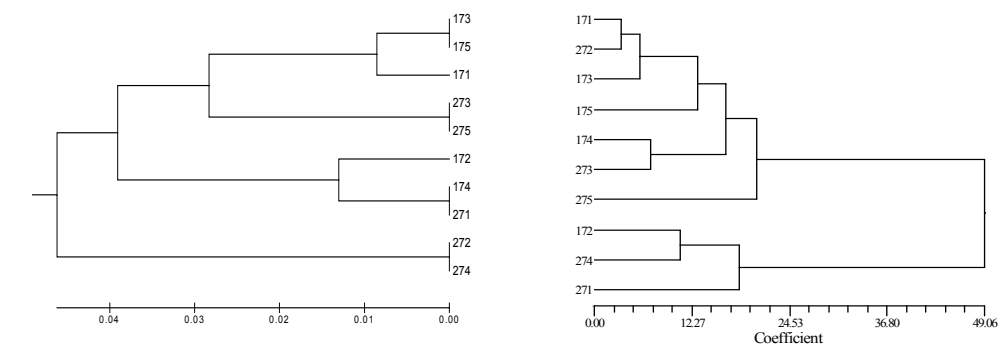
شکل ۳- دندروگرام درختان خوش‌فرم (با پیشوند M) و بدفرم (با پیشوند D) حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل چپ) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل راست) بذرها در توده خیرود-۱۲۰۰



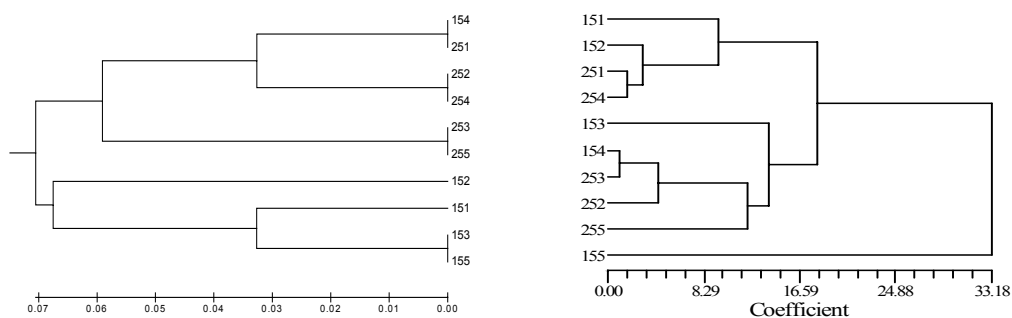
شکل ۴- دندروگرام درختان خوش‌فرم (۱۸۱ تا ۱۸۳) و بدفرم (۲۸۱ تا ۲۸۹) حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل چپ) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل راست) بذرها در توده گرگان-۶۰۰



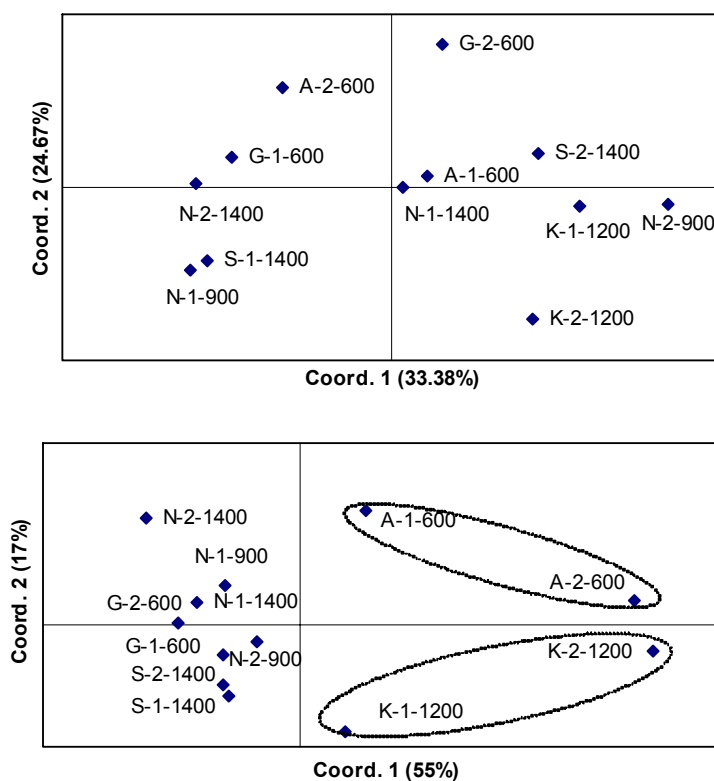
شکل ۵- دندروگرام درختان خوش‌فرم (۱۶۱ تا ۱۶۴) و بدفرم (۲۶۱ تا ۲۶۶) حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل چپ) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل راست) بذرها در توده نکا-۹۰۰



شکل ۶- دندروگرام درختان خوش‌فرم (۱۷۱ تا ۱۷۵) و بدفرم (۲۷۱ تا ۲۷۵) حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل چپ) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل راست) بذرها در توده نکا-۱۴۰۰



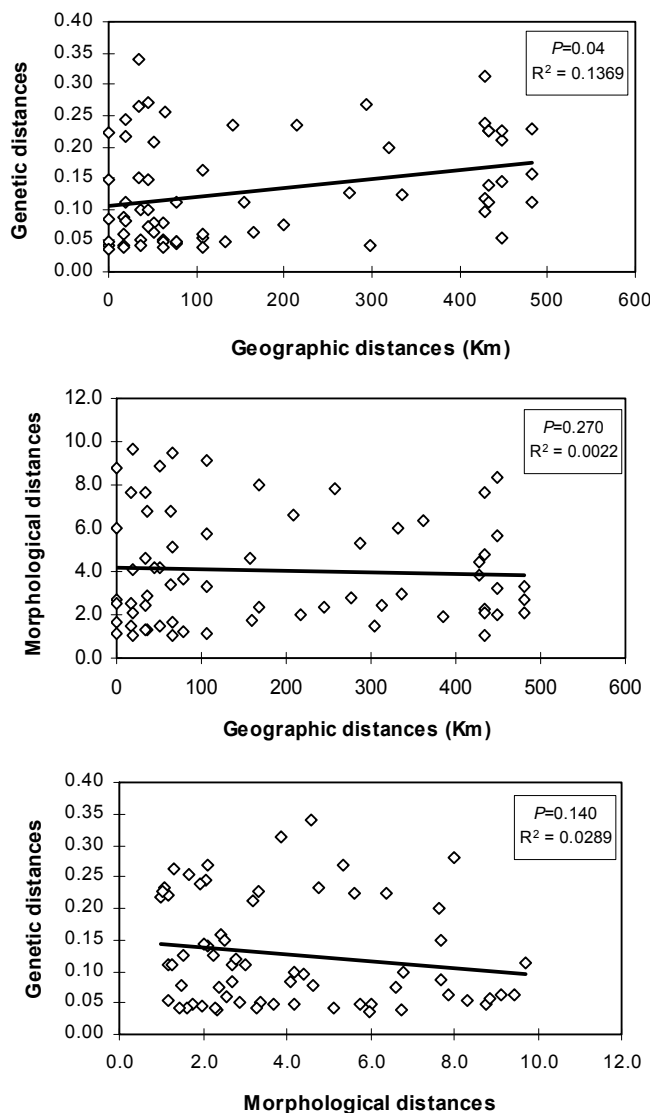
شکل ۷- دندروگرام درختان خوش‌فرم (۱۵۱ تا ۱۵۵) و بدفرم (۲۵۱ تا ۲۵۵) حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل چپ) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل راست) بذرها در توده سنگه-۱۴۰۰



شکل ۸- نمودار رسته‌بندی مناطق مورد بررسی حاصل از مقادیر داده‌های Fst میکروساتلایت‌های هسته‌ای (شکل پایین) و ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل بالا) بذرها

مشاهده شد، درحالی‌که همبستگی بین فاصله‌های مورفولوژی و جغرافیایی بسیار کم و منفی بود که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار نبود ($P=0/270$, $R^2=0/002$). همبستگی بین فاصله‌های دو نشانگر ژنتیکی و مورفولوژی بسیار کم و منفی بود ($P=0/140$, $R^2=0/028$).

- همبستگی فاصله‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی و جغرافیایی ضرایب همبستگی جفت ماتریس‌های فاصله ژنتیکی، مورفولوژی و جغرافیایی جمعیت‌ها و نیز گروه‌های خوش‌فرم و بدفرم با استفاده از آزمون Mantel محاسبه شد (شکل ۹). همبستگی مثبت بسیار کم، ولی معنی‌داری بین فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی ($P=0/04$, $R^2=0/136$)



شکل ۹- همبستگی بین فواصل ژنتیکی، مورفولوژیکی و جغرافیایی نمونه‌های مورد بررسی

بحث

- بررسی ساختار جغرافیایی در ویژگی‌های مورفولوژیکی و ژنتیکی

تمایز درون‌گونه‌ای ویژگی‌های مورفولوژیکی جمعیت‌های گیاهی که در شرایط رویشگاهی متفاوت رشد می‌کنند، پدیده‌ای است که اغلب مشاهده می‌شود (Lotz *et al.*, 1990; Petit & Thompson, 1998; Szczepaniak, 2002; Krzakowa *et al.*, 2003; Altschuler & Schipunov, 2005; Halpern, 2005; Goulart *et al.*, 2006). Sukowska (1998) با اجرای آزمون‌های پرووانس مختلف در لهستان، سه اکوتیپ مختلف را بر اساس ارتفاع رویشگاه‌های مختلف راش شناسایی و بر ارتباط فرایند

انتخاب طبیعی با شرایط آب و هوایی رویشگاه تأکید کردند. (Goulart *et al.*, 2006). بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی میوه و بذر در *Plathymenia reticalata* اکوتیپ‌های متمایزی را در گستره پراکنش این گونه در آمریکای لاتین پیدا کردند. از این‌رو در این پژوهش، گوناگونی مورفولوژیکی بذر و فندقه راش برای مطالعه فرضیه فشارهای انتخابی رویشگاه در گستره پراکنش راش در جنگل‌های خزری بررسی شد. اختلافات محیطی زیادی به‌ویژه در مقدار بارندگی، رطوبت هوا، نوع هوموس و سنگ مادری از شرق به غرب جنگل‌های خزری وجود دارد (مروی مهاجر، ۱۳۵۵؛ پارسا پژوه، ۱۳۵۵؛ حبیبی، ۱۳۶۴). گوناگونی محیطی کلینال است و روندی از غرب به شرق

چنین پدیده‌ای را تصادفی دانست و عدم مشاهده تمایز در چهار جمعیت دیگر را می‌توان به وسیله انتخاب نادرست درختان بدفرم تفسیر کرد. زیرا اگر بدفرمی درخت ناشی از چرای دام یا شکستگی بر اثر عوامل مختلف باشد، نمی‌توان درختان یادشده را در گروه متفاوتی از درختان خوش‌فرم قرار داد. مشاهده مقادیر قابل توجه F_{st} در نتایج بررسی با نشانگرهای میکروساتلایتی تا حدودی نشان داد تنوع ژنتیکی به صورت همگن در توده‌های مورد بررسی توزیع نشده است و یافته‌های حاصل از تمایز بذرهای درختان خوش‌فرم و بدفرم به سختی می‌تواند انتشار تصادفی آلل‌ها را به وسیله بذر و گرده توضیح دهد. با وجود قابلیت زیاد جریان گرده در گونه‌های بادگرده‌افشان (برای به هم ریختن تمایز ژنتیکی مکانی) نتایج این تحقیق حاکی از وجود تمایز ژنتیکی مکانی در توده‌های مختلف مورد بررسی بود. از آنجا که اثر بخشی انتشار گرده راش محدود به فاصله‌های نزدیک است (Wang & Szmidi, 2001)، الگوی مکانی گروهی آلل‌ها می‌تواند تمایز مشاهده شده را توضیح دهد. این نتایج با یافته‌های Vornam *et al.* (2004) مطابقت دارد. پیش از این هم تحقیقات نشان داده‌اند که برخلاف طبیعت سیستم تولیدمثلی درختان جنگلی باد-گرده‌افشان، تولیدمثل راش بین افراد نزدیک هم روی می‌دهد و ساختار ژنتیکی‌شان به خوبی توسط مدل "جداشدگی به وسیله فاصله" (Wright, 1943; Wright, 1946) قابل توضیح است. به عبارت دیگر، جریان ژن محدود از راه انتشار بذر و گرده و ترجیحی بودن سیستم تولید مثلی بین درختان مجاور محتمل‌ترین دلایل چنین ساختاری می‌تواند باشد (Asuka *et al.*, 2004; Bacilieri *et al.*, 1994; Heuertz *et al.*, 2003; Jump & Peñuelas, 2007; Streiff *et al.*, 1998). نتایج این تحقیق با یافته‌های Dounavi (2000) مغایرت دارد که با بررسی نه لوکوس ژنی آنزیمی و چهار پرایمر میکروساتلایتی پلی‌مورف در درختان بدفرم و خوش‌فرم سه توده راش اروپا در آلمان نتوانست شواهدی از ارتباط بدفرم شدن با الگوهای نشانگرهای بررسی شده پیدا کند. او این مسئله را به خنثی بودن نشانگرهای یادشده نسبت می‌دهد. ولی نتایج پژوهش حاضر با تمایز کردن درختان

جنگل‌های خزری دارد، ولی همبستگی بسیار کمی (در حد صفر) بین فاصله جغرافیایی و ویژگی‌های بذر و فندقه راش مشاهده شد که از نظر آماری نیز معنی‌دار نبود ($P=0/270$, $R^2=0/02$). در تأیید این مسئله نمودار رسته‌بندی جمعیت‌ها و گروه‌های مختلف درختان خوش‌فرم و بدفرم حاصل از ویژگی‌های مورفولوژیکی بذر و فندقه راش، گروه‌بندی مشخصی از نظر مناطق اکولوژیکی ارائه نداد، به طوری که گروه درختان خوش‌فرم گران-۶۰۰ و اسالم-۶۰۰ که هم از نظر مکانی (در دو سوی مقابل جنگل‌های خزری قرار دارند) و هم از نظر ارتفاعی، تفاوت بسیاری دارند، با شباهتی در حد ۹۰ درصد در یک گروه قرار گرفته‌اند. گروه‌بندی مشخصی از نظر فرم درخت نیز مشاهده نشد. اگرچه در گونه‌های چوبی با دیرزیستی زیاد، دامنه جغرافیایی بهترین شاخص تنوع ژنتیکی است (Hamrick *et al.*, 1992)، قرارگیری جمعیت‌هایی که از لحاظ اکولوژیکی بسیار شبیه‌اند، در گروه‌های جداگانه بسیار بحث‌برانگیز است. این نتایج نشان می‌دهد گوناگونی ویژگی‌های مورفولوژیکی بذرها و فندقه‌های راش، ناشی از شرایط اکولوژیکی نیست. برخلاف ویژگی‌های مورفولوژیکی بذر و فندقه راش که با فاصله جغرافیایی همبستگی نشان ندادند، ویژگی‌های ژنتیکی (بر اساس ماکروساتلایت‌ها) همبستگی بیشتری با فاصله جغرافیایی داشتند که از نظر آماری نیز معنی‌داری بود ($P=0/04$, $R^2=0/136$). وجود اطلاعات جغرافیایی در ویژگی‌های ژنتیکی پیش از این در یافته‌های Bueteveld *et al.* (2007) که درباره تنوع و تمایز ژنتیکی توده‌های راش اروپایی کار کردند، نیز گزارش شده بود.

- بررسی تمایز فرم درختان به وسیله ویژگی‌های مورفولوژیکی و ژنتیکی

از میان شش جمعیت بررسی شده از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی، فقط در جمعیت خیرود-۱۲۰۰، درختان خوش‌فرم و بدفرم از هم متمایز شدند، همچنین از لحاظ ویژگی‌های ژنتیکی در دو جمعیت اسالم-۶۰۰ و خیرود-۱۲۰۰ بین درختان خوش‌فرم و بدفرم تمایز محسوسی مشاهده شد. از آنجا که تمایز در گروه درختان خوش‌فرم و بدفرم در دو جمعیت مشاهده شده است، نمی‌توان وقوع

کمی (QTLs) است و از آنها برای تهیه نقشه‌های لینکاژ در گونه‌های درختی استفاده می‌شود (Scafli *et al.*, 2004). وجود ارتباط بین زمان شروع رویش فرم‌های فنولوژیکی راش (که ویژگی‌های سازگاری هستند) با گوناگونی ژنتیکی مناطق غیر کدشونده ژنوم از آن نظر بسیار جالب و با ارزش است که می‌تواند تأییدی بر ارتباطی باشد که در پژوهش حاضر بین بدفرمی درخت (به‌عنوان ویژگی سازگاری) در برخی توده‌های راشستان‌های طبیعی و ساختار ژنتیکی ماکروساتلایت‌های مورد بررسی، به‌دست آمده است. ویژگی‌های مورفولوژیکی به‌علت ساده و سریع بودن، هنوز یکی از مهم‌ترین نشانگرهای ارزیابی اولیه گیاهان هستند (Beyene *et al.*, 2005)، ولی از آنجایی که گروه‌بندی فرم‌های خوش‌فرم و بدفرم راش به‌وسیله ویژگی‌های مورفولوژیکی، تنها در یک جمعیت مشاهده شد، نمی‌توان با اطمینان از وجود ارتباط ویژگی‌های بذر و فندقه با فرم درخت صحبت کرد. این پدیده دلالت بر کارایی کمتر ویژگی‌های مورفولوژیکی نسبت به ویژگی‌های ژنتیکی در بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها است. در این زمینه، همبستگی بسیار ضعیفی بین فاصله‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی ($R^2=0/028$ ، $P=0/140$) مشاهده شد که قابل چشم‌پوشی نیست. چنین ناهمگونی‌هایی از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها توسط ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی در مطالعات بسیاری نشان داده شده است به‌طوری‌که (Andrew *et al.*, 2003)، با بررسی ویژگی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی جمعیت‌های مختلف آکاسیا (*Acacia aneura*) نشان دادند که گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ماکروساتلایت‌ها منطبق بر ویژگی‌های مورفولوژیکی نیست. (Bruschi *et al.*, 2003)، با بررسی جمعیت‌های مختلف بلوط (*Quercus petraea*) نیز نتوانستند هیچ شباهتی بین گروه‌بندی‌های حاصل از ویژگی‌های مورفولوژیکی و ژنتیکی پیدا کنند. بنابراین نتایج این تحقیق حاکی از اهمیت انتخاب نشانگر و کارایی به‌نسبت بیشتر نشانگرهای میکروساتلایتی در بررسی فرم‌های مورفولوژیکی راش است.

سپاسگزاری

بدفرم و خوش‌فرم در برخی توده‌های طبیعی راش، تأییدی بر اهمیت نوع نشانگر و تأییدی بر کارایی نسبی نشانگرهای میکروساتلایتی مطالعه‌شده در بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی سازگاری و ژنتیکی بودن ویژگی فرم درخت است. این نتایج در توافق با تحقیقات آزمون نتاج و استانی است که نشان داده‌اند راش به دماهای خیلی کم زمستانه (حتی در مرحله بلوغ) حساس است (Pukacki, 1990). این حساسیت در مرحله نهالی بیشتر نمایان می‌شود، به‌طوری‌که نهال‌های راش به سرمای دیررس بسیار حساس‌ترند. نهال‌هایی که در اوایل بهار زودتر شکوفا می‌شوند، بیشتر در معرض آسیب سرمازدگی قرار می‌گیرند. این مسئله موجب کاهش ارتفاع درختان (Hristov & Botev, 1981) و بی‌نظمی در فرم تنه (Myczkowski, 1955) می‌شود. از آنجا که زمان شکوفایی جوانه یکی از ویژگی‌های فنوتیپی است که رابطه زیادی با سازگاری درخت داشته و توارث‌پذیری زیادی دارد (Billington & Pelham, 1991; Howe *et al.*, 2000; Saxe *et al.*, 2001; Chmura & Rożkowski, 2002; Ningre & Colin, 2007)، پس درختان بدفرم از لحاظ ژنتیکی باید با درختان خوش‌فرم تفاوت داشته باشند. با توجه به اهمیت زمان شکوفایی جوانه‌های راش در ایجاد بدفرمی تنه، Kraj & Sztorc (2009)، با بررسی شاخص‌های ژنتیکی در فرم‌های فنولوژیکی راش توسط نشانگرهای میکروساتلایتی نشان دادند که فرم‌های راش که شکوفایی دیر هنگام‌تری دارند، احتمال بیشتری برای استمرار بقا در شرایط محیطی نامناسب داشته و گوناگونی ژنتیکی درون جمعیتی بیشتری دارند. برعکس در فرم‌هایی که شکوفایی زود هنگام‌تری دارند و تحت فشارهای محیطی بیشتری واقع اند، گوناگونی ژنتیکی کمتر است. لوکوس‌های میکروساتلایتی نشانگرهایی هستند که به‌طور مستقیم ارتباطی با صفات ژنتیکی ندارند (Holderegger *et al.*, 2006) و در نتیجه اختلافات ژنتیکی حاصل از این نشانگرها که بین فرم‌های فنولوژیکی راش مشاهده می‌شود، نباید اثر مستقیمی بر وضعیت این فرم‌ها داشته باشد. ولی براساس برخی مدارک، ارتباط زیادی بین گوناگونی ژنتیکی خنثی و سازگاری وجود دارد، به‌طوری‌که برخی لوکوس‌های خنثی وابسته به لوکوس‌های ویژگی‌های

growth beech forest revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 13: 1241-1250.

Bacilieri R., T. Labbe & A. Kremer, 1994. Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Leibl and *Quercus robur* L. *Heredity*, 73; 130-141.

Beyene, Y., A.M. Botha & A.A. Myburg, 2005. A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize, *African Journal of Biotechnology*, 4(7): 586-595.

Billington, H.L. & J. Pelham, 1991. Genetic variation in the data of budburst in Scottish birch populations: implications for climate change, *Functional Ecology*, 5: 403-409.

Bruschi P., G.G. Venderamin, F. Bussotti & P. Grossoni, 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany*, 91: 707-716.

Bucheyeki, T.L., C. Gwanama, M. Mgonja, M. Chisi, R. Folkertsma & R. Mutegi, 2009. Genetic variability characterisation of Tanzania sorghum landraces based on simple sequence repeats (SSRs) molecular and morphological markers, *African Crop Science Journal*, 17(2): 71-86

Buiteveld, J., G.G. Vendramin, S. Leonardi, K. Kamer & T. Geburek, 2007: Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history, *Forest Ecology and Management*, 247: 98-106.

Chmura, D.J. & R. Rozkowski, 2002. Variability of beech provenances in spring and autumn phenology, *Silvae Genetica*, 51: 123-127.

Denk, T., 2003. Phylogeny of *Fagus* L. (Fagaceae) based on morphological data, *Plant Systematics and Evolution*, 240: 55-81.

Denk, T., 2004. Revision of *Fagus* from the Cenozoic of Europe and southwestern Asia and its phylogenetic implications, *Documenta Naturae*, 150: 1-72.

Denk, T., G. Grimm, K. Stögerer, M. Langer & V. Hemleben, 2002. The evolutionary history of *Fagus* in western Eurasia: evidence from genes, morphology and the fossil record, *Plant Systematics and Evolution*, 232: 213-236.

Denk, T., G.W. Grimm & V. Hemleben, 2005. Patterns of molecular and morphological differentiation in *Fagus* (Fagaceae): phylogenetic implications, *American Journal of Botany*, 92:1006-1016.

به این وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از آقای دکتر جوزیه جوانی و ندرامین استاد انستیتو اصلاح درختان جنگلی فلورنس ایتالیا که در تدوین این پژوهش از هیچ لطفی دریغ نداشتند، اعلام می‌داریم.

منابع

پارساپژوه، داود، ۱۳۵۵. تحقیق روی کمیت‌های فیزیکی چوب‌های راش ایران در مناطق مختلف رویشی، مجله منابع طبیعی ایران ۳۴: ۲۱-۳۴.

حبیبی، حسین، ۱۳۶۴. مطالعه خاک جنگل‌های راش در ایران و بررسی نقش آن بر توسعه انواع مختلف راش، مجله منابع طبیعی ایران ۳۹: ۶-۱۸.

دلفان ابادری، بهروز، ۱۳۸۱. بررسی مراحل تحولی و روند پویایی در توده‌های طبیعی دخالت‌نشده راش در منطقه کلاردشت، رساله دکتری در رشته جنگلداری، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ص ۱۸۳.

رسانه، یدالله، محمدحسن مشتاق و پرویز صالحی، ۱۳۸۰. بررسی کمی و کیفی جنگل‌های شمال کشور، مجموعه مقالات همایش ملی مدیریت جنگل‌های شمال و توسعه پایدار، صفحات ۵۵-۷۹.

صالحی شانجانی، پروین و خسرو ثاقب‌طالبی، ۱۳۸۳. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، کمی و کیفی توده‌های راش ایران از دیدگاه حفاظت ژن، فصلنامه پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۲(۲): ۱۴۷-۱۸۴.

مروی مهاجر، محمدرضا، ۱۳۵۵. برخی ویژگی‌های کمی جنگل‌های راش ایران، مجله منابع طبیعی ایران، ۳۴: ۳۴-۷۷-۹۷.

Altschuler, E.P. & A.B. Schipunov, 2005. The morphological variability of sedges from *Carex salina* Wahl, (Cyperaceae) group on the White Sea coast. (In Russian). *Vestn Voop*, 10: 1-6.

Andrew, R.L., J.T. Miller, R. Peakall, M.D. Crisp & R.J. Bayer, 2003. Genetic, cytogenetic and morphological patterns in a mixed mulga population: evidence for apomixes, *Australian Systematic Botany*, 16: 80-96.

Asuka, Y., N. Tomaru, N. Nisimura, Y. Tsumura & S. Yamamoto, 2004. Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-

- beech (*Fagus sylvatica* L.), *Annals Forest Science*, 66: 203p1-p7.
- Krzakowa, M., M. Kolodziejczak, M. Drapikowska & H. Jakubiak, 2003. The variability of reed (Poaceae) populations expressed in morphological traits of panicles, *Acta Society Botany Poland*, 72(2): 157-160.
- Lotz, L.A.P., H. Olf & P.H. van Tienderen, 1990. Within-population variability in morphology and life history of *Plantago major* L. ssp. *pleiosperma* Pilger in relation to environment heterogeneity. *Oecologia*, 84(3): 404-410.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Myczkowski, S., 1955. The influence of ecological factors upon the formation of the habit of beech *Fagus sylvatica* L. *Rocznik Sekcji Dendrologicznej Polskiego Towarzystwa Botanicznego*, 10: 233-251.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Ningre, F. & F. Colin, 2007. Frost damage on the terminal shoot as a risk factor of fork incidence on common beech (*Fagus sylvatica* L.), *Annals of Forest Science*, 64: 79-86.
- Pastorelli, R., M.J.M. Smulders, W.P.C. Van't Westende, B. Vosman, R. Giannini, C. Vettori & G.G. Vendramin, 2003. Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky, *Molecular Ecology Notes*, 3: 76-78.
- Peakal, R. & P.E. Smouse, 2006. GenALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Petit, C. & J.D. Thompson, 1998. Phenotypic selection and population differentiation in relation to habitat heterogeneity in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae), *Journal of Ecology*, 86(5): 829-840.
- Pukacki, P., 1990. Resistance to low temperatures, In: S. Białobok, (Ed.), *Buk zwyczajny (Fagus sylvatica* L.) (pp. 185-192). PWN Warszawa Poznań.
- Raymond, M. & F. Rousset, 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism, *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Rohlf, F.J., 2004. NTSYS-PC, version 2.11a. Exeter Software, New York.
- Dounavi, A., 2000. Family structures in beech stands (*Fagus sylvatica*). Dissertation for PhD degree, University of Göttingen.
- Etemad, V. & M.R. Marvi Mohadjer, 2004. Investigation on Quality and Quantity of Seed Production of beech (*Fagus orientalis* Lipsky) in Mazandaran Forests Proceedings from the 7th International Beech Symposium, Tehran, Iran, pp. 189.
- Excoffier, L., P. Smouse & J. Quattro, 1992. Analysis of molecular variances among DNA restriction data, *Genetics*, 131: 479-491.
- Fenner, M. & K. Thompson, 2005. The Ecology of Seeds, Cambridge University Press, pp. 261.
- Goulart, M.F., J.P. Lemos & M.B. Lovato, 2006. Variability in fruit and seed morphology among and within populations of *Plathymenia* in areas of the Cerrado, the Atlantic Forest, and transitional sites, *Plant Biol.*, 8(1): 112-119.
- Gower, J.C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis, *Biometrika*, 53: 325-338.
- Halpern, S.L., 2005. Sources and consequences of seed size variation in *Lupinus perennis* (Fabaceae): adaptative and non-adaptative hypotheses, *Am. J. Bot.*, 92: 205-213.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt & S.L. Sherman-Broyles, 1992. Factors influencing genetic diversity in woody plant species, *New Forests*, 6: 95-124.
- Heuertz, M., X. Vekemans, J.F. Hausman, M. Palada & O.J. Hardy, 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash, *Molecular Ecology*, 12: 2483-2495.
- Holderegger, R., U. Kamm & F. Gugerli, 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics, *Landscape Ecology*, 21: 797-807.
- Howe, G.T., P. Saruul, J. Davis & T.H.H. Chen, 2000. Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F2 family of hybrid poplars, *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 632-642.
- Hristov, H.P. & N.I. Botev, 1981. Effect of the injuries from late spring frost on the increment of the European beech, *Gorskostopanska Nauka*, 18(6): 19-27.
- Jump, A.S. & J. Peñuelas, 2007. Extensive spatial genetic structure revealed by AFLP but not SSR molecular markers in the wind pollinated tree, *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, 16: 925-936.
- Kraj, W. & A. Sztorc, 2009. Genetic structure and variability of phenological forms in the European

- various habitats - preliminary report, *Ecological Questions*, 2: 159-168.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Thormann, C.E., M.E. Ferreira, L.E.A. Camargo, J.G. Tivanga & T.C. Osborn, 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical Applied Genetics*, 88: 973-980.
- Vornam B., Decarli N., Gailing O. 2004. Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers, *Genetics*, 5(4): 561-570.
- Wang, X.R. & A.E. Szmidt, 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees, *Scandinavian Journal of Forest Research*, 16: 199-220.
- Wright, S., 1943. Isolation by distance, *Genetics*, 28: 114-138.
- Wright, S., 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating, *Genetics*, 31: 39-9.
- Salehi Shanjani, P. & G.G. Vendramin, 2005. Analysis of genetic diversity of Oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky) populations as the basis for development of gene conservation strategy in Hyrcanian forests, Iran. The 22th IUFRO World Congress, Brisbane.
- Salehi Shanjani, P., C. Vettori, R. Giannini & R.A. Khavari-Nejad, 2004. Intraspecific variation and geographic patterns of *Fagus orientalis* Lipsky chloroplast DNA, *Silvae Genetica*, 53: 193-197.
- Salehi Shanjani, P., G.G. Vendramin & M. Calagari, 2008. Assessment of genetic structure within and among Iranian populations of beech (*Fagus orientalis* Lipsky): Implications for in situ gene conservation. The 8th IUFRO International Beech Symposium, Japon.
- Salehi Shanjani, P., L. Paule, R.A. Khavari-Nejad, D. Gömöry & K. Sagheb-Talebi, 2002. Allozymic variability in beech (*Fagus orientalis* Lipsky) forests over Hyrcanian zone, *Journal of Forest Genetics*, 9(4): 297-297.
- Saxe, H., M.G.R. Cannell, Ø. Johnsen, M.G. Ryan & G. Vourlttis, 2001. Tree and forest functioning in response to global warming, *New Phytologist*, 149: 369-400.
- Scalfi, M., M. Troggio, P. Piovani, S. Leonardi, G. Magnaschi, G.G. Verdrmin & P.A. Menozzi, 2004. RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.), *Theoretical Applied Genetics* 108: 433-441.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier, 2000. Arlequin, Version 2.0: A Software for population genetics data analysis, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Schneider, S., J. Kueffer, D. Roessli & L. Excoffier, 1997. Arlequin ver 11: software for population genetic data analysis Genetic and Biometry, Laboratory University of Geneva.
- Smith, J.S.C. & O.S. Smith, 1992. Fingerprinting crop varieties, *Adv. Agron.* 47: 85-140.
- Streiff, R., T., Labbe, R. Bacilieri, H. Steinkellner, J. Glössl & A. Kremer, 1998. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl, assessed with isozymes and microsatellites, *Molecular Ecology*, 7: 317-328.
- Sukowska, M., 1998. Ecotype differentiation of European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations in Poland.
www.cababstractsplus.org/abstract.asp?AcNo=200730095 20.
- Szczepaniak, M., 2002. Morphological variability of Polish populations of *Elymus repens* from

Study of molecular and morphological characteristics of seeds from forked and unforked trees beech (*Fagus orientalis* Lipsky)

P. Salehi Shanjani^{*1}, M.H. Asareh¹ and M. Calagari¹

¹Member of scientific board of Research Institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran
(Received: 27 July 2009, Accepted: 22 December 2009)

Abstract

The comparison of different methods for estimating the genetic diversity could define their usefulness in plant breeding and conservation programs. In this study, a total of 5 seed morphological traits, and 4 highly polymorphic simple sequence repeat (SSR) loci were used to study the morphological and genetic diversity and differentiation among 600 seeds from 6 beech (*Fagus orientalis* Lipsky) populations (each population 100 seeds from 10 forked and unforked beech trees). The analysis of variance of the morphological data revealed significant differences among seeds of each trees for all measured traits. Principal Component Analysis (PCA) and UPGMA clustering of studied populations or stem form groups in each population did not show any clinal trends in variation of seed and nut traits. A highly non significant correlation coefficient ($R^2 = 0.002$, $P = 0.227$) between morphology and geographical distance matrices was calculated by the marker systems using mantel's test. Nut and seed morphological traits suggest no ecotypes existence of *F. orientalis* along with Iranian beech forests. Genetic structures were studied based on the mean genetic distance between seeds of each tree. Population differentiation was moderate and differed significantly ($F_{st} = 0.13-0.22$) among forked and monopodial tree groups. A tendency of a strong family structure among seeds of forked and monopodial genotypes was obvious, indicating the observed phenotypic variation was at least partly caused by genetic factors. Besides, the correlation between morphology and geographical distance matrices was significant ($R^2 = 0.136$, $P = 0.04$), indicating the existence of a relatively clinal trends in variation of microsatellite loci. Low correlation coefficients ($R^2 = 0.028$, $P = 0.140$) between distance matrices of two marker systems shows contrary microsatellites, morphological traits are relatively less reliable and non-efficient for precise discrimination of closely related genotypes and analysis of their genetic relationships.

Key words: *Fagus orientalis* Lipsky, Genetic diversity and differentiation, Microsatellite, Morphology.