

بررسی روند لیگنی شدن بافت چوبی گونه راش ایرانی در سه تراز ارتفاعی

رضا اولادی^۱، کامبیز پورطهماسی^۲، دیتر اکشتاین^۳ و آخیم برونینگ^۴

^۱ دانشجوی دکتری علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۲ دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۳ استاد بخش بیولوژی چوب، دانشگاه هامبورگ، آلمان

^۴ استاد انیستیتو جغرافی، دانشگاه ارلانگن-نورنبرگ، آلمان

(تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۳، تاریخ تصویب: ۸۹/۶/۲۴)

چکیده

لیگنین دومین ماده مهم تشکیل دهنده چوب و لیگنی شدن یکی از مهم‌ترین مراحل بلوغ سلول‌های چوبی است. در این پژوهش روند لیگنی شدن بافت چوبی درختان راش ایران و اثر ارتفاع از سطح دریا بر آن از دیدگاه زیست‌شناختی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور در جنگل آموزشی-پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، سه تراز ارتفاعی (۶۵۰، ۱۱۰۰ و ۱۸۰۰ متر) گزینش و در طول یک فصل رویش در فواصل زمانی معین، نمونه‌های کوچکی از ۵ درخت موجود در هر جایگاه استخراج شدند. روند لیگنی شدن در این نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی دوگانه تحت میکروسکوپ نور مرئی و قطبی شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که ارتفاع از سطح دریا تأثیری بر چگونگی و مراحل لیگنی شدن چوب نداشته و تنها طول مدت لیگنی شدن را کوتاه‌تر میکند. لیگنی شدن، پس از آغاز تشکیل دیواره ثانویه و از لایه میانی این دیواره و گوشه‌های سلول آغاز شده و بتدریج در دیواره ثانویه بسوی حفره سلولی گسترش می‌یابد. آوندها و بافت‌های چوبی نزدیک اشعه چوبی زودتر لیگنی می‌شوند. پایان لیگنی شدن آخرین فیبرهای تولید شده توسط لایه زاینده (کامبیوم) با تأخیر بیشتری صورت پذیرفته و حتی گاهی درونی‌ترین لایه‌های دیواره این فیبرها لیگنی نمی‌شوند.

واژه‌های کلیدی: لیگنی شدن، تشکیل دیواره ثانویه، تراز ارتفاعی، راش ایران

مقدمه

تشکیل چوب در مناطق معتدله، فرایندی دوره‌ای است که با تقسیم پیرامونی سلول‌های لایه زاینده (کامبیوم) آوندی آغاز شده و با تمایز سلول‌های مشتق شده از لایه زاینده (کامبیوم) در در چهار مرحله زیر به پایان می‌رسد: الف- انبساط سلولی (طویل شدگی و توسعه حجمی). ب- تشکیل دیواره ثانویه. ج- لیگنینی شدن. د- مرگ سلول بواسطه هضم پروتوپلاست در عناصر چوبی که نقش انتقال آب یا حفظ استحکام مکانیکی درخت را برعهده دارند (Plomion et al., 2001). در این بین فرایند لیگنینی شدن سلول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و بیشترین توجه را به خود جلب کرده است (Christensen et al., 2000).

لیگنین، پلیمری فنولیک با ساختاری پیچیده بوده که پس از سلولز فراوان‌ترین پلیمر در چوب به شمار می‌آید (Boerjan et al., 2003). مونومرهای لیگنین (کانیفریل الکل، سیناپیل الکل و p-کوماریل الکل) در سیتوپلاسم سلول ساخته شده و از وزیکول‌ها (ریزکیسه‌ها) به شکل مونولیگنول‌ها بروی دیواره سلولی آزاد میشوند (Fujita et al., 1978). پس از اینکه مونومرهای لیگنین ساخته شدند به دیواره سلول منتقل می‌شوند تا در آنجا بسپارش لیگنین بصورت واحدهای گویاسیل و یا سیرینجیل صورت گیرد. این پلیمرها با همی سلولزها پیوند کووالانسی برقرار کرده و بدین‌سان به دیواره سلول استحکام و سختی بخشیده و سطح آب‌گریزی را که برای انتقال آب مورد نیاز است، برای سامانه آوندی فراهم می‌آورند (Déjardinet al., 2010). فرآیند لیگنینی شدن از گوشه‌های سلول در لایه بین سلولی آغاز شده و بتدریج در دیواره ثانویه به سمت حفره سلولی گسترش می‌یابد. لیگنینی شدن لایه بین سلولی و دیواره اولیه به‌طور معمول پس از آغاز تشکیل دیواره ثانویه آغاز می‌شود درحالی‌که لیگنینی شدن دیواره ثانویه هنگامی آغاز می‌شود که این دیواره بطور کامل ساخته شده باشد (Samuels et al., 2002).

میزان و نوع ترکیبات مونومری لیگنین بین گونه‌ها، درختان مختلف یک گونه، بافت‌ها، سلول‌های چوبی و حتی لایه‌های مختلف دیواره سلول متفاوت است. برخلاف بازدانگان که لیگنین در آنها بیشتر از واحدهای گویاسیل

ساخته شده، لیگنین نهاندانگان مخلوطی از واحدهای گویاسیل و سیرینجیل را شامل می‌شود. دیواره ثانویه آوندها و لایه بین سلولی همه سلول‌های پهن‌برگان معمول دارای واحدهای گویاسیل‌اند درحالی‌که دیواره ثانویه فیبرها و دیواره‌های سلولی پارانشیم‌ها شامل مخلوطی از واحدهای گویاسیل و سیرینجیل با نسبت بیشتری از واحدهای سیرینجیلی‌اند (Donaldson, 2001). Wu et al., 1992 در تحقیق جامعی که بر روی ۲۵ گونه پهن‌برگ در چین انجام دادند دریافتند که روند لیگنینی شدن و ترکیب مونومری آن متأثر از نوع سلول، موقعیت آن در حلقه رویش، چگونگی قرارگیری آوندها و زیستگاه درخت است. آنان گزارش کردند که آوندها در گونه‌های بخش روزنه‌ای از لیگنین گویاسیل/سیرینجیل با نسبت‌های مختلف تشکیل شده درحالی‌که در گونه‌های پراکنده‌آوند، لیگنین آوندها تنها دارای واحدهای گویاسیل است. علاوه بر این، شدت لیگنینی شدن در بافت‌های مختلف چوبی نیز متفاوت است. تراکئیدهای بالغ در بازدانگان و آوندهای نهاندانگان به شدت لیگنینی می‌شوند درحالی‌که فیبر تراکئیدها و فیبرهای لیبری‌فرم نهاندانگان دارای مقادیر کمتری لیگنین‌اند (Pallardy, 2008). گزارش‌هایی از پایان نیافتن لیگنینی شدن در آخرین سلول‌های مشتق شده از لایه زاینده (کامبیوم) در پایان فصل رویش وجود دارد (برای مثال Awano et al., 2001).

اقلیم نیز یکی از عوامل موثر بر روند و شدت لیگنینی شدن در طول یک فصل رویش است. Kim et al., 1989 اعلام کردند که میزان لیگنین سوزنی‌برگان همبستگی معکوسی با عرض جغرافیایی دارد. Gindl et al., 2000 اثر دما بر روند و شدت لیگنینی شدن تراکئیدهای چوب پایان نوئل را مورد بررسی قرار داده و گزارش دادند که هرچه فصل رویش زودتر به پایان برسد، میزان لیگنین آخرین سلول‌های تولید شده کمتر خواهد بود. آنان در پایان نتیجه‌گیری کردند که لیگنینی شدن دیواره‌های سلولی نیز مانند پهنای حلقه رویش و دانسیته متأثر از متغیرهای اقلیمی می‌باشد.

نزدیک به تمامی ویژگی‌های لیگنین در کاربردهای کاغذسازی نقش منفی دارند و کاغذهای با کیفیت خوب از الیافی ساخته می‌شوند که به تقریب بدون لیگنین هستند.

روش‌های گوناگونی برای بررسی فرایند لیگنینی شدن وجود دارند که از آن جمله میتوان به رنگ‌آمیزی و دیدن زیر میکروسکوپ نور مرئی (Antonova and Stasova, 1993; Rossi et al., 2008) رادیوگرافی میکروسکوپی، شیمی بافت^۱، طیف بینی UV (Gričar et al., 2005)، بررسی بافت چوبی با میکروسکوپ تداخلی، میکروسکوپ فلوروسنت (Mondolot et al., 2001) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (Schmitt & Melcher, 2004) اشاره کرد.

رنگ‌آمیزی دوگانه شیوه ساده و کارآمدی برای تمایز بین دیواره‌های لیگنینی و غیرلیگنینی شده بشمار می‌آید (Vaganov et al., 2006). از میان معرف‌های رنگی بکار گرفته شده برای اینکار می‌توان به متیلن بلو / آزور A^۲، سافرانیل / آسترابلو^۳ و سافرانیل / فست‌گرین^۴ اشاره کرد. در بین این معرف‌های رنگی، دوگانه سافرانیل / آسترابلو بهترین تمایز را زیر میکروسکوپ نور مرئی ایجاد می‌کند (Vasquez-Cooz & Meyer, 2002).

هدف از این تحقیق، بررسی روند لیگنینی شدن در درختان راش ایران در طول یک فصل رویش و تاثیر ارتفاع از سطح دریا بر این روند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- گزینش درختان و نمونه برداری

در جنگل آموزشی-پژوهشی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، سه جایگاه نمونه‌برداری در سه ارتفاع مختلف از سطح دریا، بترتیب در ارتفاع‌های ۶۵۰ متری (جایگاه الف)، ۱۱۰۰ متری (جایگاه ب) و ۱۸۰۰ متری (جایگاه ج) گزینش شدند. هر سه جایگاه دارای اقلیم سرد و مرطوب با مجموع بارندگی سالیانه تا حدودی یکسان (حدود ۱۲۰۰ mm) بوده ولی میانگین دمای سالیانه در آنها بترتیب ۱۳ °C، ۱۱ °C و ۷ °C است. در هر جایگاه ۵ اصله درخت راش سالم در دامنه قطری ۴۵ تا ۵۰ سانتی‌متری که دارای تنه استوانه‌ای (سیلندریک) بوده و تا

لیگنین سبب شکننده شدن کاغذ شده و به دلیل اکسایش نوری و تشکیل گروه‌های رنگی سبب افزایش زردی و تیرگی کاغذ می‌شود. از سوی دیگر لیگنین زدایی هزینه قابل توجه‌ای داشته و با توجه به استفاده از مواد شیمیایی در این کار خطر آسیب زدن به محیط زیست نیز وجود دارد. در نتیجه در سال‌های اخیر پرورش درختانی که لیگنین آنها آسان‌تر جدا شود یا در اصل دارای لیگنین کمتری باشند مورد توجه بسیار محققان علوم ژنتیک مولکولی قرار گرفته است (Chaffey, 2002) اما به‌رغم اینکه در دهه‌های اخیر تحقیقات به نسبت گسترده‌ای برای توضیح و تفسیر فرآیند لیگنینی شدن از زاویه شیمیایی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی انجام شده است ولی لیگنین بدست آمده از این درختان اصلاح شده ویژگی‌های غیرمنتظره‌ای نشان داده‌اند (Whetten et al., 1998; Boerjan et al., 2003). این نتایج متناقض نشان می‌دهد که دانش ما درباره مراحل بیوسنتز لیگنین نادرست و یا ناکافی است (Grima-Pettenati & Goffner, 1999) و همچنین درختان انعطاف‌پذیری متابولیکی بالایی در تشکیل لیگنین دارند. از این زاویه بررسی فرآیند لیگنینی شدن و تاثیر ارتفاع از سطح دریا (بعنوان یک عامل اقلیمی) بر آن در درختان راش ایران می‌تواند به محققان علوم اصلاح ژنتیکی چوب کمک شایانی کند.

علاوه بر این‌گونه که Panshin & De Zeeuw, 1980 ادعان داشته‌اند درک شیمی‌دان‌ها از لیگنین تا اندازه‌ای متفاوت از برداشت زیست‌شناسان چوب از لیگنینی شدن است. گیاه‌شناسان، لیگنینی شدن را فرآیندی فیزیولوژیکی دانسته و با آنکه به زمینه شیمیایی این تغییر معترف‌اند ولی بر جنبه‌های فیزیکی این دگرگونی که در دیواره‌های سلول رخ میدهد تاکید بیشتری دارند اما روش‌های شیمی‌دان‌ها برای بررسی لیگنین مبتنی بر تجزیه بافت چوبی بالغ و مرده بوده است. با آنکه تحقیقاتی بر روی شیمی لیگنین درختان بومی ایران انجام شده است (برای مثال Mirshokraie et al., 2008) اما این تحقیق نخستین مورد از بررسی لیگنینی شدن از زاویه زیست‌شناختی در درختان ایران می‌باشد که می‌تواند زمینه‌سازی برای درکی جامع‌تر از این ماده مهم بافت‌های چوبی برای محققان فعال در هر یک از این گرایش‌های علمی-صنعتی باشد.

۱- histochemistry

۲- methylene blue/azur A

۳- safranin/astra blue

۴- safranin O / fast green

به ضخامت $18 \mu\text{m}$ از نمونه‌های جای گرفته در قالب پارافینی تهیه شدند. این مقاطع به مدت ۵ دقیقه در زایلن قرار گرفتند تا پارافین موجود در آنها حل و خارج شود. از آنجا که نمونه‌های کوچک بیشتر آبگیری شده بودند پیش از رنگ آمیزی بتدریج الکل موجود در آنها با آب جایگزین شد. در نهایت نمونه‌ها با محلول ۱٪ آسترابلو-سافرانین (۰/۵ گرم آسترابلو، ۰/۵ گرم سافرانین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) رنگ آمیزی شدند بدین صورت که یک قطره از محلول بالا روی مقاطع ریخته شده و پس از ۲-۳ دقیقه آب شویی انجام شد. آنگاه برای خروج رنگ اضافی و آبگیری مقاطع، آنها را از نمونه‌های الکل (۰/۵٪، ۰/۷۵٪ و خالص؛ هر کدام ۲-۳ دقیقه) عبور داده، قطره‌ای زایلن (برای افزایش درخشندگی و اطمینان از خروج کامل رنگ های اضافی) روی آنها ریخته و در نهایت توسط چسب کانادا بالزام^۲ روی لام‌های میکروسکوپی تثبیت شدند.

- بررسی لیگنینی شدن

برای بررسی لیگنینی شدن، نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نور مرئی (Nikon YS 100) با بزرگنمایی‌های مختلف (عدسی شیئی ۱۰X، ۴۰X، ۱۰۰X) دیده و عکس‌برداری شدند. زیر میکروسکوپ، دیواره‌های لیگنینی شده برنگ قرمز و دیواره‌های غیر لیگنینی آبی‌رنگ دیده می‌شوند. آغاز لیگنینی شدن دیواره سلول را می‌توان با جایگزینی رنگ قرمز بجای آبی و گسترش لیگنینی شدن در یک سلول یا کل حلقه رویش را با وجود طیفی رنگی بین این دو رنگ تشخیص داد. درجه لیگنینی شدن سلول نیز تابعی از میزان تغییر رنگ آن از آبی به قرمز است. سلول‌های به‌کل لیگنینی شده قرمز پر رنگ دیده می‌شوند.

تشکیل لایه ثانویه دیواره سلولی توسط میکروسکوپ نورقطبی شده^۳ (Olympus-BHSP) مورد بررسی قرار گرفت. بعلاوه آرایش خاص میکروفیبریل‌های سلولز در لایه‌های مختلف دیواره ثانویه، هنگامی این دیواره تحت نور قطبی شده قرار می‌گیرد، می‌درخشد درحالی‌که اگر سلول‌ها تنها از دیواره اولیه تشکیل شده باشد چنین درخشندگی دیده نمی‌شود (Schweingruber, 2007).

حداکثر بر روی زمینی مسطح و بی شیب قرار گرفته بودند را برگزیده و این درختان علامت‌گذاری شدند. در طول یک فصل رویش (از اواخر اسفند ۱۳۸۶ تا اواسط آذر سال ۱۳۸۷) ابتدا هر ده روز یکبار و پس از یک ماه هر بیست روز یکبار با استفاده از ابزاری تخصصی بنام تریپار^۱ (Rossi et al., 2006a) از هر درخت ۳ ریز نمونه (میکروکور) استخراج شدند. این نمونه‌های کوچک (به قطر ۲ میلی‌متر و طول تقریبی ۱ سانتی‌متر) دارای پوست، بافت آبکشی، لایه زاینده (کامبیوم) و حلقه رویشی در حال تشکیل بودند. نمونه‌های کوچک در محلول نگهدارنده فرمالدهید اتانول-استیک اسید (FEA) گذاشته شده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

- آماده‌سازی نمونه‌ها

از آنجا که سلول‌های تازه مشتق شده از لایه زاینده (کامبیوم) که هنوز دیواره ثانویه در آنها تشکیل و لیگنینی نشده است ممکن است در اثر برش میکروتومی پاره شوند؛ لازم است پیش از برش‌گیری ماده استحکام بخشی را وارد حفره سلولی کرد. بدین منظور شیوه Rossi et al., 2006a با اعمال اصلاحاتی مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایشگاه نخست نمونه‌های کوچک (میکروکورها) در نمونه‌های الکل بدون آب شده (۰/۱۰٪، ۰/۲۰٪، ۰/۵۰٪، ۰/۷۰٪، ۰/۹۰٪ و الکل خالص؛ هر کدام ۱۲ ساعت) آنگاه به تناوب در محلول الکل-زایلن با نسبت افزایشی (۰/۳، ۰/۱، ۰/۱؛ ۳:۱؛ هر کدام ۱۲ ساعت) قرار گرفته و در نهایت ۲۴ ساعت در زایلن خالص خوابانده شدند. زایلن که حلال پارافین است در این روند بتدریج جایگزین الکل می‌شود. به همین شیوه پارافین جایگزین زایلن در بافت چوبی شد؛ بدین ترتیب که نمونه‌های کوچک، در آون با دمای ۶۳ درجه سلسیوس از مخلوط زایلن-پارافین مذاب با نسبت افزایشی عبور داده شده و در پایان ۲۴ ساعت در پارافین مذاب ماندند. پس از نفوذ پارافین به درون حفره‌های سلولی، نمونه‌های کوچک توسط دستگاهی نیمه خودکار (تولید شرکت دید سبز) با پارافین قالب‌گیری شده و قالب‌های تهیه شده (به ابعاد تقریبی $1/5 \times 1/5 \times 2/5 \text{ cm}^3$) در دمای اتاق نگهداشته شدند. سپس با استفاده از میکروتوم لغزشی مقاطع عرضی

۲- Canada Balsam

۳- Polarized light Microscopy

۱- Trephor

علاوه بر این رنگ قرمز دیواره ثانویه چه زمانی در نخستین فیبرهای بالغ به پایان رسیده است؛ از اواخر اردیبهشت ماه، ضخامت دیواره ۱۵ فیبر نزدیک به حلقه رویش سال پیش در دو سمت مماسی و شعاعی اندازه‌گیری و توسط آزمون t با ضخامت ۱۵ فیبر متناظر در حلقه رویش سال پیش همان نمونه مقایسه شدند. معنی‌دار نبودن اختلاف میان این دو نمونه داده به این معنی است که فیبرهای مورد بررسی در حلقه رویش در حال تشکیل، به بیشینه ضخامت شان دست یافته‌اند.

نتایج

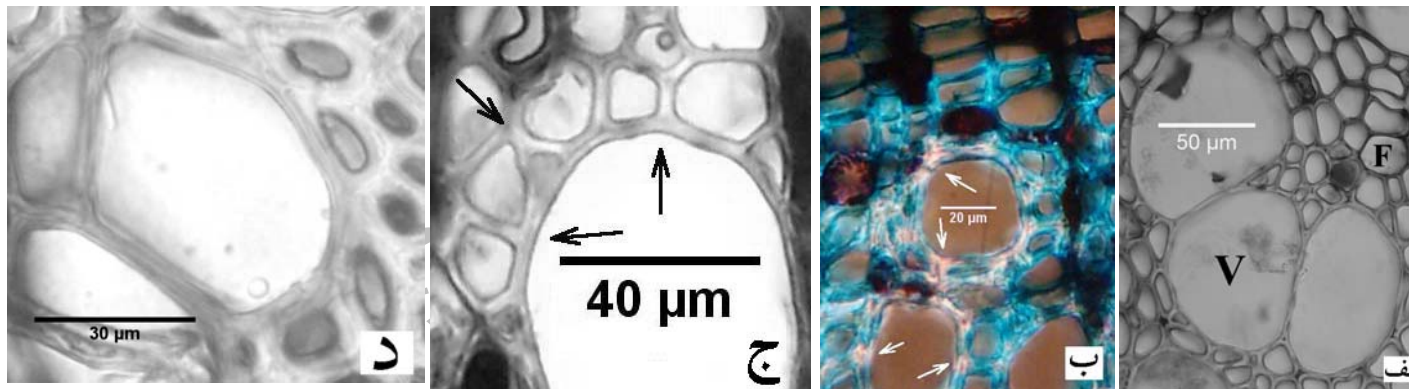
لیگنینی شدن دیواره‌های سلول در همه درختان جایگاه «الف» بین ۱۸ تا ۲۸ ام فروردین و در درختان جایگاه «ج» بین روزهای ۲۸ فروردین و ۱۸ اردیبهشت آغاز گشت. برخلاف این دو جایگاه، آغاز لیگنینی شدن در همه درختان جایگاه «ب» همزمان نبود. لیگنینی شدن بافت چوبی سه درخت این جایگاه مانند جایگاه «ج» در بازه زمانی ۲۸ فروردین و ۱۸ اردیبهشت رخ داد در حالی که در درخت شماره ۲ این مرحله پیش از ۱۸ فروردین آغاز شده و بازه آغاز لیگنینی شدن درخت شماره ۴ مانند درختان جایگاه «الف» بود.

لیگنینی شدن مدتی پس از آغاز نهشت^۱ لایه‌های دیواره ثانویه در سلول‌های چوبی آغاز شد (شکل ۲-الف). تشکیل دیواره ثانویه در آوندها، فیبرها و پارانشیم‌هایی که در موقعیت مکانی تا حدودی یکسانی در حلقه رویش قرار داشتند بطور همزمان آغاز گشت. فاصله زمانی بین آغاز لیگنینی شدن و آغاز تشکیل دیواره ثانویه، صرفنظر از اختلاف بین درختان یک جایگاه و جایگاه‌های مورد بررسی همواره ۱۰ روز بوده است. تشکیل دیواره ثانویه بسیار زودتر از لیگنینی شدن به پایان رسید و لیگنینی شدن روزهای بسیاری پس از دستیابی سلول به بیشینه ضخامت‌اش همچنان ادامه یافت (شکل ۳-ب).

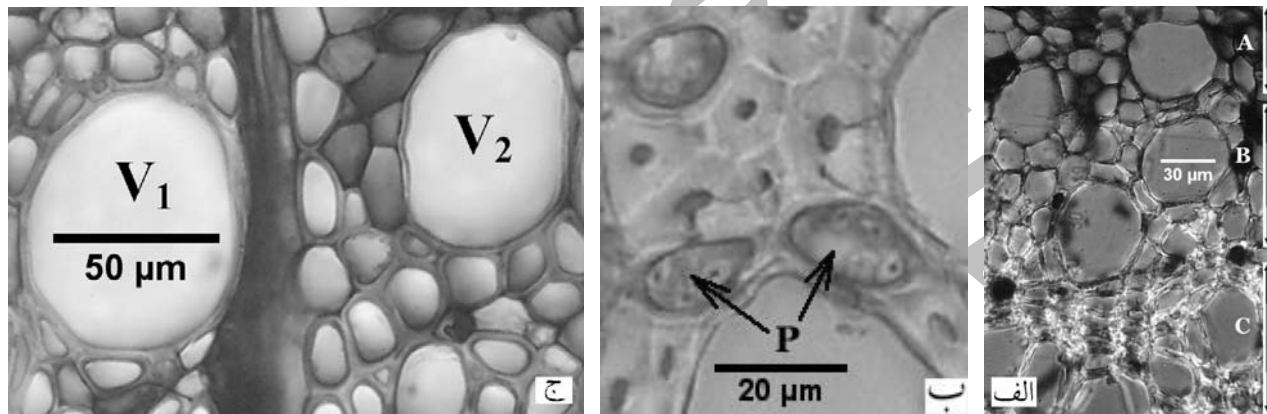
آوندها نخستین عناصر چوبی بودند که لیگنینی شدند (شکل ۱-الف) و اینکار هنگامی صورت پذیرفت که ضخامت دیواره آوند دستکم به میزان $1/5 \mu m$ رسیده بود.

لیگنینی شدن آخرین فیبرهای تولید شده در بیشتر درختان جایگاه «ب» بطور همزمان در اوایل آبان و در درختان جایگاه «ج» در اواخر شهریور به پایان رسید و بدین‌سان کل بافت حلقه چوبی لیگنینی شد. در سه درخت از پنج درخت جایگاه «الف» زمان پایان لیگنینی شدن همانند جایگاه «ب» بوده و لیگنینی شدن کامل دو درخت دیگر کمی زودتر یعنی در اواخر مهرماه رخ داد. میانگین شمار روزهایی که لیگنینی شدن در حلقه رویش درختان سه جایگاه «الف»، «ب» و «ج» جریان داشت بترتیب ۱۵۷، ۱۴۷ و ۱۱۰ روز برآورد شد. لازم به یادآوری است که درونی‌ترین لایه‌های سلولی در چند ردیف آخر از فیبرهای مجاور لایه زاینده (کامبیوم) در یکی از درختان جایگاه «ب» حتی در آخرین برداشت (۱۴ آذر) نیز همچنان اندکی آبی رنگ و لیگنینی نشده باقی ماندند.

۱- deposition

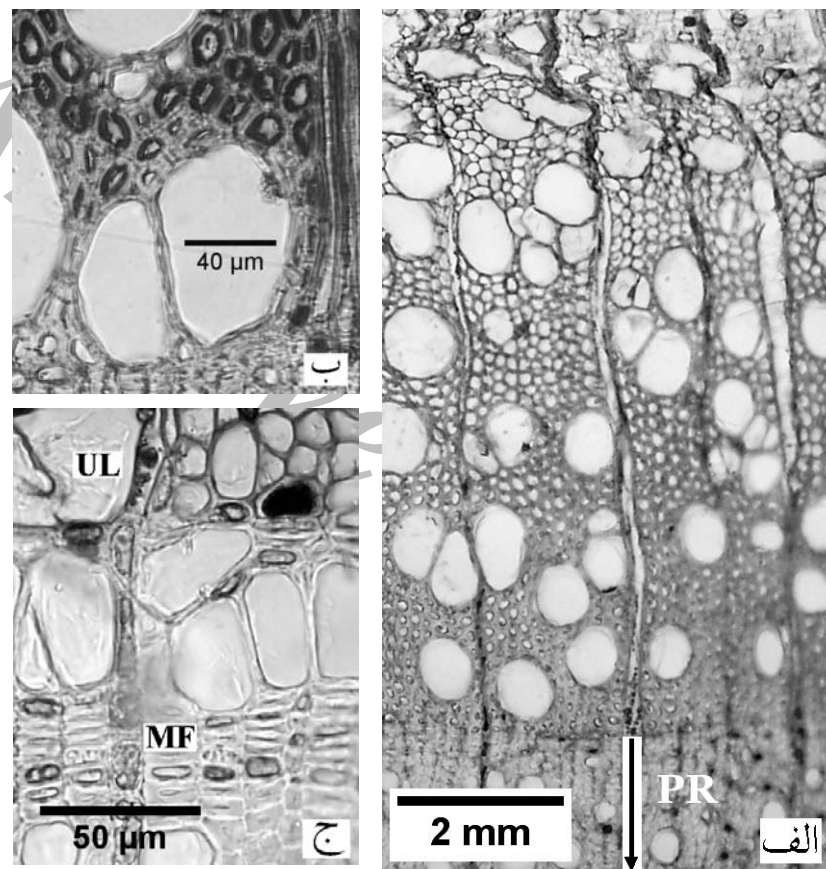


شکل ۱- آغاز لیگنینی شدن از گوشه‌های سلول در آوندها. شکل «الف»، «ج» و «د» تحت نور مرئی و شکل «ب» تحت نور قطبی شده (پلاریزه) گرفته شده است. الف: دیواره آوندها (V) قرمز (لیگنینی) شده در حالی که بیشتر فیبرها (F) هنوز آبی رنگ اند. ب و ج: دیواره اولیه و گوشه‌های سلول (فلش) مکان‌های آغاز لیگنینی شدن در هر دو عنصر آوند و فیبراند. د: دیواره آوند پر رنگ تر از فیبرهای پیرامون دیده می‌شود که احتمال دارد نشانه لیگنینی شدن شدیدتر آن باشد.



شکل ۲- بررسی لیگنینی شدن زیر نور قطبی شده (الف) و مرئی (ب و ج). الف: در سلول‌های تازه مشتق شده از لایه زاینده (کامبیوم) تشکیل دیواره ثانویه و لیگنینی شدن آغاز نشده (A) و این سلول‌ها برنگ آبی کدر دیده می‌شوند. سلول‌هایی که آبی درخشان دیده می‌شوند، سلول‌های غیرلیگنینی‌اند که تشکیل دیواره ثانویه در آنها آغاز شده (B). زیر این سلول‌ها، لیگنینی شدن با ظهور رنگ قرمز آغاز شده است (C).

ب: لیگنینی شدن مدت‌هاست که در آوندها و فیبرها به پایان رسیده ولی درونی‌ترین دیواره‌های سلولی پاراننشیم‌های محوری (P) لیگنینی نشده‌اند. این سلول‌ها هنوز دارای سیتوپلاسم و زنده‌اند. ج: آوند نزدیک تر به اشعه پاراننشیمی (V₁) نسبت به آوند دورتر از آن (V₂) زودتر لیگنینی شده است.



شکل ۳- بررسی لیگنینی شدن زیر نور مرئی. الف: تغییر رنگ تدریجی بافت چوبی از آبی خالص (سلول‌های نزدیک لایه زاینده (کامبیوم)) در بالای تصویر به قرمز خالص در سلول‌های نزدیک به حلقه رویش سال پیش (PR). ب: فیبرها به بیشینه ضخامت دیواره دست یافته‌اند ولی لایه‌های درونی دیواره سلولی در آنها هنوز لیگنینی نشده‌اند. ج: انقطاع در روند مداوم و تدریجی لیگنینی شدن بافت چوبی. کل تصویر ج مربوط به یک حلقه رویش است. درخت پس از تشکیل فیبرهایی همانند فیبرهای پایانی حلقه (MF)، آوندهای پرشماری ساخته که نسبت به بافت لیگنینی نشده پس از خود (UL) در مرحله لیگنینی شدن پیشرفته‌ای قرار دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

رو تشدید لیگنینی شدن دیواره‌های سلول برای افزایش مقاومت فشاری و کاهش خطر چین‌خوردگی^۱ آوندها صورت می‌گیرد (Yoshinaga et al., 1992; Abdul Khalil et al., 2010). با این حال علت اینکه رنگ قرمز دیواره آوندها شدیدتر از فیبرها دیده شد ممکن است به تفاوت نوع لیگنین موجود در دیواره ثانویه این دو عنصر چوبی برگردد. دیواره ثانویه آوندها تنها دارای لیگنین گوایاسیل است درحالی‌که دیواره ثانویه فیبرها از مخلوطی از واحدهای گوایاسیل و سیرینجیل تشکیل شده (Donaldson, 2001). از آنجا که معرف رنگی سافرانین بیشترین تاثیر را بر لیگنین گوایاسیل دارد (De Micco & Aronne, 2007) آوندها پر رنگ‌تر دیده می‌شوند.

گزارش‌های پرشماری دال بر آغاز لیگنینی شدن از لایه میانی، گوشه‌های سلول، روزنه‌ها و گسترش آن در دیواره ثانویه به سمت حفره سلولی در گونه‌های مختلف سوزنی‌برگ وجود دارد (Takabe et al., 1981; Samuels et al., 2002; Rossi et al., 2006b). آنکه تحقیقات همانند بر روی پهن‌برگان به مراتب کمتر است (برای مثال Mondolot et al., 2001; Grünwald et al., 2002) اما بنظر می‌رسد - همانگونه که در این تحقیق دیده شد - روند لیگنینی شدن سلول‌های پهن‌برگان نیز از الگوی همانند پیروی کند. محققان در تلاش برای توضیح این پدیده فرضیه‌های گوناگونی ارائه داده‌اند. Samuels et al., 2002 این امر را در تراکئیدهای سوزنی‌برگان سازوکاری مرتبط با مقادیر زیاد کانیفیرین^۲ تولید شده از سلول در حال مرگ دانسته‌اند. Fujino & Itoh, 1988 اعلام کرده‌اند که در اوکالیپتوس، تخلخل بالای ماتریکس کربوهیدرات‌ها در لایه بین سلولی و دیواره نخستین امکان بیشتری به لیگنین برای نشست در حفره‌های دیواره می‌دهد. Fromm, 2003 و Abdul Khalil et al., 2010 نوع لیگنین و چگونگی پلیمریزه شدن آن را ناشی از اختلاف آرایش

تشکیل دیواره ثانویه بطور همزمان در همه سلول‌های بافت چوبی رخ می‌دهد. این مساله در گونه زبان گنجشک نیز صادق بوده است (Schweingruber, 2007). لیگنینی شدن مدتی پس از آغاز تشکیل دیواره ثانویه دیده شد. اختلاف زمانی بین لیگنینی شدن و نهشت پلی‌ساکاریدهای دیواره ثانویه در بررسی‌های پرشماری گزارش شده است (برای مثال Terashima, 2000; Fukushima & Gričar et al., 2005). Terashima, 1991 در تحقیقی که بر روی *Ginkgo biloba* انجام دادند گزارش کردند که لیگنینی شدن پس از تشکیل لایه S_3 در دیواره سلول آغاز می‌شود. با این حال با آنکه صنوبر وحشی از این قاعده کلی پیروی می‌کند ولی در صنوبر پیوندی، نهشت (رسوب) پلی‌ساکاریدها و لیگنین در حین تشکیل دیواره ثانویه همزمان رخ دادند (Grünwald et al., 2002).

لیگنینی شدن نخست در آوندها آغاز شده (Grünwald et al., 2002; Marion et al., 2007; Abdul Khalil et al., 2010) و در آنها با شدت بیشتری نسبت به فیبرها ادامه یافت (Dünisch & Rühmann, 2006). با استفاده از روش میکروسکوپی UV ثابت شده است که غلظت لیگنین در چنین آوندهایی به‌طورمعمول بیشتر از غلظت آن در دیواره ثانویه فیبرها است (Eriksson et al., 1988). Priestley et al., 1935 این فرضیه را ارائه دادند که فیبرهای پیرامون آوندها به این جهت دیرتر لیگنینی میشوند که فضای لازم برای حجیم شدن آوند برای مدت بیشتری فراهم باشد اما با توجه به مشاهده‌های این تحقیق، این نظریه دستکم در مورد راش ایران درست بنظر نمی‌رسد زیرا مهم‌ترین عامل محدود کننده گسترش سلول یعنی تشکیل دیواره ثانویه در فیبرها و آوندها همزمان آغاز شد و همچنین آوندها هنگامی آغاز به لیگنینی شدن کردند که تا حدودی به ابعاد نهایی خود دست یافته بودند.

آوندها باید نیروهای فشاری بزرگی که بواسطه نقل و انتقال آب در گیاهان ایجاد می‌شود را تحمل کنند و از این

۱- collapse

۲- coniferin

برخی عوامل درونی (Dyckmans et al., 2002) سه عامل موثر بر زمان‌بندی پایان لیگنینی شدن معرفی شده‌اند. در ارتفاعات بالاتر، دما نقش تعیین کننده‌تری در مراحل مختلف رویش حلقه بازی کرده (Schmitt et al., 2004; Rossi et al., 2007) و رابطه مستقیمی بین لیگنینی شدن سلول‌ها و دما - به‌ویژه در اواخر تابستان - وجود دارد (Gindl et al., 2000). با توجه به اینکه دما مهم‌ترین متغیر اقلیمی در بین سه جایگاه مورد بررسی بود می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که کاهش طول دوره لیگنینی شدن در درختان رویشگاه مرتفع، بعلت کاهش دمای هوا در آن بوده است.

لیگنینی نشدن لایه‌های درونی دیواره ثانویه در آخرین سلول‌های تولید شده توسط لایه زاینده (کامبیوم) پدیده‌ای است که بیشتر در درختان مناطق معتدله گزارش شده است (Nix & Villiers, 1985; Donaldson, 2001, 1991). Awano et al., 2001 اعلام کردند که سطح درونی دیواره‌های جوان‌ترین سلول‌های چوبی در راش ژاپنی (*Fagus crenata*) لیگنینی نمی‌شوند. براین پایه، این احتمال وجود دارد که فیبرهای مجاور لایه زاینده (کامبیوم) در یکی از درختان جایگاه «ب» همانند مورد بالا در طول زمستان لیگنینی نشده باقی بمانند. این درخت حلقه رویشی بسیار پهنی تولید کرد که نشان از نرخ بالای رویش در آن دارد. بنا به نظریه Grünwald et al., 2002 و مشاهده‌های Schmitt et al., 2003 و Gričar et al., 2005 و Thibeault-Martel et al., 2008 لیگنینی شدن در درختانی که سرعت رشد زیاد و حلقه‌های پهن دارند کندتر بوده و در نتیجه ممکن است لیگنینی شدن آخرین سلول‌ها با کاهش نامناسب دما در اواخر پاییز مقارن شود و افت دما، سلول‌ها را از ادامه لیگنینی شدن باز دارد.

پلی‌ساکاریدهای سازنده دیواره سلول در لایه‌های مختلف این دیواره دانسته‌اند. با این حال تفسیر قطعی این موضوع نیاز به انجام تحقیقات بیشتری دارد.

برخلاف نتایج این تحقیق، Frankenstein et al., 2005 و Schweingruber, 2007 در تحقیقاتی جداگانه که بترتیب بر روی گونه‌های افرا و زبان گنجشک انجام گرفت اعلام کردند که لیگنینی شدن پارانشیم‌های محوری همزمان با آوردها و زودتر از فیبرها آغاز می‌شود. درحالی‌که در تحقیق جاری، این سلول‌ها همزمان و در روندی همانند فیبرها لیگنینی شدند. این اختلاف ممکن است بدلیل تفاوت در چگونگی آرایش پارانشیم‌های محوری باشد. پارانشیم‌ها در دو گونه یاد شده آوندگرا (دورآوندی) بوده درحالی‌که در راش ایران، آرایش پارانشیم‌های محوری از نوع پراکنده است که به‌طور معمول در بافت چوبی دورتر از آوردها قرار می‌گیرند.

با وجود همسانی روند لیگنینی شدن در همه درختان مورد بررسی، زمان آغاز و پایان آن بین درختان جایگاه‌های مختلف اختلاف‌هایی داشتند. بطور کلی، با افزایش ارتفاع، درختان لیگنینی شدن را دیرتر آغاز کرده و زودتر به پایان رساندند. نتایج همانندی در تحقیقی که Gindl et al., 2001 بر روی نوئل انجام دادند بدست آمد: درحالی‌که لیگنینی شدن درختان روئیده در ارتفاع ۱۲۶۰ متری از سطح دریا، در مهرماه پایان یافت، درختان ارتفاع پایین‌تر (۵۸۰ متری) هنوز درحال لیگنینی شدن بودند. در ارتفاعات پایین‌تر، لیگنینی شدن *Abies alba* Mill تا آبان ماه ادامه داشت (Gričar et al., 2005). در گونه *Pinus cembra*، افزایش ارتفاع رویشگاه از ۱ m a.s.l به ۲۱۸۰ m a.s.l باعث شد که لیگنینی شدن درختان جایگاه مرتفع‌تر ۴ هفته زودتر به پایان برسد (بترتیب در اواخر مهر و اواخر شهریور) (Gruber et al., 2009). لیگنینی شدن و بلوغ کامل سلول‌ها در راش اروپا زودتر از همه راش‌های مورد بررسی در این تحقیق (در اواخر مرداد) گزارش شده است (Čufar et al., 2008). دما (Donaldson et al., 2001; Gričar et al., 2006)، سرعت رشد (Grünwald et al., 2002) و

منابع

- Abdul Khalil, H.P.S., Ireana Yusra, A.F., Bhat A.H. and Jawaid, M. 2010. Cell wall ultrastructure, anatomy, lignin distribution, and chemical composition of Malaysian cultivated kenaf fiber. *Industrial Crops and Products*. 31(1): 113-121.
- Antonova, G.F. and Shebeko, V.V. 1981. Applying cresyl violet in studying wood formation. *Khimiya Drevesiny*. 4: 102-105.
- Awano, T., Takabe K., Fujita, M., 2001. Xylan and Lignin deposition on the secondary wall of *fagus crenata* fibers. In: *Molecular Breeding of Woody Plants* (Morohoshi, N., Komamine, A., eds), The Netherlands: Elsevier Science B.V., pp. 137-142.
- Boerjan, W., Ralph J. and Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546.
- Chaffey, N, 2002. *Wood Formation in Trees, Cell and Molecular Biology Techniques*, Taylor and Francis, London and New York, 364 pp.
- Christensen, J.H., Baucher, M., O'Connell, A., van Montagu, M., Boerjan, W., 2000. Control of lignin biosynthesis. In: SM Jain and SC Minocha, eds, *Molecular Biology of Woody Plants*, Vol 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 227-267.
- Čufar, K., Prislán, P. and Gričar, J. 2008. Cambial activity and wood formation in beech (*Fagus sylvatica*) during the 2006 growth season. *Wood Research*. 53: 1-12.
- Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate G. and Leplé, J.C. 2010. Wood formation in Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies*. 333: 325-334.
- De Micco, V. and Aronne, G. 2007. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. *Biotechnic and Histochemistry*. 82: 209-216.
- Donaldson, L.A. 1991. Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata*. *Wood Science and Technology*. 25: 15-24.
- Donaldson, L.A. 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry*. 57: 839-873.
- Dünisch, O. and Rühmann, O. 2006. Kinetics of cell formation and growth stresses in the secondary xylem of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. and *Khaya ivorensis* A. Chev. (Meliaceae). *Wood Science and Technology*, 40: 49-62.
- Dyckmans, J., Flessa, H., Brinkmann, K., Mai, C. and Polle, A. 2002. Carbon and nitrogen dynamics in acid detergent fiber lignins of beech (*Fagus sylvatica* L.) during the growth phase. *Plant Cell Environ.* 25:469-478.
- Eriksson, I., Lidbrandt, O. and Westermark, U. 1988. Lignin distribution in Birch (*Betula verrucosa*) as determined by mercurisation with SEM-TEM-EDXA. *Wood Science and Technology*. 22: 251-257.
- Frankenstein, C., Eckstein, D. and Schmitt, U. 2005. The onset of cambium activity – a matter of agreement? *Dendrochronologia*. 23: 57-62.
- Fromm, J., Rockel, B., Lautner, S., Windeisen, E. and Wanner, G. 2003. Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. *J Struct Biol*. 143: 77-84.
- Fujino, T. and Itoh, T. 1998. Changes in the three dimensional architecture of the cell wall during lignification of xylem cells in *Eucalyptus tereticornis*. *Holzforschung*. 52: 111-116.

- Fujita, M., Saiki, H. and Harada, H. 1978. The secondary wall formation of compression wood tracheids, III, Cell organelles in relation to cell wall thickening and lignification. *Mokuzai Gakkaishi*. 24: 353–361.
- Fukushima, K. and Terashima, N. 1991. Heterogeneity in formation of lignin, XIV: formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Ginkgo biloba*. *Holzforschung*. 45: 87–94.
- Gindl, W., Grabner, M. and Wimmer, R. 2000. The influence of temperature on latewood lignin content in treeline Norway spruce compared with maximum density and ring width. *Trees*. 14: 409–414.
- Gričar, J., Čufar, K., Oven, P. and Schmitt, U. 2005. Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir during autumn. *Annals of Botany*. 95: 959-965.
- Gričar, J., Zupančič, M., Čufar, K., Koch, G., Schmitt, U. and Oven, P. 2006. Effect of local heating and cooling on cambial activity and cell differentiation in the stem of Norway spruce (*Picea abies*). *Annals of Botany*. 97: 943-951.
- Grima-Pettenati, J. and Goffner, D. 1999. Lignin genetic engineering revisited. *Plant Sci*. 145: 51–65.
- Gruber, A., Baumgartner, D., Zimmermann, J. and Oberhuber, W. 2009. Temporal dynamic of wood formation in *Pinus cembra* along the alpine treeline ecotone and the effect of climate variables. *Trees*. 23: 623-635.
- Grünwald, C., Ruel, K. and Schmitt, U. 2002. Differentiation of xylem cells in *rolC* transgenic aspen trees – A study of secondary cell wall development. *Annals of Forest Science*. 59: 679-685.
- Kim, W.J., Campbell, A.G. and Koch, P. 1989. Chemical variation in Lodgepole pine with latitude, elevation, and diameter class. *For Prod J*. 39: 7–12.
- Marion, L., Gričar, J. and Oven, P. 2007. Wood formation in urban Norway maple trees studied by the micro-coring method. *Dendrochronologia*. 25(2): 97-102.
- Mirshokraie, S.A., Abdulkhani, A. and Karimi, A. 2008. Chemical structure elucidation of milled wood lignin and cellulytic lignin from Poplar. *Iranian Journal of Wood and Paper Science Research*. 23(2): 102-122.
- Mondolot, L., Roussel, J.L. and Andary, C. 2001. New applications for an old lignified element staining reagent. *The Histochemical Journal*. 33: 379–385.
- Nix, L.E. and Villiers, K. 1985. Tracheid differentiation in southern pines during the dormant season. *Wood and Fiber Science*. 17: 397–403.
- Pallardy, S.G., 2008. *Physiology of woody plants*, Academic Press, Burlington, San Diego, London, 454 pp.
- Panshin, A.J. & C. De Zeeuw, 1980. *Textbook of wood technology*, 4th ED., Mc Graw Hill Inc, New York, 722 pp.
- Plomion, C., G. Le Provost and A. Stokes, 2001. Wood formation in trees. *Plant Physiology*. 127: 1513–1523.
- Priestley, J.H., Scott, L.I. and Malins, E.M. 1935. Vessel development in the angiosperms. *Proc Leeds Phil Lit Soc*. 3: 42-54.
- Rossi, S., Anfodillo, T. and Menardi, R. 2006a. Trephor: a new tool for sampling microcores from tree stems. *IAWA Journal*. 27: 89-97.

- Rossi, S., Deslauriers, A. and Anfodillo, T. 2006b. Assessment of cambial activity and xylogenesis by microsampling tree species: an example at the Alpine timberline. *IAWA Journal*. 27: 383-394.
- Rossi, S., Deslauriers, A. and Anfodillo, T. 2007. Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. *Oecologia*. 152: 1-12.
- Rossi, S., Deslauriers, A., Anfodillo, T. and Carrer, M. 2008. Age-dependent xylogenesis in timberline conifers. *New Phytologist*. 177: 199-208.
- Samuels, A.L., Rensing, K.H., Douglas, C.J., Mansfield, S.D., Dharmawardhana, D.P. and Ellis, B.E. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta*. 216: 72-82.
- Schmitt, U., Grünwald, C., Gričar, J., Koch, G. and Čufar, K. 2003. Wall structure of terminal latewood tracheids of healthy and declining silver fir trees in the dinaric region, Slovenia. *IAWA Journal*. 24(1): 41-51.
- Schmitt, U., Jalkanen, R. and Eckstein, D. 2004. Cambium dynamics of *Pinus sylvestris* and *Betula* spp. in the northern boreal forest in Finland. *Silva Fennica*. 38(2): 167-178.
- Schmitt, U. and Melcher, E. 2004. Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. In: Schmitt U, et al., eds. *Wood fibre cell walls: methods to study their formation, structure and properties*. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, pp. 105-118.
- Schweingruber, F.H., 2007. *Wood structure and environment*, Springer Series in Wood Science, Springer, Heidelberg, 279 pp.
- Takabe, K., Fujita, M., Harada, H. and Saiki, H. 1981. Lignification process of Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) tracheids. *Mokuzai Gakkaishi*. 27: 813-820.
- Terashima, N., 2000. Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. In: Kim Y.S. (Ed.), *New horizons in wood anatomy*. Chonnam National University Press, Kwangju, South Korea, pp 169-180.
- Thibeault-Martel, M., Krause, C., Morin, H. and Rossi, S. 2008. Cambial activity and intra-annual xylem formation in roots and stems of *Abies balsamea* and *Picea mariana*. *Annals of Botany*. 102: 667-674.
- Vaganov, E.A., Hughes, M.K. & A.V. Shashkin, 2006. *Growth dynamics of conifer tree rings: image of past and future environments*, Ecological Studies, vol 183, Springer, Berlin, 354 pp.
- Vasquez-Cooz, I. and Meyer, R.W. 2002. A differential staining method to identify lignified and unlignified tissues. *Biotechnic and Histochemistry*. 77: 277-282.
- Whetten, R.W., Mackay, J.J. and Sederoff, R.R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 49: 407-416.
- Wu, J., Fukazawa, K. and Ohtani, J. 1992. Distribution of syringyl and guaiacyl lignins in hardwoods in relation to habitat and porosity form in wood. *Holzforschung*. 46: 181-185.
- Yoshinaga, A., Fujita, M. and Saiki, H. 1992. Relationships between cell evolution and lignin structural varieties in oak xylem evaluated by microscopic spectrophotometry with separated cell walls. *Mokuzai Gakkaishi*. 38: 629-637.

Study of Xylem Lignification in Oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky) Along an Altitudinal Gradient

R. Oladi¹, K. Pourtahmasi², D. Eckstein³ and A. Bräuning⁴

¹ Ph. D. Student, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran

² Associate Prof., Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran

³ Professor, Department of Wood Science, University of Hamburg, Hamburg, Germany

⁴ Professor, Institute of Geography, Friedrich Alexander University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

(Received: 04 July 2010, Accepted: 15 September 2010)

Abstract

Lignin is the second major component of wood and lignification is one of the main developmental steps in wood formation. In this study, the process of xylem lignification and effect of altitude on this process was traced according to physiological sense. For this purpose, three sites were selected in Nowshahr Instructional Forest along an altitudinal gradient (650, 1100 and 1800 m a.s.l, respectively) and micro-cores were extracted from five trees of each site at regular intervals during one growing season. After double staining the samples, lignification procedure was studied under visible and polarized light microscopy. The results showed that elevation rise would not change the pattern of lignification but only shorten this period. Lignification starts in the middle lamella and cell corners extending gradually into the secondary wall toward the cell lumen. It was also observed that vessel elements and tissues adjacent to ray parenchyma lignify sooner and become lignified earlier than the wood fibers. Lignification fulfillment is delayed in the last formed fibers and in some cases the innermost layers of these cells remained unlignified.

Keywords: Lignin, Lignification, Secondary wall thickening, Altitudinal gradient, Oriental Beech, Micro-coring