

## مقایسه کاج الدار با دو شکل طبیعی بوجود آمده از آن با استفاده از صفات بیوشیمیایی و مورفولوژیک

فاطمه شایان مهر<sup>۱</sup>، سید غلامعلی جلالی<sup>۲</sup> و فائزه فغانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> - نویسنده مسئول، کارشناس ارشد جنگل‌داری، پست الکترونیک: fshayanmehr@yahoo.com

<sup>۲</sup> - دانشیار، گروه جنگل‌داری، دانشگاه تربیت مدرس.

<sup>۳</sup> - استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۶

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۹

### چکیده

به منظور تفکیک گونه کاج الدار (*Pinus eldarica* Medw.) از دو نوع کاج بوجود آمده از آن یعنی کاج توپیی و کله‌قندی، تغییرات کیفی آنزیم پراکسیداز به روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در سیستم PAGE و نیز سنجش فعالیت این آنزیم مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین محتوای لیگنین نمونه‌های سوزن و ساقه به همراه ۱۳ صفت ماکرومورفولوژیک پایه‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج، الگوهای ایزوآنزیمی سه نوع کاج مورد مطالعه، میزان فعالیت این آنزیم و محتوای لیگنین کلیه نمونه‌ها را مشابه نشان داد، در حالی که نتایج مقایسه صفات مورفولوژیک بیانگر وجود تفاوت‌های بارز در این کاج‌هاست. این نتایج حکایت از آن دارد که با وجود بروز تفاوت‌های ریختاری واضح و به‌رغم این که آنزیم پراکسیداز به‌عنوان آنزیم غالب و مهم در تغییرات فیزیولوژیکی و مطالعات تکامل گیاهان و بررسی‌های تنوع ژنتیکی و شناسایی جنس، گونه و زیرگونه کاربرد فراوان دارد، ولی بخش محلول (نوع سیتوزولی آن) برای تمایز این کاج‌ها نشانگر مناسبی نمی‌باشد. همچنین استفاده از نشانگرهای مولکولی و مطالعات سیتوژنتیکی برای مشخص کردن علت این امر پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کاج الدار، پراکسیداز، الکتروفورز، مورفولوژی، کاج توپیی، کاج کله‌قندی.

### مقدمه

محیطی سازگار شده است. در این منطقه برخی از پایه‌های این کاج از حالت و شکل طبیعی پایه‌های مادری خود فاصله گرفته و دچار تغییراتی از نظر قامت درخت، شکل و تراکم تاج، اندازه مخروط و بذر شده‌اند. پایه‌های بوجود آمده تحت عنوانهای کاج توپیی و کله‌قندی مشهورند که به دلیل شکل تاج این کاج‌ها و شباهت آنها به این موارد، تحت این نام خوانده می‌شوند. امروزه قامت کوتاه و تاج کروی یا مخروطی آنان سبب شده تا در بسیاری از مناطق به‌عنوان گونه‌ای منحصر به فرد در ایجاد فضای سبز، کاشته شوند.

رویشگاه طبیعی کاج تهران یا کاج الدار (*Pinus eldarica* Medw.) امروزه محدود به کوه منفرد و کم ارتفاعی به نام Eller Oukhi در جنوب شرقی تغلیس گرجستان در ارتفاع ۲۰۰ تا ۶۰۰ متر از سطح دریا و به وسعت ۵۵۰ هکتار می‌باشد (Mirov, 1967). تاریخ ورود احتمالی این درخت به ایران به بیش از ۸۰۰ سال پیش تخمین زده می‌شود (سردابی، ۱۳۶۸؛ جزیره‌ای، ۱۳۸۰؛ میربادین و همکاران، ۱۳۷۳). منطقه نشیمن، در جنوب شهرستان خواف از جمله مناطقی است که کاج الدار از قدیم در آنجا کاشته شده و به‌خوبی با شرایط

*Pinus* در جنس *al.*, 2004; Ponton *et al.*, 2004 صفاتی نظیر اندازه مخروط، طول و وزن بذر، شکل برجستگی خارجی فلس مخروط، در رده‌بندی، شناسایی و تشخیص آنها بسیار مفید و رایج می‌باشد (Aguinagalde *et al.*, 1996; Gil *et al.*, 2002; Mirov, 1967). امروزه روشهای تاکسونومی براساس صفات مورفولوژی بر پایه علم آمار، به دلیل سهولت در اندازه‌گیری و ارزیابی در کنار تجزیه و تحلیل DNA می‌تواند مکملی بر تشخیص روابط فیلوژنی میان گونه‌ها و زیرگونه‌ها باشد (Apavatjrut *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2002).

در این تحقیق، با توجه به نقش اساسی آنزیم پراکسیداز در تشکیل دیواره سلولی، تنظیم رشد و نمو، متابولیسم تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نیز اهمیت و سهولت استفاده از صفات مورفولوژیک در بررسی تنوع ژنتیکی، از مقایسه الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز و فعالیت آن و نیز ویژگیهای مورفولوژیک به همراه محتوای لیگنین سوزن و ساقه در جهت بررسی امکان تفکیک گونه الدار و دو شکل مورفولوژیک بوجود آمده (spec. nova) از آن استفاده شده است.

### مواد و روشها

در این پژوهش برای مقایسه دو کاج توپی و کله‌قندی با شکل اصلی آن (کاج الدار)، نمونه‌های نهال سه ساله از هر یک از منطقه نشتیفان تهیه و به مدت ۵ ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از تثبیت در شرایط گلخانه از نهالها در دو فصل بهار و تابستان (سال ۱۳۸۵) نمونه‌گیری شده و مورد مقایسه آنزیمی قرار گرفتند. برای مطالعه کیفی آنزیم، نمونه‌های سوزن (۱ گرم) با بافر استخراج (تریس- اسید کلریدریک pH=۸، کلرید سدیم، DTT، EDTA) عصاره‌گیری و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و به روش الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE) با ترکیب ۲/۵ درصد آکریل آمید و ۰/۶۳ درصد بیس، تریس- اسید کلریدریک ۱/۵ مولار pH=۸/۸ برای ژل جدا کننده

امروزه استفاده از فناوریهای مولکولی (ایزوآنزیم‌ها و PCR) در مطالعه ویژگیهای بیوشیمیایی برای تمایز ژرمپلاسم گیاهی بسیار گسترش یافته که تخمین بهتری از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتها فراهم کرده است (Andres *et al.*, 1999). ایزوآنزیم‌ها رابطه نزدیکی با محصول ژن دارند. تحرک الکتروفورزی آنها، نتیجه اندازه و شکلهای مختلف مولکول‌های آنزیم می‌باشد که اختلافشان شاخص خوبی از تنوع ژنتیکی است (Rahman *et al.*, 2000). مطالعه الکتروفورزی آنزیم‌ها به‌طور گسترده برای ارزیابی‌های ژنتیکی جمعیتهای گیاهی استفاده می‌شود و تاکنون گونه‌های درختی زیادی (از جمله آلو، پسته، ملج و صنوبر) با استفاده از تنوع ایزوآنزیمی مقایسه شده‌اند. تحقیقات گوناگون نشان داده است که الگوهای ایزوآنزیمی یک ابزار کارآمد و مفید در تمایز گونه‌های گیاهیست (Apavatjrut *et al.*, 1999; Ellstarnd & Lee, 1987). همچنین مطالعات آنزیمی بر روی تعداد زیادی از گونه‌های کاج آمریکای شمالی انجام شده است (Andres *et al.*, 1999; Agustin *et al.*, 2000; Ellstarnd & Lee, 1987; Pashkoulov *et al.*, 1995; Reimers *et al.*, 1992).

با کمک الگوی ایزوآنزیمی پراکسیداز، کولتیوارهای آلو از یکدیگر متمایز شدند (Pashkoulov *et al.*, 1995). با استفاده از تجزیه و تحلیل آنزیم پراکسیداز در جوامع مختلف پده در چین، ۴ کلون متمایز با اختلافهای اساسی تشخیص داده شد (Xuexin, 1991). همچنین بسیاری از داده‌های ایزوآنزیمی مربوط به ملج و هیبریدهای بوجود آمده از آن در اروپا تنها با استفاده از پراکسیداز گزارش شده است (Agustin *et al.*, 2000).

صفات مورفولوژیک نیز از اولین و قدیمی‌ترین ابزارهای طبقه‌بندی گیاهی بوده است. ویژگیهای برگ و میوه در پهن‌برگان و سوزن و مخروط در سوزنی‌برگان به‌طور گسترده در این گونه مطالعات بررسی شده‌اند (Brushi *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 2002; Nakatani *et al.* )

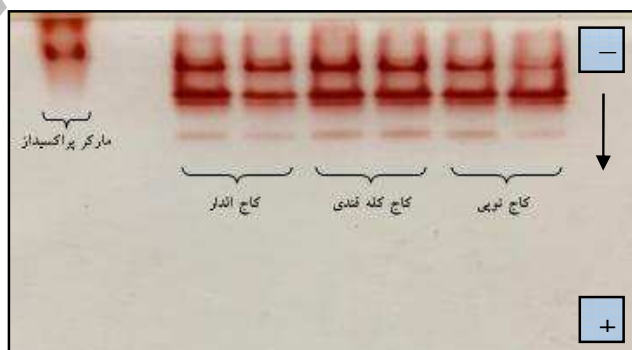
سود ۲ مولار اضافه و با اسید استیک گلاسیال به حجم رسید. محتوای لیگنین با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب ویژه محاسبه گردید (Iiyama & Wallis, 1990). برای اندازه‌گیری مشخصه‌های مورفولوژیک از نهالهای سه‌ساله، قطر تاج، قطر یقه و ارتفاع نهالها و نیز طول سوزن، طول غلاف و قطر سوزنها به همراه غلاف و از پایه‌های مادری موجود در منطقه، مخروط جمع‌آوری و صفات طول مخروط ماده، قطر مخروط، قطر پایک، وزن مخروط، تعداد بذر در هر مخروط، وزن بذر و طول بذر اندازه‌گیری و سپس با استفاده از آزمونهای تک‌متغیره و چندمتغیره مورد مقایسه قرار گرفتند. برای انجام کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزارهای SPSS و PC-ORD استفاده گردید.

### نتایج

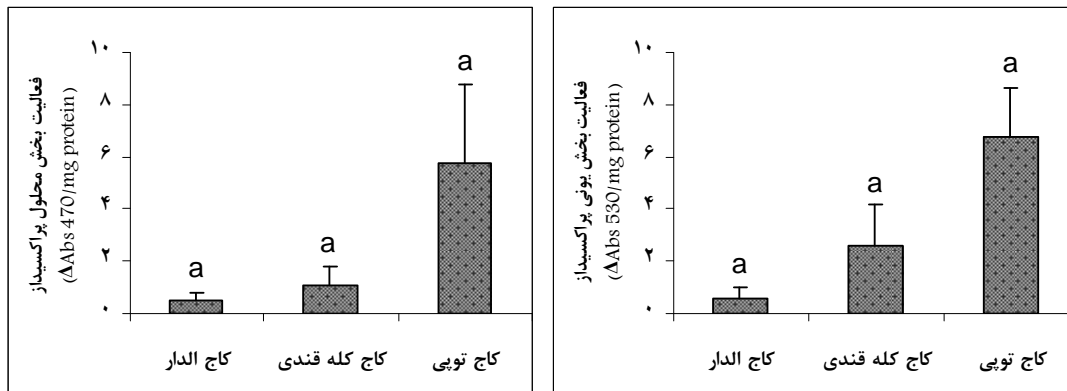
شکل ۱ مقایسه الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز را در سوزنهای کاج الدار با دو شکل جدید آن نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود همه نمونه‌ها الگوی ایزوآنزیمی‌های ثابتی را از نظر کیفی نشان می‌دهند و یا به عبارتی در الگوهای ایزوآنزیمی هر سه نوع کاج، تفاوت خاصی که معرف تفکیک آنها باشد مشاهده نمی‌شود. شکلهای ۲، ۳ و ۴ فعالیت آنزیم پراکسیداز را در سه بخش محلول، یونی و کووالانی نشان می‌دهند (تجزیه واریانس). ملاحظه می‌گردد که این اختلافها به لحاظ آماری در سطح احتمال ۹۵٪ معنی‌دار نبوده است.

با غلظت ۱۲/۵٪ و ۱۵٪ درصد اکریل‌آمید و ۰/۰۱ درصد بیس، تریس- اسید کلریدریک ۰/۵ مولار  $pH=6/8$  برای ژل متراکم کننده با غلظت ۵٪ استفاده گردید (مصطفایی، ۱۳۸۲؛ Reimers *et al.*, 1992). رنگ‌آمیزی اختصاصی آن با محلول ۳- آمینو ۹- اتیل کاربازول،  $in\ in\ di\ methyl\ Tanksley\ \&\ pH=4.5$  پراکسید هیدروژن انجام شد (Orton, 1986).

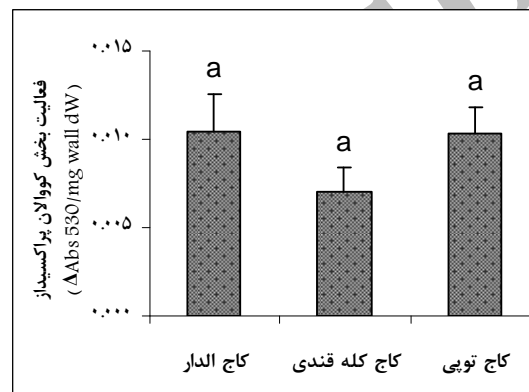
برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه بخش محلول، یونی و کووالانی از اسپکتروفوتومتر استفاده شد. نمونه‌های سوزن با بافر تریس- مالئیک اسید ۴۰ میلی‌مولار عصاره‌گیری شدند. ترکیب واکنش برای سنجش فعالیت بخش محلول شامل: بافر تریس- مالئیک اسید ۴۰ میلی‌مولار، گایاکول ۲۸ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی و برای بخش یونی و کووالانی به جای گایاکول از Syringaldazin ۴۱/۶ میکرومولار استفاده شد و فعالیت آنزیمی به صورت افزایش جذب در طول موج معین در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین نمونه محاسبه گردید (Morita *et al.*, 2006). برای مقایسه مقدار لیگنین، دیواره‌های سلولی نمونه‌های گیاهی (سوزن و ساقه) استخراج گردید (Morita *et al.*, 2006). میزان ۶ گرم از نمونه‌ها با ۲/۵ میلی‌لیتر استیل بروماید (AcBr) ۲۵ درصد (v/w) و ۰/۱ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۷۰ درصد در بن ماری (۷۰°C) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته و بعد از سرد کردن به آن



شکل ۱- باندهای ایزوآنزیمی پراکسیداز حاصل از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (PAGE) با غلظت ۱۲/۵ درصد

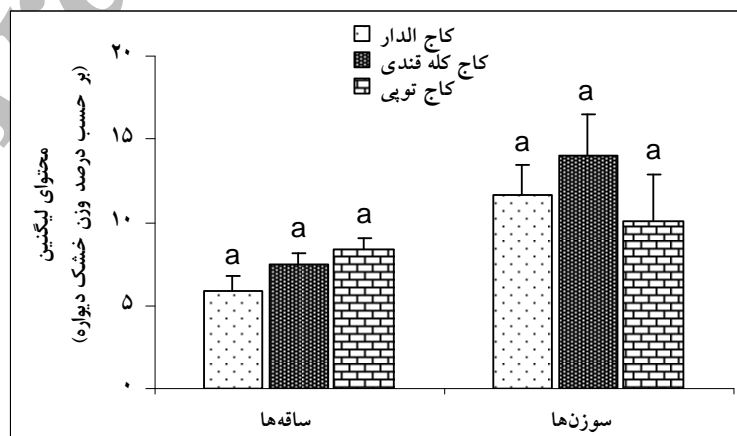


شکل‌های ۲ و ۳- مقایسه فعالیت بخش محلول و یونی آنزیم پراکسیداز در کاج الدار، کله قندی و توپی



شکل ۴- مقایسه فعالیت بخش کووالان آنزیم پراکسیداز در کاج الدار، کله قندی و توپی

شکل ۵ مقایسه میزان لیگنین نمونه‌های سوزن و ساقه نهالهای موردنظر را نشان می‌دهد که نتایج با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه تفاوت معنی‌داری را میان آنها نشان نداده است.



شکل ۵- مقایسه میزان لیگنین موجود در نمونه سوزن و ساقه نهالهای هر سه نوع کاج

قطر سوزن با غلاف و ارتفاع نهال بسیار معنی دار (در سطح احتمال ۹۹ درصد) بوده و بیشترین مقدار میانگین هر یک از این صفات، مربوط به کاج الدار و کمترین آن مربوط به کاج توپی بوده است. کاج کله قندی نیز در حد واسط میان این دو قرار گرفته است. صفات طول غلاف و قطر تاج نهال نیز در کاج الدار بیشتر از دو کاج دیگر بوده، اما کاج کله قندی و توپی تفاوتی به لحاظ آماری نشان ندادند. قطر ساقه نهال نیز تفاوت معنی داری در هیچ یک نشان نداده است.

نتایج تجزیه واریانس ویژگیهای مورفولوژیک نیز در جدول ۱ آورده شده است. چنانچه مشاهده می شود کلیه صفات به غیر از قطر ساقه نهال در سطح ۹۹٪ معنی دار بوده است. نتایج مقایسه میانگین هر یک از ۱۳ صفت مورفولوژیک ذکر شده در هر سه نوع کاج، با استفاده از آزمونهای Tukey HSD و Dunnett T3 نیز در جدول ۲ نشان داده شده است (میانگین  $\pm$  اشتباه معیار). صفاتی نظیر طول مخروط، وزن مخروط، قطر مخروط، قطر پایک مخروط، تعداد بذر در هر مخروط، طول بذر، وزن بذر،

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک (One Way ANOVA):

صفات مورفولوژیک	سطح معنی داری	F	میانگین مربعات	درجه آزادی
طول مخروط (میلی متر)	۰/۰۰۰	۶۶/۶**	۹۱۴/۷	۲
وزن مخروط (گرم)	۰/۰۰۰	۵۳/۴**	۶/۵	۲
قطر حداکثر مخروط (میلی متر)	۰/۰۰۰	۶۰/۶**	۰/۵۲	۲
قطر پایک مخروط (میلی متر)	۰/۰۰۰	۴۳/۸**	۰/۶۸	۲
تعداد بذر در هر مخروط	۰/۰۰۰	۲۴/۸**	۶/۶	۲
طول بذر (میلی متر)	۰/۰۰۰	۹۲/۵**	۱۹/۸	۲
وزن بذر (گرم)	۰/۰۰۰	۱۴۱/۵**	۰/۰۱	۲
طول سوزن (سانتی متر)	۰/۰۰۰	۷/۹**	۰/۱۶	۲
قطر سوزن با غلاف (میلی متر)	۰/۰۰۰	۴۱/۸**	۰/۵۷	۲
طول غلاف (میلی متر)	۰/۰۰۰	۲۳/۹**	۰/۴۶	۲
ارتفاع نهال (سانتی متر)	۰/۰۰۰	۱۶۹/۲**	۲۱۵۶۲/۸	۲
قطر تاج نهال (سانتی متر)	۰/۰۰۰	۴۲/۲**	۰/۲۰	۲
قطر ساقه نهال (میلی متر)	۰/۸۳۴	۰/۱۸ ns	۴/۰۴	۲

\*\* و ns به ترتیب به معنی وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۹۹٪ و عدم وجود اختلاف معنی دار آماریست.

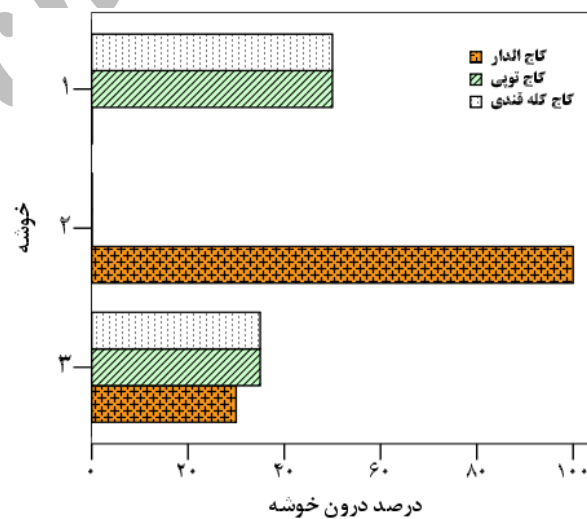
جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک در سه کاج مورد مطالعه با استفاده از آزمون توکی و دانت تی ۳

صفات مورفولوژیک	کاج الدار	کاج کله قندی	کاج توبی
طول مخروط (میلی متر)	۵۹/۲۱ ± ۱/۶۶ a	۴۶/۱۳ ± ۰/۷۲ b	۳۵/۴۱ ± ۱/۷۵ c
وزن مخروط (گرم)	۳۳/۱۹ ± ۵/۱۴ a	۱۷/۱۸ ± ۰/۶۹ b	۴/۹۱ ± ۰/۷۵ c
قطر حداکثر مخروط (میلی متر)	۴۰/۲۷ ± ۱/۱۰ a	۳۰/۵۶ ± ۰/۴۰ b	۲۳/۰۱ ± ۱/۲۴ c
قطر پایک مخروط (میلی متر)	۸/۶۲ ± ۰/۳۰ a	۶/۹۹ ± ۰/۳۸ b	۴/۶۱ ± ۰/۲۳ c
تعداد بذر در هر مخروط	۶۰/۸۳ ± ۲/۶۱ a	۲۳/۷۱ ± ۱/۶۶ b	۱۱/۰۰ ± ۳/۶۰ c
طول بذر (میلی متر)	۷/۶۷ ± ۰/۰۵ a	۷/۱۷ ± ۰/۰۵ b	۶/۴۰ ± ۰/۰۸ c
وزن بذر (گرم)	۰/۰۷ ± ۰/۰۰۱ a	۰/۰۶ ± ۰/۰۰۱ b	۰/۰۴ ± ۰/۰۰۱ c
طول سوزن (سانتی متر)	۱۱/۰۸ ± ۰/۱۹ b	۱۱/۹۰ ± ۰/۱۷ a	۱۰/۹۵ ± ۰/۱۷ b
قطر سوزن با غلاف (میلی متر)	۱/۲۵ ± ۰/۰۲ a	۱/۱۶ ± ۰/۰۱ b	۱/۰۵ ± ۰/۰۱ c
طول غلاف (میلی متر)	۷/۶۷ ± ۰/۱۳ a	۶/۸۳ ± ۰/۰۸ b	۶/۶۲ ± ۰/۱۰ b
ارتفاع نهال (سانتی متر)	۱۴۲/۸۸ ± ۵/۴۰ a	۷۱/۱۳ ± ۴/۲۳ b	۴۲/۰۰ ± ۰/۸۹ c
قطر تاج نهال (سانتی متر)	۵۵/۵۰ ± ۱/۵۱ a	۴۲/۱۳ ± ۰/۸۵ b	۴۲/۱۳ ± ۱/۰۳ b
قطر ساقه نهال (میلی متر)	۲۸/۸۱ ± ۱/۵۹ a	۲۷/۸۱ ± ۰/۸۰ a	۲۹/۱۹ ± ۲/۲۷ a

وجود علامت‌های مشابه در هر ردیف، بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

بیشتری به کاج کله قندی دارد و این دو با کاج الدار یعنی پایه‌های مادری بوجود آمده از آن تفاوت معنی‌داری دارند؛ چنانچه در این تحلیل، دو کاج یادشده در خوشه‌ای مجزا از کاج الدار قرار گرفته‌اند (شکل ۶).

صفات موردنظر همچنین با استفاده از تجزیه خوشه‌ای دو مرحله‌ای (Two Step Cluster) ارزیابی شدند و میزان قرابت این کاج‌ها با یکدیگر با استفاده از کلیه صفات یاد شده مشخص گردید. نتایج این آزمون نشان داد که کاج توبی از نظر صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده شباهت



شکل ۶- نتایج تجزیه خوشه‌ای دو مرحله‌ای با استفاده از مجموع صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده

کاج کله‌قندی و توپی است. علاوه بر این پس از انجام چند تحلیل عاملی و حذف ۲ متغیر نامناسب براساس ملاک کفایت نمونه‌گیری پایین آنها (یعنی قطر یقه نهال و طول غلاف سوزن) از ۱۱ متغیر باقی‌مانده در این تحلیل استفاده گردید.

جدول ۳ مقایسه میانگین ۱۳ صفت مورد مطالعه در هر یک از خوشه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای دو مرحله‌ای را نشان می‌دهد. ملاحظه می‌گردد که در کلیه صفات به غیر از قطر یقه نهال و طول سوزن، مقادیر میانگین مربوط به کاج الدار در سطح احتمال ۹۹٪ بیش از

جدول ۳- مقایسه میانگین ۱۳ صفت مورد مطالعه در هر یک از خوشه‌های بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای دو مرحله‌ای

صفات مورفولوژیک	خوشه ۱	خوشه ۲	معنی‌داری	آماره t
طول سوزنها (سانتی‌متر)	۱۱/۴۴ ± ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۱۱/۰۹ ± ۰/۱۹ <sup>a</sup>	۰/۱۰۶	۱/۶۲۱
قطر سوزنها با غلاف (میلی‌متر)	۱/۱۱ ± ۰/۰۱۰ <sup>b</sup>	۱/۲۵ ± ۰/۰۲۰ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۶/۴۴۵
طول غلاف (میلی‌متر)	۶/۷۳ ± ۰/۰۷ <sup>b</sup>	۷/۶۷ ± ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۶/۴۱۴
طول مخروط (سانتی‌متر)	۴۰/۷۷ ± ۱/۷۴ <sup>b</sup>	۵۹/۲۱ ± ۱/۶۶ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۶/۳۶۲
وزن مخروط (گرم)	۱۱/۰۴ ± ۱/۷۷ <sup>b</sup>	۳۳/۱۹ ± ۵/۱۴ <sup>a</sup>	۰/۰۰۶	-۴/۰۷۴
قطر حداکثر مخروط (میلی‌متر)	۲۶/۷۸ ± ۱/۳۲ <sup>b</sup>	۴۰/۲۷ ± ۱/۱۰ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۶/۶۹۴
قطر پایک مخروط (میلی‌متر)	۵/۸۰ ± ۰/۰۳۹ <sup>b</sup>	۸/۶۲ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۴/۴۱۵
تعداد بذر در هر مخروط	۱۷/۳۶ ± ۲/۵۹ <sup>b</sup>	۹۰/۸۳ ± ۲/۶۱ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۹/۹۹۶
طول بذر بدون باله (میلی‌متر)	۶/۹۷ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۷/۶۷ ± ۰/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۱۰/۰۱۲
وزن بذرها (گرم)	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۱ <sup>b</sup>	۰/۰۷۳ ± ۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۱۰/۸۵۲
ارتفاع نهالها (سانتی‌متر)	۵۶/۵۶ ± ۴/۳۰ <sup>b</sup>	۱۴۲/۸۸ ± ۵/۴۰ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۱۲/۰۰۱
قطر تاج نهالها (سانتی‌متر)	۴۲/۱۳ ± ۰/۶۵ <sup>b</sup>	۵۵/۵۰ ± ۱/۵۱ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰	-۹/۶۰۰
قطر یقه نهال (میلی‌متر)	۲۸/۵۰ ± ۰/۱۷ <sup>a</sup>	۲۸/۸۱ ± ۱/۵۹ <sup>a</sup>	۰/۸۷۸	-۰/۱۵۶

\*\* و ns به ترتیب به معنی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۹۹٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماریست.

علامت‌های a و b در هر ردیف نیز به معنی وجود اختلاف معنی‌دار آماری در هر یک از دو خوشه و علامت‌های مشابه

a در هر ردیف بیانگر خلاف آن است.

در ادامه تحلیل، دو مؤلفه یا عامل اول انتخاب گردیدند. جدول ۵ بارهای عاملی مربوط به دو عامل پس از دوران را نشان می‌دهد که این بارها میزان همبستگی هر متغیر را با مؤلفه‌ها نشان می‌دهند.

در جدول ۴ میزان واریانس بیان شده توسط مؤلفه‌ها و نیز مقادیر ویژه آنها ارائه شده است. از آنجا که دو مؤلفه اول بیش از ۷۰ درصد از واریانس را تبیین می‌نمایند و نیز مقادیر ویژه (Eigen values) بیش از یک دارند، بنابراین

جدول ۴- میزان واریانس بیان شده توسط مؤلفه‌ها و مقادیر ویژه آنها در تحلیل عاملی

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه ابتدایی			مجموع مربعات بارهای استخراج شده			مجموع مربعات بارهای دوران یافته		
	مجموع	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی	مجموع	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی	مجموع	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
۱	۶/۲۸۲	۵۷/۱۰۹	۵۷/۱۰۹	۶/۲۸۲	۵۷/۱۰۹	۵۷/۱۰۹	۶/۲۸۲	۵۵/۱۴۰	۵۵/۱۴۰
۲	۱/۵۲۷	۱۳/۸۸۶	۱۳/۸۸۶	۱/۵۲۷	۱۳/۸۸۶	۷۰/۹۹۵	۷۰/۹۹۵	۱۵/۸۵۴	۷۰/۹۹۵
۳	۰/۹۸۵	۸/۷۰۵	۸/۷۰۵	۰/۹۸۵	۸/۷۰۵	۷۹/۷۰۰	۷۹/۷۰۰		
۴	۰/۸۳۷	۷/۶۰۸	۷/۶۰۸	۰/۸۳۷	۷/۶۰۸	۸۷/۳۰۸	۸۷/۳۰۸		
۵	۰/۵۸۰	۵/۲۷۳	۵/۲۷۳	۰/۵۸۰	۵/۲۷۳	۹۲/۵۷۹	۹۲/۵۷۹		
۶	۰/۴۶۲	۴/۱۹۷	۴/۱۹۷	۰/۴۶۲	۴/۱۹۷	۹۶/۷۷۶	۹۶/۷۷۶		
۷	۰/۱۵۵	۱/۴۰۶	۱/۴۰۶	۰/۱۵۵	۱/۴۰۶	۹۸/۱۸۱	۹۸/۱۸۱		
۸	۰/۱۰۵	۰/۹۵۴	۰/۹۵۴	۰/۱۰۵	۰/۹۵۴	۹۹/۱۳۶	۹۹/۱۳۶		
۹	۰/۰۵۹	۰/۵۳۷	۰/۵۳۷	۰/۰۵۹	۰/۵۳۷	۹۹/۶۷۳	۹۹/۶۷۳		
۱۰	۰/۰۳۰	۰/۲۷۴	۰/۲۷۴	۰/۰۳۰	۰/۲۷۴	۹۹/۹۴۷	۹۹/۹۴۷		
۱۱	۰/۰۰۶	۰/۰۵۳	۰/۰۵۳	۰/۰۰۶	۰/۰۵۳	۱۰۰	۱۰۰		

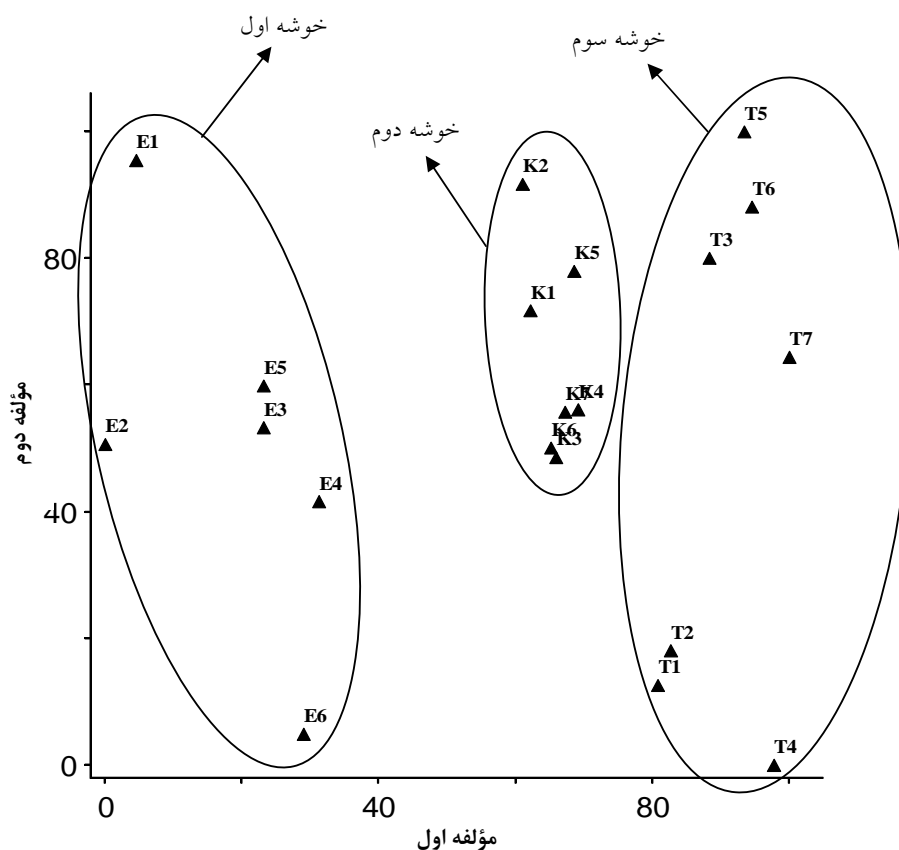
جدول ۵- بارهای عاملی مربوط به دو عامل پس از دوران یا ماتریس مؤلفه‌های دوران یافته

مؤلفه‌ها	صفات مورفولوژیک	
	اول	دوم
۰/۹۷۵	قطر حداکثر مخروط (میلی متر)	
۰/۹۶۸	تعداد بذر در هر مخروط	
۰/۹۶۷	طول مخروط (سانتی متر)	
۰/۹۳۲	وزن مخروط (گرم)	
۰/۸۹۷	قطر پایک مخروط (میلی متر)	
۰/۸۸۸	ارتفاع نهالها (سانتی متر)	
۰/۸۰۱	قطر تاج نهالها (سانتی متر)	
۰/۷۸۹	وزن بذرها (گرم)	
۰/۷۸۶	طول بذر (میلی متر)	
۰/۵۷۵	قطر سوزنها با غلاف (میلی متر)	
-	طول سوزنها (میلی متر)	

کاج الدار (نقاط مشخص شده با حرف E)، دومی، کاج کله‌قندی (نقاط دارای حرف K) و خوشه سوم گویای پایه‌های کاج تویی (نقاط دارای حرف T) است.

نمودار حاصل از پراکنش پایه‌های سه کاج مورد بررسی در فضای محورهای مختصات، براساس دو مؤلفه اول حاصل از تحلیل عاملی بیانگر تفکیک آنها به صورت کاملاً مشخص می‌باشد (شکل ۷). خوشه اول نشان‌دهنده





شکل ۷- نمودار پراکنش کاج‌های مورد مطالعه در فضای محورهای مختصات براساس دو مؤلفه اول تحلیل عاملی (خوشه اول که دارای حرف E است مربوط به کاج الدار بوده و خوشه دوم و سوم که به ترتیب با حروف K و T در شکل نشان داده شده‌اند به کاج کله‌قندی و توپیی تعلق دارند).

چنانچه واضح است کاج توپیی و کله‌قندی حداقل فاصله یا اختلاف را داشته و کاج توپیی و الدار نیز حداکثر فاصله یا اختلاف را از نظر صفات مورفولوژیک مورد مطالعه دارا می‌باشند.

در نهایت با استفاده از تجزیه و تحلیل Quick Cluster فواصل میان مراکز خوشه‌ها (در اینجا منظور هر یک از سه کاج یادشده است) مشخص گردید که نتایج آن در ماتریس کوچکی در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶- فواصل نهایی میان مراکز خوشه‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل Quick Cluster

خوشه	کاج الدار	کاج کله‌قندی	کاج توپیی
کاج الدار	-	۸۸/۹۵۷	۱۲۱/۸۵۳
کاج کله‌قندی	۸۸/۹۵۷	-	۳۴/۵۴۱
کاج توپیی	۱۲۱/۸۵۳	۳۴/۵۴۱	-

## بحث

کاج الدار یکی از ۱۰۵ گونه (و زیرگونه) جنس *Pinus* است که برخی از گیاهشناسان آن را یک گونه مستقل شناخته و عده‌ای دیگر آن را یکی از شکلهای جغرافیایی کاج بروسیا (*Pinus brutia*) یا وارسته‌ای از کاج حلب (*Pinus halepensis* var. *eldarica*) دانسته‌اند. طی مطالعه‌ای که در ایران در مورد رده‌بندی علمی و پراکنش جغرافیایی آن انجام گردید، نتیجه‌گیری شد که گونه کاج موجود در ایران مجزا از *P. halepensis* بوده و از شکلهای جغرافیایی *P. brutia* می‌باشد که از گذشته‌های دور به ایران وارد شده ولی چگونگی ورود آن به ایران هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است (سردابی، ۱۳۶۸؛ جزیره‌ای، ۱۳۸۰؛ میربادین و همکاران، ۱۳۷۳). از ویژگیهای مشترک کاج بروسیا و الدار وجود یک ترپن دو حلقوی (Terpen-3-Carene) بوده که در رزین‌ها و روغنهای فرار آنها یافت می‌شود. بر پایه همین تشابهات، Mirov (1967) این نظریه را عنوان نموده که کاج بروسیا در دوره سوم احتمالاً در اثر هیبرید بین اجداد کاج حلب و کاج جنگلی بوجود آمده، چرا که این ترپن در کاج جنگلی وجود داشته اما در کاج حلب که از جهاتی شبیه کاج بروسیا است به‌چشم نمی‌خورد. به عقیده برخی از محققان، تعدادی از پایه‌های آن از آسیای صغیر در جهت شمال به سمت قفقاز، انتقال یافته و در حدود ۵۰ میلیون سال قبل به گونه کاج الدار منتج شده‌اند (سردابی، ۱۳۶۸؛ جزیره‌ای، ۱۳۸۰؛ میربادین و همکاران، ۱۳۷۳).

مطالعه ایزوآنزیمی مربوط به گونه‌های کاج در اروپا بر روی تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی جمعیت‌های کاج سیلستر و کمپلکس کاج حلب- بروسیا انجام شده است (Andres et al., 1999). در تحقیق حاضر برای بررسی روند تکاملی و جایگاه سیستماتیک دو شکل جدید از گونه کاج الدار از نشانگر آنزیمی پراکسیداز و برخی ویژگیهای بیوشیمیایی متأثر از آن استفاده گردید که الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز در مورد هر سه نوع کاج

مشابه بوده و هیچ‌گونه تفاوتی مشاهده نشد. در مطالعات انجام شده نیز با وجود معرفی چهار ایزوآنزیم اسیدی و دو ایزوآنزیم بازی از پراکسیداز، در سوزنهای پنج لاین مختلف از نوئل (*Picea omorika*)، تفاوتی میان الگوی این ایزوآنزیمها مشاهده نگردید (Bogdanovici et al., 2005). همچنین عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان فعالیت این آنزیم و محتوای لیگنین پایه‌های مورد مطالعه نیز حکایت از آن دارد که به‌رغم این که آنزیم پراکسیداز به‌عنوان آنزیم غالب و مهم در تغییرات فیزیولوژیکی، در مطالعات تکامل گیاهان و بررسیهای تنوع ژنتیکی و شناسایی جنس، گونه و زیرگونه کاربرد فراوانی دارد (Agustin et al., 2000; Pashkoulov et al., 1995; Xuexin, 1991)، اما در عین حال برای تمایز این کاج‌ها، نشانگر مناسبی نمی‌باشد. ذکر این نکته ضروریست که پراکسیدازها دارای انواع مختلف با خواص آنیونی، کاتیونی و خنثی هستند که آنیون پراکسیدازها عمدتاً در آپوپلاسم حضور داشته و در بیوسنتز لیگنین و سوپرین نقش دارند (Morita et al., 2006; Vatulescu et al., 2004). بنابراین می‌توان پیشنهاد نمود که استفاده از آنزیم‌های دخیل در سنتز اسیدهای چرب (نظیر استراز)، برای مشاهده الگوی بانندی و احتمالاً تمایز موجود در بین آنان، ممکن است مفید واقع شده و تا حد زیادی راه‌گشا باشد.

کاتیون پراکسیدازها معمولاً محلول (موجود در سیتوزول) می‌باشند. البته برخی از پراکسیدازهای کاتیونی در آپوپلاسم نیز حضور دارند که نمونه آنها آسکوربات پراکسیداز ویژه‌ایست که با استفاده از آسکوربات (و نه گایاگول) به جمع‌آوری پراکسید هیدروژن در آپوپلاسم می‌پردازد و نمونه دیگر آنها اکسین اکسیدازی است که با تنظیم میزان اکسین در ریخت‌زایی و تعیین الگوهای نمو دخالت دارد (Sanchez et al., 1995). بنابراین ممکن است تفاوت‌های ریختی بارز میان شکلهای جدید کاج الدار با پایه‌های مادری، حاصل تفاوت در الگوی ایزوآنزیم‌های

دچار تردید می‌نماید. به همین دلیل توصیه می‌شود که علت کاهش رویش کاج توپی و کله‌قندی، تغییر فاحش شکل تاج (کپه‌ای و پرپشت شدن تاج) و حتی مینیاتوری شدن مخروط‌ها و بذرها در این کاج‌ها به‌طور دقیق و با بکارگیری روشهای مولکولی و بررسی DNA و یا حتی روشهای سیتوژنتیک بررسی گردد.

### منابع مورد استفاده

- سردابی، ح.، ۱۳۶۸. مونوگرافی کاج الدار. مجموعه مقالات تحقیقات منابع طبیعی، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، چاپ اول، شماره ۵۵: ۱۰۰-۶۸.
- جزیره‌ای، م. ح.، ۱۳۸۰. جنگلکاری در خشکبوم. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، ۴۵۰ صفحه.
- مصطفایی، ع.، ۱۳۸۲. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. انتشارات یادآوران دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، چاپ دوم، ۱۷۳ صفحه.
- میربادین، ع. ر.، شیبانی، ح. ع.، محمدی، م. و میرکاسمی، س. ز.، ۱۳۷۳. علل ضعف فیزیولوژیک کاج الدار پارک چیتگر. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، چاپ اول، ۶۱ صفحه.
- Aguinagalde, I., Llorente, F. and Benito, C., 1996. Relationship among five population Black Pine (*Pinus nigra* Arn.) using morphometric and isozyme markers. *Silvae Genetica*, 46(1): 1-9.
- Agustin, C.M.A., AgUndez, D. and Gil, L., 2000. Identification of native and hybrid elms in Spain using isozyme gene markers. *The Genetic Society of Great Britain, Heredity*, 85: 157-166.
- Andres, F.G., Pita, J.M. and Ortiz, J.M., 1999. Identification of Iberian and Canarian species of the genus *Pinus* with four isoenzyme systems. *Biochemical, Systematics and Ecology*, 27: 235-242.
- Apavatjirut, P., Anuntalabhochai, S., Sirirugsa, P. and Alisi, C., 1999. Molecular markers in the identification of some early flowering *Curcuma* L. (*Zingiberaceae*) species. *Annals of Botany*, 84: 529-534.
- Bogdanovici, J., Ducici, T., Milosavic, N., Vujcic, Z., Sijacic, M., Isaje, V. and Radotic, K., 2005. Antioxidant enzymes in the needles of different omorika lines Arch. Biol. Sci. Belgrade, 57 (4): 277-282.
- Brushi, P., Grossoni, P. and Bussotti, F., 2003. Within and among tree variation in leaf morphology of

پراکسیدازهای کاتیونی آپوپلاسمی به‌ویژه در مریستم‌های رأسی باشد.

به‌هرحال صفات مورفولوژیک، اختلافهای بسیار بارزتری را در مقایسه با ویژگیهای کمی و کیفی آنزیم مورد مطالعه در این کاج‌ها نشان دادند. صفات وابسته به مخروط و بذر به‌همراه ارتفاع نهال و قطر سوزن با غلاف، بهترین صفات در جهت نشان دادن تمایز مورفولوژیک ایجاد شده تشخیص داده شدند؛ چرا که بیشترین میانگین هر یک از این ویژگیها به‌ترتیب مربوط به کاج الدار، کله‌قندی و توپی بوده است. صفت طول سوزن تنها مورد نقض روند نزولی از کاج الدار به توپی بوده است. به‌طوری‌که بیشترین میانگین را کاج کله‌قندی به‌خود اختصاص داده است. بنابراین صفت اخیر به تنهایی نمی‌تواند در تحلیل تمایز مورد استناد قرار گیرد. همچنین با استفاده از نتایج تحلیل عاملی مشخص گردید که قطر یقه نهال، طول غلاف سوزن و طول سوزن به هیچ وجه متغیرهای مناسبی در بیان تغییرات بدست آمده در کاج‌های جدید نمی‌باشند و سایر صفات از جمله صفات مربوط به نهال و مخروط و بذر در ایجاد واریانس‌ها نقش بسزایی داشته که نتایج این تحلیل نیز مشابهت زیادی با نتایج مقایسه تک‌متغیره صفات داشته است. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای دومرحله‌ای می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که دو کاج توپی و کله‌قندی قرابت فنوتیپی بیشتری با یکدیگر داشته و از نظر مورفولوژیک کاملاً مجزا از کاج الدار هستند. اگرچه این تجزیه و تحلیل، کاج توپی و کله‌قندی را در یک خوشه قرار داده است، اما براساس نمودار پراکنش پایه‌های درختی (شکل ۷) می‌توان اظهار نمود که این دو کاج نیز دارای ویژگیهای مختص به‌خود و مجزا از یکدیگر بوده و می‌توانند به‌نوعی واریته‌هایی از کاج الدار محسوب شوند. البته اظهار قطعی مورد اخیر تنها از طریق مطالعه دقیق مولکولی قابل استناد است. به‌هرحال وجود اختلافهای فاحش ظاهری در این کاج‌های نوظهور با پایه‌های مادری، اطلاق نام الدار را به شکل‌های جدید

- Ponton, S., Dupouey, J.L. and Dreyer, E., 2004. Leaf morphology as species indicator in seedlings of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.: modulation by irradiance and growth flush. *Ann. For. Sci.* 61: 73-80.
- Rahman, M.M., Nito, N. and Isshiki, S., 2000. Cultivar identification of yuzu (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) and related acid citrus by leaf isozymes. *Scientia Horticulturae*, 87: 191-198.
- Reimers, P., Guo, A. and Leach J.A., 1992. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and Rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology*, 99: 1044-1050.
- Sanchez, M., Revilla, G. and Zarra, I., 1995. Changes in peroxidase activity associated with cell walls during pine hypocotyl growth. *Annals of Botany*, 75: 415-419.
- Tanksley, S.D. and Orton, T.J., 1986. Developments in plant genetics and breeding isozymes, in plant genetics and breeding. Second impression, Elsevier Science Publishers B.V., 516 p.
- Vatulescu, A.D., Fortunato, A.S., Maria Claudia, S., Amancio, S., Candido, P. Ricardo, P. and Jackson, P.A., 2004. Cloning and characterization of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 609-615.
- Xuexin, S., 1991. An approach on genetics and variation of peroxidase of natural *Populus euphratica* population. *Journal of Desert Research*, 11:1-8.
- *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Natural Population Trees*, 17: 164-172.
- Ellstarnd, N.C. and Lee, J.M., 1987. Cultivar identification of cherimoya (*Ammona cherimola* Mill.) using isozyme markers. *Scientia Horticulturae*, 32: 25-31.
- Gil, L., Climent, J., Nanos, N., Mutke, S., Ortiz, I. and Schiller, G., 2002. Cone morphology variation in *Pinus canariensis* Sm. *Plant Systematic and Evolution*, 235: 35-51.
- Iiyama, K. and Wallis, A.F.A., 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food. Agric.*, 51: 145-161.
- Mirov N.T., 1967. The genus *Pinus*. University of California, Berkley, The Roland Press Company, Newyork, 602 p.
- Morita, A., Yokota, H., Rahmati Ishka, M. and Ghanati, F., 2006. Changes in peroxidase activity and lignin content of cultures tea cells in response to excess manganese. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52: 26-31.
- Nakatani N., Kume A., Kobayashi T., Hirakawa T. and Sakugawa H., 2004. Needle morphology related to chemical contents in the needles of Japanese fir (*Abies firma*) trees subjected to acidic depositions at MT. Oyama, Eastern Japan. *Water, Air and Soil Pollution*, 152: 97-110.
- Pashkoulov, D., Givondov, A. and Yliev, P., 1995. Isozyme variability in plum (*Prunus domestica*) and its use for cultivar and interspecific hybrid identification. Plum Experimental station, Drianovo, Bulgaria. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 9 (1): 33-35.

Archive of SID

## Comparison of *Pinus eldarica* Medw. with its two natural generated forms using some biochemical and morphological traits

F. Shayanmehr<sup>1\*</sup>, Gh.A. Jalali<sup>2</sup> and F. Ghanati<sup>3</sup>

1\* - Corresponding author, M.Sc. in forestry. E-mail: fshayanmehr@yahoo.com

2- Associate Prof., Department of Forestry, Tarbiat Modares University, Iran.

3- Assistant Prof., Department of Plant Science, Tarbiat Modares University, Iran.

### Abstract

In order to distinguish the Mondell pine species (*Pinus eldarica*) from its two natural generated morphotypes (i.e. Ball-shaped and Conical-shaped pines), qualitative alteration of peroxidase enzyme and the assessment of the enzyme activity were compared by use of polyacrylamide electrophoretic method on PAGE system. Furthermore, lignin contents of the needle and stem samples along with 13 macro morphological characteristics of individuals were compared with each other. Results showed that the isozyme pattern of three types of the studied pines, the activity of this enzyme and lignin contents were similar. Whereas, the morphological traits comparison, indicate clear differences in the pines. These, state that despite of obvious morphological differences and application of peroxidase enzyme in physiological changes, plant evolution studies, genetic consideration and identifying genus, species and subspecies but at least soluble portion is not suitable marker for distinction of these pines. The results of this study also, propose to use of molecular markers and cytogenetically studies in order to specify the cause of this occurrence.

**Key words:** Mondell pine, peroxidase, electrophoresis, morphotype, ball-shaped and conical-shaped pine.

Archive of SID