فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۱۷ شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۰۲-۲۹۰، (۱۳۸۸)

مقایسه کاج الدار با دو شکل طبیعي بوجود آمده از آن با استفاده از صفات بیوشیمیایي و مورفولوژیك

فاطمه شایان‌مهر[۱*]، سید غلامعلی جلالی[۲] و فائزه قناتی[۳]

۱* - نویسنده مسئول، کارشناس ارشد جنگل‌داری، پست الکترونیک: fshayanmehr@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه جنگل‌داری، دانشگاه تربیت مدرس.

۳- استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/٦ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۹

چکیده

به‌منظور تفکیک گونه کاج الدار (*Pinus eldarica* Medw.) از دو نوع کاج بوجود آمده از آن یعنی کاج توپی و کله‌قندی، تغییرات کیفی آنزیم پراکسیداز به‌روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در سیستم PAGE و نیز سنجش فعالیت این آنزیم مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین محتوای لیگنین نمونه‌های سوزن و ساقه به‌همراه 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، درحالی‌که 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 توپی، کاج کله‌قندی.

مقدمه

رویشگاه طبیعی کاج تهران یا کاج الدار (*Pinus eldarica* Medw.) امروزه محدود به کوه منفرد و کم ارتفاعی به‌نام Eller Oukhi در جنوب‌شرقی تفلیس گرجستان در ارتفاع ۲۰۰ تا ٦۰۰ متر از سطح دریا و به‌وسعت ۵۵۰ هکتار می‌باشد (Mirov, 1967). تاریخ ورود احتمالی این درخت به ایران به بیش از ۸۰۰ سال پیش تخمین زده می‌شود (سردابی، ۱۳٦۸؛ جزیره‌ای، ۱۳۸۰؛ میربادین و همکاران، ۱۳۷۳). منطقه نشتیفان، در جنوب شهرستان خواف ازجمله مناطقی است که کاج الدار از قدیم در آنجا کاشته شده و به‌خوبی با شرایط 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 توپی و کله‌قندی مشهورند که به‌دلیل 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 به‌فرد در ایجاد فضای سبز، کاشته شوند.

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 (ازجمله 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 ایزوزایمی 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، ٤ کلون متمایز با اختلافهای اساسی تشخیص داده شد (Xuexin, 1991). همچنین بسیاری از داده‌های ایزوزایمی 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*., 2004; Ponton *et al*., 2004). در جنس *Pinus* 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 تاکزونومی براساس صفات مورفولوژی بر پایه علم آمار، به‌دلیل 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 به‌همراه 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

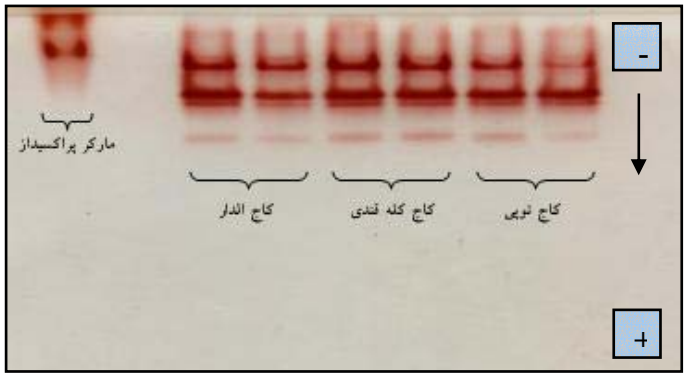
در این پژوهش برای مقایسه دو کاج توپی و کله‌قندی با شکل اصلی آن (کاج الدار)، نمونه‌های نهال سه ساله از هر یک از منطقه نشتیفان تهیه و به‌مدت ۵ ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از تثبیت در شرایط گلخانه از نهالها در دو فصل بهار و تابستان (سال ۱۳۸۵) نمونه‌گیری شده و مورد مقایسه آنزیمی قرار گرفتند. برای مطالعه کیفی آنزیم، نمونه‌های سوزن (۱ گرم) با بافر استخراج (تریس- اسید کلریدریک pH=۸، کلرید سدیم، DTT، EDTA) عصاره‌گیری و به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و به‌روش الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE) با ترکیب ۲/۵ درصد اکریل‌آمید و ۰/٦۳ درصد بیس، تریس- اسید کلریدریک ۱/۵ مولار pH=۸/۸ برای ژل جدا کننده

با غلظت ۱۲/۵٪ و ۱۵٪ درصد اکریل‌آمید و ۰/۰۱ درصد بیس، تریس- اسید کلریدریک ۰/۵ مولار pH=٦/٨ 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، ان ان دی متیل شکلامید، استات سدیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و pH=4.5، پراکسید هیدروژن انجام شد (Tanksley & Orton, 1986).

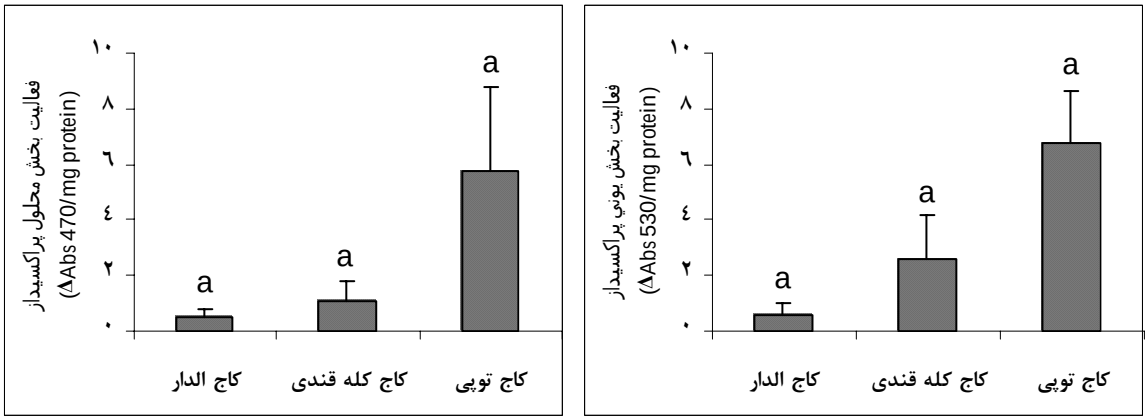
برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه بخش محلول، یونی و کووالانی از اسپکتروفتومتر استفاده شد. نمونه‌های سوزن با بافر تریس- مالئیک اسید ٤٠ میلی‌مولار عصاره‌گیری شدند. ترکیب واکنش برای سنجش فعالیت بخش محلول شامل: بافر تریس- مالئیک اسید ٤٠ میلی‌مولار، گایاکول ۲۸ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی و برای بخش یونی و کووالانی به‌جای گایاکول از Syringaldazin ٤١/٦ میکرومولار استفاده شد و فعالیت آنزیمی به‌صورت افزایش جذب در طول موج معین در دقیقه به‌ازای 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 ٦ 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 (٧٠°C) به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته و بعد از سرد کردن به آن 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 به‌همراه 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

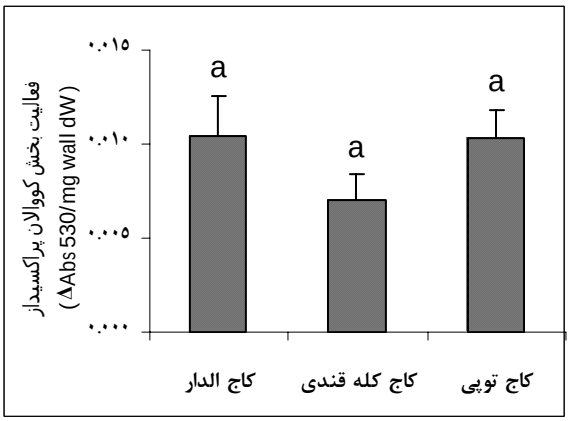
شکل ۱ مقایسه الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز را در سوزنهای کاج الدار با دو شکل جدید آن نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود همه نمونه‌ها الگوی ایزوآنزیم‌های ثابتی را از نظر کیفی نشان می‌دهند و یا به‌عبارتی در الگوهای ایزوآنزیمی هر سه نوع کاج، تفاوت خاصی که معرف تفکیک آنها باشد مشاهده نمی‌شود. شکلهای ۲، ۳ و ٤ فعالیت آنزیم پراکسیداز را در سه بخش محلول، یونی و کووالانی نشان می‌دهند (تجزیه واریانس). ملاحظه می‌گردد که این اختلاف‌ها به‌لحاظ آماری در سطح احتمال ۹۵٪ معنی‌دار نبوده است.



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

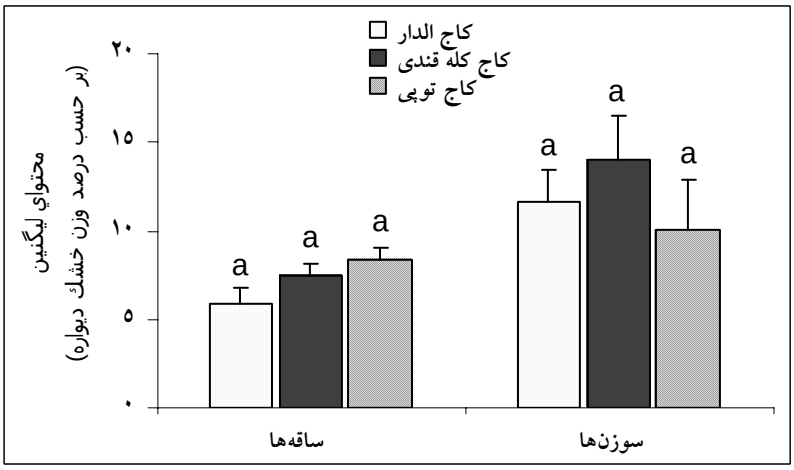


شکلهای ۲ و ۳- مقایسه فعالیت بخش محلول و یونی آنزیم پراکسیداز در کاج الدار، کله‌قندی و توپی



شکل ٤- مقایسه فعالیت بخش کووالان آنزیم پراکسیداز در کاج الدار، کله‌قندی 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

نتایج تجزیه واریانس ویژگیهای مورفولوژیک نیز در جدول ۱ آورده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود کلیه صفات به‌غیر از قطر ساقه نهال در سطح ۹۹٪ معنی‌دار 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± اشتباه معیار). صفاتی نظیر طول مخروط، وزن مخروط، قطر مخروط، قطر پایک مخروط، تعداد بذر در هر مخروط، طول بذر، وزن بذر، قطر سوزن با غلاف و ارتفاع نهال بسیار معنی‌دار (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 کله‌قندی 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 کله‌قندی و توپی تفاوتی به‌لحاظ آماری نشان ندادند. قطر ساقه نهال نیز تفاوت معنی‌داری در هیچ یک نشان نداده است.

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

صفات مورفولوژیک	سطح معنی‌داری	F	میانگین مربعات	درجه آزادی
طول مخروط (میلی‌متر)	۰/۰۰۰	٦٦/٦**	۹۱٤/۷	۲
وزن مخروط (گرم)	۰/۰۰۰	۵۳/٤**	٦/۵	۲
قطر حداکثر مخروط (میلی‌متر)	۰/۰۰۰	٦۰/٦**	۰/۵۲	۲
قطر پایک مخروط (میلی‌متر)	۰/۰۰۰	٤۳/۸**	۰/٦۸	۲
تعداد بذر در هر مخروط	۰/۰۰۰	۲٤/۸**	٦/٦	۲
طول بذر (میلی‌متر)	۰/۰۰۰	۹۲/۵**	۱۹/۸	۲
وزن بذر (گرم)	۰/۰۰۰	۱٤۱/۵**	۰/۰۱	۲
طول سوزن (سانتی‌متر)	۰/۰۰۰	۷/۹**	۰/۱٦	۲
قطر سوزن با غلاف (میلی‌متر)	۰/۰۰۰	٤۱/۸**	۰/۵۷	۲
طول غلاف (میلی‌متر)	۰/۰۰۰	۲۳/۹**	۰/٤٦	۲
ارتفاع نهال (سانتی‌متر)	۰/۰۰۰	۱٦۹/۲**	۲۱۵٦۲/۸	۲
قطر تاج نهال (سانتی‌متر)	۰/۰۰۰	٤۲/۲**	۰/۲۰	۲
قطر ساقه نهال (میلی‌متر)	۰/۸۳٤	۰/۱۸ ns	٤/۰٤	۲

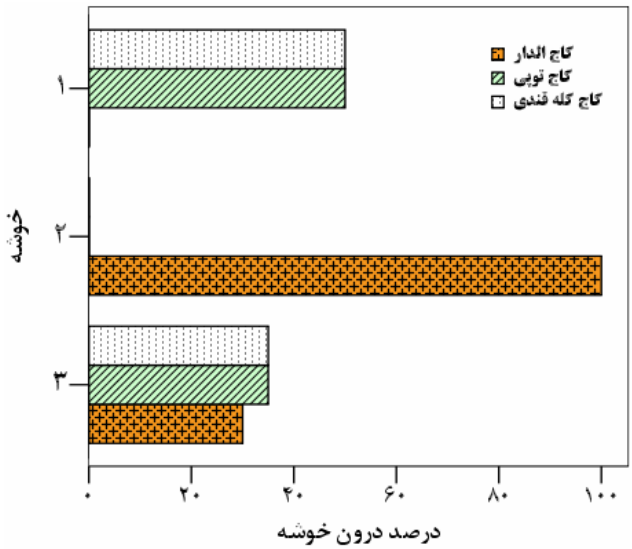
** و ns به‌ترتیب به‌معنی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۹۹٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماریست.

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 کله‌قندی	کاج توپی
طول مخروط (میلی‌متر)	۵۹/۲۱ ± ۱/٦٦ a	٤٦/۱۳ ± ۰/۷۲ b	۳۵/٤۱ ± ۱/۷۵ c
وزن مخروط (گرم)	۳۳/۱۹ ± ۵/۱٤ a	۱۷/۱۸ ± ۰/٦۹ b	٤/۹۱ ± ۰/۷۵ c
قطر حداکثر مخروط (میلی‌متر)	٤۰/۲۷ ± ۱/۱۰ a	۳۰/۵٦ ± ۰/٤۰ b	۲۳/۰۱ ± ۱/۲٤ c
قطر پایک مخروط (میلی‌متر)	۸/٦۲ ± ۰/۳۰ a	٦/۹۹ ± ۰/۳۸ b	٤/٦۱ ± ۰/۲۳ c
تعداد بذر در هر مخروط	٦۰/۸۳ ± ۲/٦۱ a	۲۳/۷۱ ± ۱/٦٦ b	۱۱/۰۰ ± ۳/٦۰ c
طول بذر (میلی‌متر)	۷/٦۷ ± ۰/۰۵ a	۷/۱۷ ± ۰/۰۵ b	٦/٤۰ ± ۰/۰۸ c
وزن بذر (گرم)	۰/۰۷ ± ۰/۰۰۱ a	۰/۰٦ ± ۰/۰۰۱ b	۰/۰٤ ± ۰/۰۰۱ c
طول سوزن (سانتی‌متر)	۱۱/۰۸ ± ۰/۱۹ b	۱۱/۹۰ ± ۰/۱۷ a	۱۰/۹۵ ± ۰/۱۷ b
قطر سوزن با غلاف (میلی‌متر)	۱/۲۵ ± ۰/۰۲ a	۱/۱٦ ± ۰/۰۱ b	۱/۰۵ ± ۰/۰۱ c
طول غلاف (میلی‌متر)	۷/٦۷ ± ۰/۱۳ a	٦/۸۳ ± ۰/۰۸ b	٦/٦۲ ± ۰/۱۰ b
ارتفاع نهال (سانتی‌متر)	۱٤۲/۸۸ ± ۵/٤۰ a	۷۱/۱۳ ± ٤/۲۳ b	٤۲/۰۰ ± ۰/۸۹ c
قطر تاج نهال (سانتی‌متر)	۵۵/۵۰ ± ۱/۵۱ a	٤۲/۱۳ ± ۰/۸۵ b	٤۲/۱۳ ± ۱/۰۳ b
قطر ساقه نهال (میلی‌متر)	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 ۹۵٪ است.

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 توپی از نظر صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده شباهت بیشتری به کاج کله‌قندی 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 ٦).



شکل ٦- نتایج تجزیه خوشه‌ای دو مرحله‌ای با استفاده از مجموع صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده

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 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 بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای دو مرحله‌ای

صفات مورفولوژیک	خوشه ۱	خوشه ۲	معنی‌داری	آماره t
طول سوزنها (سانتی‌متر)	۱۱/٤٤ ± ۰/۱۳ a	۱۱/۰۹ ± ۰/۱۹ a	۰/۱۰٦	۱/٦۲۱ ns
قطر سوزنها با غلاف (میلی‌متر)	۱/۱۱ ± ۰/۰۱۰ b	۱/۲۵ ± ۰/۰۲۰ a	۰/۰۰۰	- ٦/٤٤٥ **
طول غلاف (میلی‌متر)	٦/۷۳ ±۰/۰۷ b	۷/٦۷ ±۰/۱۳ a	۰/۰۰۰	- ٦/٤۱٤ **
طول مخروط (سانتی‌متر)	٤۰/۷۷ ± ۱/۷٤ b	۵۹/۲۱ ± ۱/٦٦ a	۰/۰۰۰	-٦/۳٦۲ **
وزن مخروط (گرم)	۱۱/۰٤ ± ۱/۷۷ b	۳۳/۱۹ ± ۵/۱٤ a	۰/۰۰٦	-٤/۰۷٤ **
قطر حداکثر مخروط (میلی‌متر)	۲٦/۷۸ ± ۱/۲۲ b	٤۰/۲۷ ± ۱/۱۰ a	۰/۰۰۰	-٦/٦۹٤ **
قطر پایک مخروط (میلی‌متر)	۵/۸۰ ± ۰/۳۹ b	۸/٦۲ ± ۰/۳۰ a	۰/۰۰۰	-٤/٤۱۵ **
تعداد بذر در هر مخروط	۱۷/۳٦ ± ۲/۵۹ b	۹۰/۸۳ ± ۲/٦۱ a	۰/۰۰۰	-۹/۹۹٦ **
طول بذر بدون باله (میلی‌متر)	٦/۹۷ ± ۰/۰۵ b	۷/٦۷ ± ۰/۰۵ a	۰/۰۰۰	-۱۰/۰۱۲ **
وزن بذرها (گرم)	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۱ b	۰/۰۷۳ ± ۰/۰۰۱ a	۰/۰۰۰	-۱۰/۸۵۲ **
ارتفاع نهالها (سانتی‌متر)	۵٦/۵٦ ± ٤/۳۰ b	۱٤۲/۸۸ ± ۵/٤۰ a	۰/۰۰۰	-۱۲/۰۰۱ **
قطر تاج نهالها (سانتی‌متر)	٤۲/۱۳ ± ۰/٦۵ b	۵۵/۵۰ ± ۱/۵۱ a	۰/۰۰۰	-۹/٦۰۰ **
قطر یقه نهال (میلی‌متر)	۲۸/۵۰ ± ۰/۱۷ a	۲۸/۸۱ ± ۱/۵۹ a	۰/۸۷۸	-۰/۱۵٦ ns

** و ns به‌ترتیب به‌معنی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۹۹٪ و عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماریست.
علامت‌های a و b در هر ردیف نیز به‌معنی وجود اختلاف معنی‌دار آماری در هر یک از دو خوشه و علامت‌های مشابه a در هر ردیف بیانگر خلاف آن است.

در جدول ٤ 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 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.

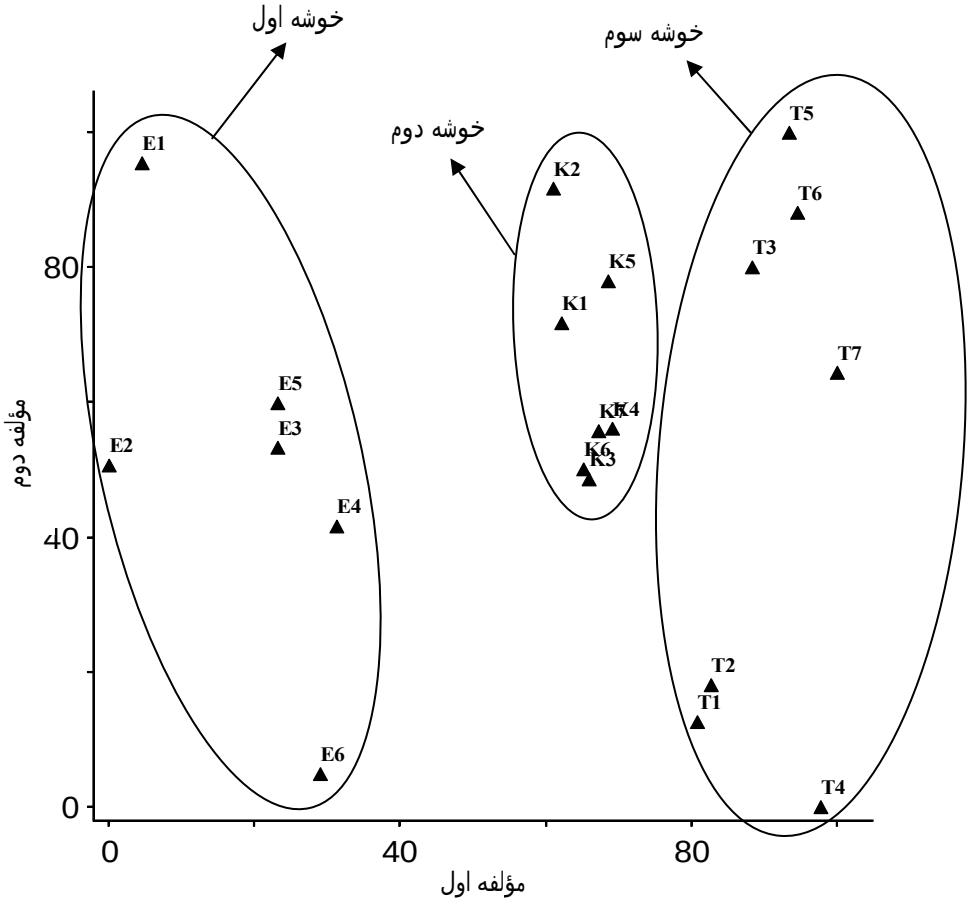
جدول ٤- میزان واریانس بیان شده توسط مؤلفه‌ها و مقادیر ویژه آنها در تحلیل عاملی

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	٦/۲۸۲	۵۷/۱۰۹	۵۷/۱۰۹	٦/۲۸۲	۵۷/۱۰۹	۵۷/۱۰۹	٦/۰٦۵	۵۵/۱٤۰	۵۵/۱٤۰
۲	۱/۵۲۷	۱۳/۸۸٦	۷۰/۹۹۵	۱/۵۲۷	۱۳/۸۸٦	۷۰/۹۹۵	۱/۷٤٤	۱۵/۸۵٤	۷۰/۹۹۵
۳	۰/۹۸۵	۸/۷۰۵	۷۹/۷۰۰						
٤	۰/۸۳۷	۷/٦۰۸	۸۷/۳۰۸						
۵	۰/۵۸۰	۵/۲۷۳	۹۲/۵۷۹						
٦	۰/٤٦۲	٤/۱۹۷	۹٦/۷۷٦						
۷	۰/۱۵۵	۱/٤۰٦	۹۸/۱۸۱						
۸	۰/۱۰۵	۰/۹۵٤	۹۹/۱۳٦						
۹	۰/۰۵۹	۰/۵۳۷	۹۹/٦۷۳						
۱۰	۰/۰۳۰	۰/۲۷٤	۹۹/۹٤۷						
۱۱	۰/۰۰٦	۰/۰۵۳	۱۰۰						

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

صفات مورفولوژیک	مؤلفه‌ها	
	اول	دوم
قطر حداکثر مخروط (میلی‌متر)	۰/۹۷۵	
تعداد بذر در هر مخروط	۰/۹٦۸	
طول مخروط (سانتی‌متر)	۰/۹٦۷	
وزن مخروط (گرم)	۰/۹۳۲	
قطر پایک مخروط (میلی‌متر)	۰/۸۹۷	
ارتفاع نهالها (سانتی‌متر)	۰/۸۸۸	
قطر تاج نهالها (سانتی‌متر)	۰/۸۰۱	
وزن بذرها (گرم)		۰/۷۸۹
طول بذر (میلی‌متر)		۰/۷۸٦
قطر سوزنها با غلاف (میلی‌متر)		۰/۵۷۵
طول سوزنها (میلی‌متر)		-

نمودار حاصل از پراکنش پایه‌های سه کاج مورد بررسی در فضای محورهای مختصات، براساس دو مؤلفه اول حاصل از تحلیل عاملی بیانگر تفکیک آنها به‌صورت کاملاً مشخص می‌باشد (شکل ۷). خوشه اول نشان‌دهنده کاج الدار (نقاط مشخص شده با حرف E)، دومی، کاج کله‌قندی (نقاط دارای حرف K) و خوشه سوم گویای پایه‌های کاج توپی (نقاط دارای حرف T) است.



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 به‌ترتیب با حروف K و T در شکل نشان داده شده‌اند به کاج کله‌قندی و توپی تعلق دارند).

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

جدول ٦- فواصل نهایی میان مراکز خوشه‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل Quick Cluster

خوشه	کاج الدار	کاج کله‌قندی	کاج توپی
کاج الدار	-	۸۸/۹۵۷	۱۲۱/۸۵۳
کاج کله‌قندی	۸۸/۹۵۷	-	۳٤/٥٤۱
کاج توپی	۱۲۱/۸۵۳	۳٤/٥٤۱	-

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 واریته‌ای 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، ۱۳٦۸؛ 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، ۱۳٦۸؛ جزیره‌ای، ۱۳۸۰؛ میربادین و همکاران، ۱۳۷۳).

مطالعه ایزوآنزیمی مربوط به گونه‌های کاج در اروپا بر روی تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی جمعیتهای کاج سیلوستر 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 ایزوزایمی 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 سوبرین 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 باندی 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

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 ازجمله 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 دچار تردید می‌نماید. به‌همین 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.، ۱۳٦۸. مونوگرافی کاج الدار. مجموعه مقالات تحقیقات منابع طبیعی، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، چاپ اول، شماره ۵۵: ۱۰۰– ٦۸.
- جزیره‌ای، م. ح.، ۱۳۸۰. جنگلکاری در خشکبوم. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، ٤۵۰ 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 میرکاظمی س.ز.، ۱۳۷۳. علل ضعف فیزیولوژیک کاج الدار پارک چیتگر. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، چاپ اول، ٦۱ 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.
- Apavatjrut, 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

- 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 Publishrs 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 auphratica* 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 (*Annona 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.

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

F. Shayanmehr[1*], Gh.A. Jalali[2] and F. Ghanati[3]

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.