ارزیابی تمایز مورفولوژیك كاج الدار[۱] و دو فرم طبیعی به‌وجود آمده از آن با استفاده از الگوی الکتروفورزی صفحه SDS، صفات مورفولوژیك و برخی شاخص‌های فیزیولوژیك

فاطمه شایان مهر، سید غلامعلی جلالی، فائزه قناتی، داود کرتولی نژاد: دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

برای بررسی و تفکیك گونهٔ کاج الدار و دو فرم مورفولوژیك به‌وجود آمده از آن، نمونه‌های برگ سوزنی نهال‌های سه ساله در شرایط یك‌سان عصاره‌گیری شدند. الگوی باندهای پروتئینی نمونه‌ها به روش الکتروفورز SDS-PAGE مقایسه شد. ۱۲ صفت مورفولوژیك نهال و پایه‌های مادری سه نوع کاج نیز با یك‌دیگر مقایسه شدند. مقدار پروتئین کل نمونه‌ها به روش برادفورد و نیز محتوای کلروفیل a و b نمونه‌ها به روش هاربورن و با استفاده از اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شده است که الکتروفورز پروتئین تك بعدی نمونه‌ها الگوهای باندی کاملاً مشابهی را برای هر سه نوع کاج بررسی شده (الداریکا و دو کاج کله‌قندی و توپی) نشان داد. میزان پروتئین کل و محتوای کلروفیل a و b نمونه‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در صورتی که ۱۱ صفت از ویژگی‌های مورفولوژیك اندازه‌گیری شده در کاج الدار بیش از دو کاج دیگر بوده است. این نتایج حاکی از نبودن اختلاف بیوشیمیایی بین کاج‌ها، علی رغم وجود تفاوت‌های بارز ساختاری و مورفولوژیك است.

مقدمه

جنس کاج[۳] دارای ۱۰۵ گونه و زیرگونه است[۱]،[۳]،[۵]. گونهٔ بررسی شده پی. الداریکا[۴] بوده است. که در خصوص گونه یا زیر گونه بودن آن بین محققان اختلاف نظر وجود دارد[۱]،[۳]،[۵]. برخی از گیاه‌شناسان آن را گونه‌ای مستقل می‌شناسند و عده‌ای دیگر آن را از اشکال جغرافیایی کاج بروتیا[۵] یا واریته‌ای از کاج حلب[۶] دانسته‌اند[۱]،[۳]،[۵]. کاج الدار (کاج تهران) به اندازهٔ سایر کاج‌های مدیترانه‌ای در جهان، شناخته نیست و فقط معدودی از کشورها(شوروی سابق، ایران و ترکیه) بر روی آن پژوهش‌هایی انجام داده و یا از آن برای جنگل‌کاری در مناطق خشك سود جسته‌اند [۱]،[۳]،[۵].

واژه‌های کلیدی: کاج الدار، پروتئین کل، الکتروفورز، SDS-PAGE ، فرم مورفولوژیك
دریافت ۸۶/۴/۱۸ پذیرش ۸۸/۳/۱۱

۱. Pinus eldarica Medw. ۲.SDS-PAGE ۳.Pinus ۴. P. eldarica
۵.Pinus brutia ۶.*P. halepensis* var. *eldarica*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

کاج الدار کاج کمیاب با پراکنش محلی است که امروزه تنها در یك محیط نیمه‌بیابانی به وسعت ۵۵۰ هکتار در انتهای شرقی رشته کوه چوبان داغ[۱] در طول حاشیهٔ جنوبی رودخانه ایوری[۲] در نزدیکی مرز جمهوری آذربایجان و گرجستان می‌روید[۱۴]. این کاج- که برخی قدمت آن را در ایران به زمان هخامنشیان نسبت می‌دهند و برخی ورود آن را مربوط به ۸۰۰ سال پیش می‌دانند به دلیل مقاومت به خشکی و تطابق چشمگیر اکولوژیك با محیطهای کویری در بسیاری از مناطق ایران کشت می‌شود [۱]،[۳]،[۵]. از جمله این مناطق، نشتیفان واقع در جنوب خواف است که کاج الدار در آن سازگاری زیادی نشان داده است. ویژگی جالب توجه این کاج در این منطقه، به‌وجود آمدن فرم‌های جدیدی از آن است که از نظر اندازه و ریخت‌شناسی تفاوت‌های چشمگیری با پایهٔ مادری خود دارند که علی‌رغم این تغییرات، دارای قدرت بذردهی و تولید مخروط نیز هستند. این فرم‌ها، به دلیل ظاهر زیبا و قامت کوتاه بیش‌تر جنبهٔ تزئینی دارند و به شکل و نام‌های توپی و کله‌قندی معروف شده‌اند(شکل۱). ظهور این کاج‌ها اولین بار با تغییر شکل شاخه‌ها در برخی از پایه‌های کاج الدار و ایجاد حالت کپه‌ای و پرپشت در آن‌ها همراه بود که البته به تبع این تغییر فرم، مخروط‌های موجود بر این شاخه‌ها نیز تا حد چشمگیری کوچك و مینیاتوری شدند. بعضی از روستاییان منطقه به جمع‌آوری این مخروط‌ها و کاشت بذور کوچك حاصل از آن اقدام کردند. کم کم با رشد پایه‌های نسل دوم و زادآوری آن‌ها، نهال‌های نسل بعدی نیز حالت کپه‌ای و رشد کوتاه را حفظ و دو شکل متمایز کاج توپی و کله‌قندی را ایجاد کردند. در پژوهش انجام شده به‌وسیلهٔ شایان‌مهر و همکاران (۲۰۰۸) کاج‌های نام برده از لحاظ الگوی الکتروفورزی پراکسیداز هیچ‌گونه تفاوتی را نشان ندادند اما در تحقیقی دیگر شایان مهر و همکاران (۱۳۸۶) موم‌های اپی‌کوتیکولی متفاوتی بر سطح سوزن‌های کاج‌های مزبور مشاهده کردند. این امر در حالی است که سابقه‌ای از کاشت و یا حضور هیچ کاج دیگری (برای احتمال بروز هیبرید در میان کاج‌ها) در منطقهٔ بررسی شده وجود ندارد. قابل ذکر است که در گذشته کاج توپی را به پینوس موگو[۳] نسبت می‌دادند. اما این اشتباه با مشاهدهٔ تغییر فرم نوك تاج برخی از پایه‌های کاج الدار در منطقه و پرپشت شدن شاخه‌ها و کوچك شدن مخروط موجود بر روی همان بخش از تاج قابل اثبات است. به طوری که همزمان می‌توان دو نوع مخروط بزرگ و کوچك را بر روی پایه مادری مشاهده نمود به ترتیب یکی در پایین تاج، مربوط به کاج الدار و دیگری مربوط به کاج توپی در بخش تغییر شکل یافته تاج. شکل ۱(سمت راست) گویای تغییرات ایجاد شده در یکی از پایه‌های کاج الدار و به‌وجود آمدن کاج توپی را در منطقهٔ بررسی شده نشان می‌دهد. این کاج‌ها امروزه روستاییان (به طریق تکثیر جنسی) تولید می‌کنند و علاوه بر ارسال به شهرهای بزرگ کشور، به کشورهای عربی نیز صادر می‌کنند.

۱.Choban-Dagh Range ۲.Iori ۳.*Pinus mugo*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

الکترفورز ژل پلی اکریل آمید یك بعدی پروتئین‌ها، به طور گسترده برای شناسایی و طبقه‌بندی در سطح نژاد و گونه استفاده شده است [۸]. پروتئین‌ها، محصولات اولیه ژن‌ها بوده و به عنوان نشان‌گر به طور مؤثری برای شناسایی ژنوتیپ‌ها و ارزیابی گونه‌ها و بررسی ساختار ژنتیکی کلن‌ها و کولتیوارها به کار می‌روند [۱۲]. تحرك الکترفورزی آن‌ها، نتیجهٔ اندازه و شکل‌های مختلف مولکول‌هایشان است. که این اختلاف شاخص خوبی از تنوع ژنتیکی را فراهم می‌کند که به طور موفقیت‌آمیزی در تحقیقات جنگل گسترش یافته است [۱۵]. صفات مورفولوژیك نیز در تمایز بسیاری از کاج‌ها استفاده شده است [۱۶]،[۱۷]. در بسیاری از پژوهش‌های مربوط به اثرات و تنش‌های محیطی، از محتوای کلروفیل نیز به عنوان شاخص استفاده شده است [۷]،[۱۰]،[۱۱]، [۱۳]. در این پژوهش با مقایسهٔ الگوی باندی پروتئین (الکتروفورز تك بعدی) در سیستم SDS-PAGE، ۱۲ صفت مورفولوژیك مربوط به نهال‌ها و حتی پایه‌های مادری، محتوای پروتئین کل و نیز محتوای کلروفیل a و b برای تفکیك گونهٔ الداریکا از دو فرم جدید حاصل از آن استفاده شد.

شکل ۱. سمت راست: تغییر شکل یکی از پایه‌های کاج الدار و به‌وجود آمدن کاج توپی در قسمت انتهایی تاج آن در منطقهٔ خواف (T)، پایه‌های جوان کاج الدار با فرم تاج طبیعی (E). سمت چپ: نهال‌های سه ساله مورد آزمون در این تحقیق. ردیف ۱) مربوط به نهال‌های کاج توپی، ۲) کاج کله‌قندی و ردیف ۳) نهال‌های کاج الدار است

مواد و روش‌ها

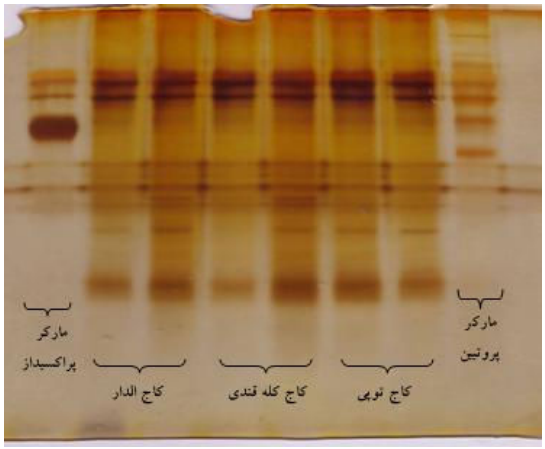
در این پژوهش برای مقایسه دو کاج توپی و کله‌قندی با فرم اصلی آن یعنی کاج الدار، نمونه‌های نهال ۳

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

ساله، از نهالستانی در روستای نشتیفان خواف واقع در عرض جغرافیایی ″۵۰ ′۲۵ °۳۴ شمالی و طول ″۵۸ ′۹ °۶۰ شرقی و ارتفاع از سطح دریای معادل ۸۶۵ متر، تحت شرایط رویش کاملاً مشابه، تهیه و به مدت ۵ ماه در شرایط گل‌خانه نگهداری شدند. مقایسهٔ بیوشیمیایی و انجام آزمایش‌ها، نمونه‌ها در دو فصل بهار و تابستان (سال ۱۳۸۵) تهیه و برای سنجش پروتئین کل، استفاده شد. مقدار ۱ گرم از برگ سوزنی کاج‌های ذکر شده با بافر تریس- اسیدمالیك ۴۰ میلی مولار با pH ۶ عصاره‌گیری و مقدار پروتئین به روش برادفورد با استفاده از BSA به عنوان استاندارد اندازه‌گیری گردید [۹]. برای بررسی‌های الکتروفورزی در سیستم SDS-PAGE مقدار یك گرم برگ با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس- اسید کلریدریك pH ۸، کلرید سدیم، DTT، EDTA) هموژنیزه شد. ترکیب مواد برای ژل جداکننده (۳۰ درصد اکریل آمید و ۰/۸ درصد بیس، SDS-تریس- اسید کلرید ریك ۱/۵ مولار با pH ۸/۸) و برای ژل متراکم کننده (۳۰ درصد اکریل آمید و ۰/۸ درصد بیس، SDS - تریس- اسید کلرید ریك ۰/۵ مولار با pH ۶/۸) است. رنگ آمیزی ژل‌ها نیز با استفاده از روش نقره اسیدی انجام شد [۴]. محتوای کلروفیل به روش‌هاربون اندازه‌گیری شد. مقدار ۵/ گرم از برگ با استون ۸۰ درصد عصاره‌گیری و دانسیته نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعیین شد [۶]. نمونه‌برداری برای بررسی صفات مورفولوژیك نیز در هر مورد به طور کاملاً تصادفی انجام شده و در نهایت به روش روشل[۱] و شاتل[۲] (۲۰۰۰) اندازه‌گیری و مقایسه شد.

نتایج

شکل ۲، الگوهای پروتئین کل در برگ‌های گونهٔ الداریکا و دو فرم جدید آن را نشان می‌دهد. چنان که مشاهده می‌شود، الگوها کاملاً مشابه است و تفاوتی بین کاج‌های مورد نظر وجود ندارد.

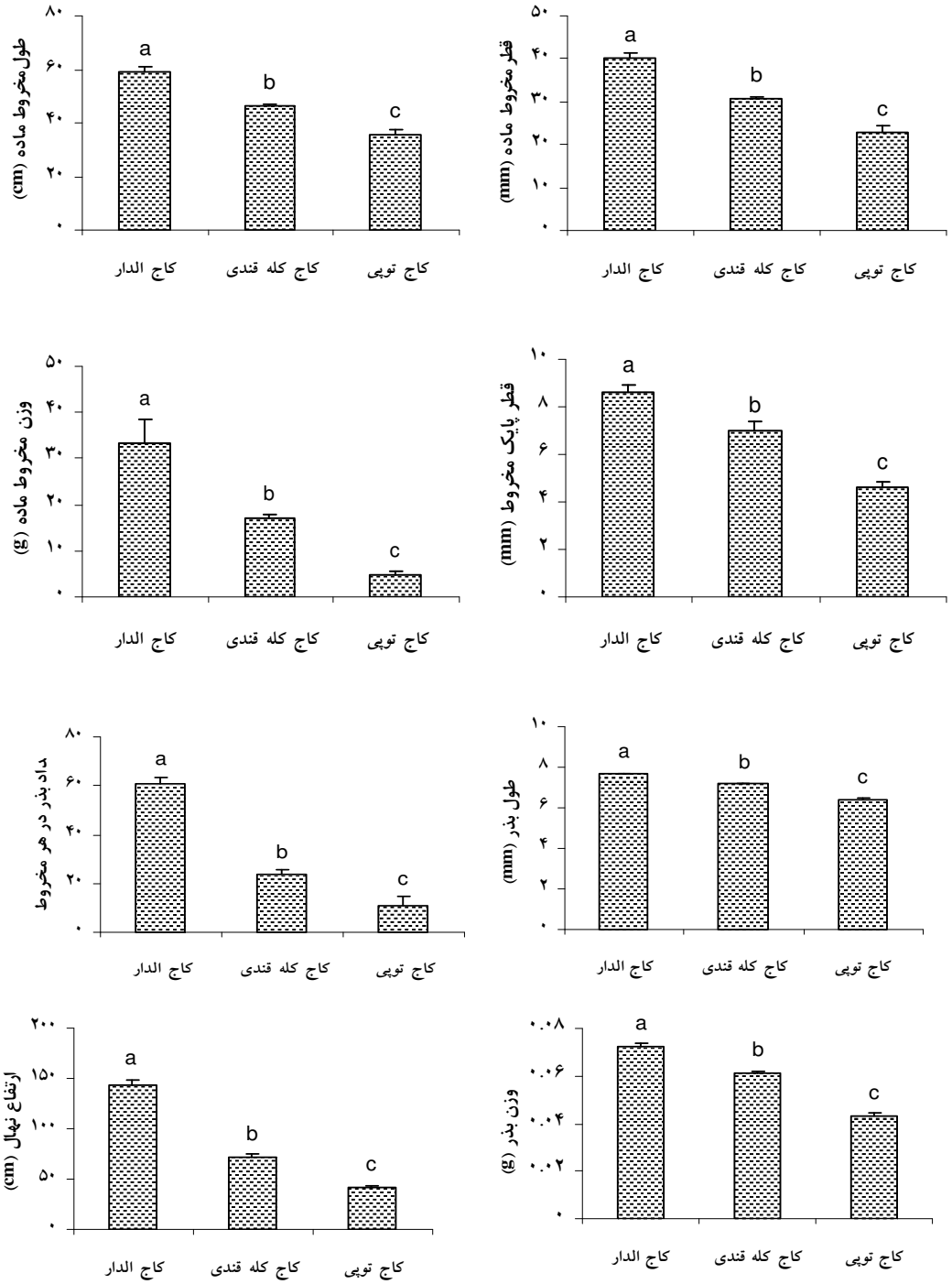


شکل۲. الگوی باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE)

۱.Rochelle ۲.Schoettle

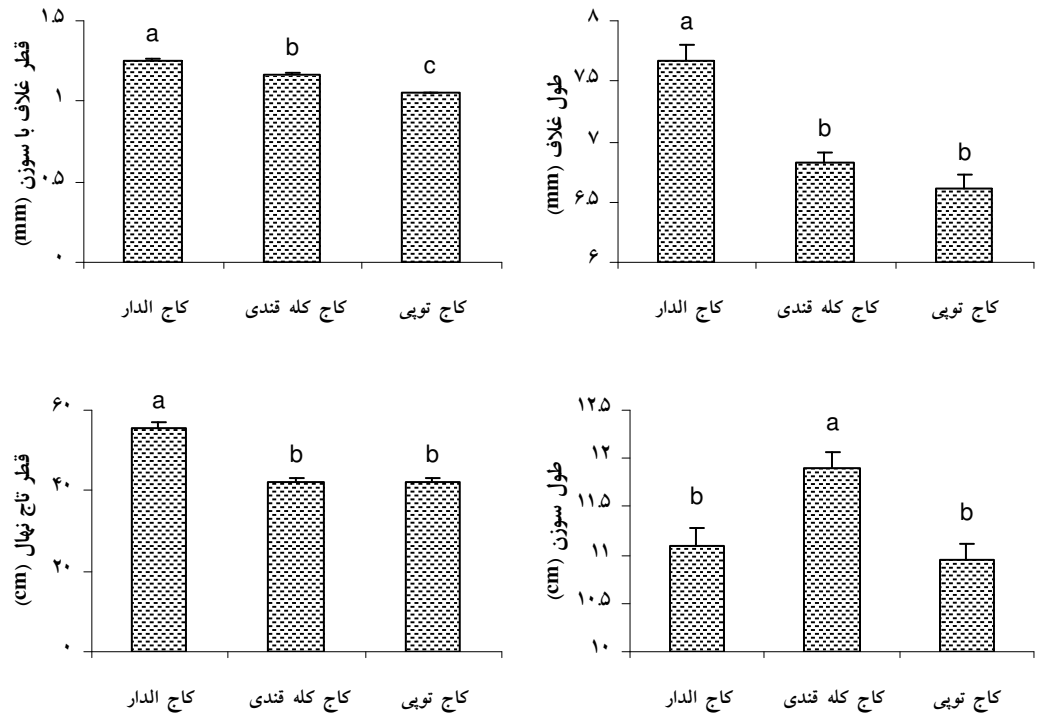
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

پس از اندازه‌گیری ۱۲ ویژگی مورفولوژیك، با استفاده از آزمون HSD توکی[۱] و T3 دانتس[۲] مقایسه آماری (تك متغیره) شدند. که نتایج حاصل از آن در شکل ۳، به صورت نمودار نشان داده شده است. نتایج حاصل برای همهٔ صفات در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار بود.



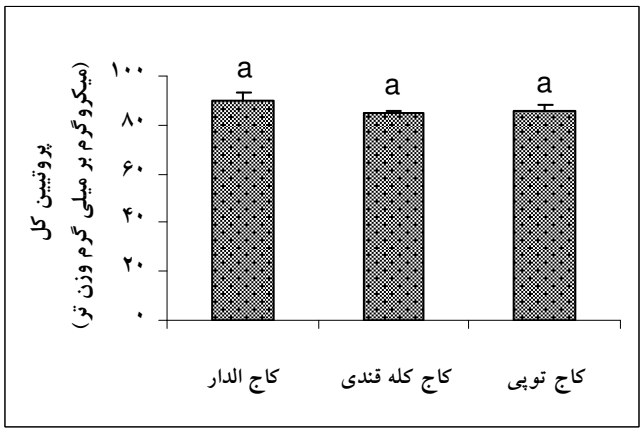
۱.Tukey ۲.Dunnett's

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]



شکل ۳. نتایج مقایسهٔ میانگین ۱۲ ویژگی مورفولوژیك با استفاده از آزمون‌های HSD توکی[۱] و T3 دانتس[۲] در سطح احتمال ۹۹ درصد

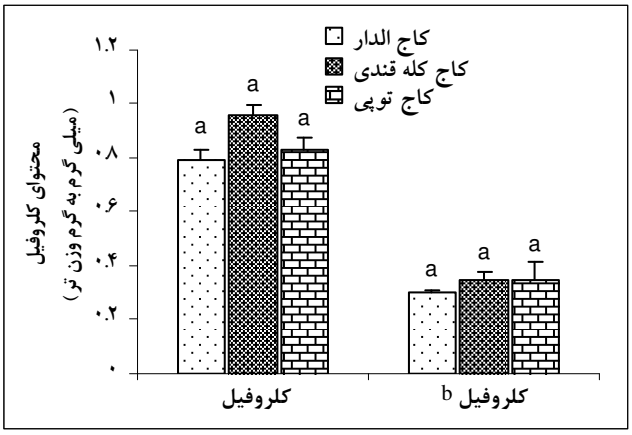
شکل ۴، نمودار محتوای پروتئین کل نمونه‌های برگ و شکل ۵ نیز مقایسه محتوای کلروفیل b و a نمونه‌های سوزن را در کاج الدار، توپی و کله‌قندی نشان می‌دهد. چنان‌که ملاحظه می‌شود تفاوت معنی‌داری بین هر یك از نمونه‌ها مشاهده نشد.



شکل ۴. مقایسهٔ پروتئین کل نمونه‌های برگ کاج‌ها

۱.Tukey ۲.Dunnett's

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]



شکل ۵. مقایسهٔ محتوای کلروفیل a وb نمونه‌های برگ در گونهٔ الدار، توپی و کله‌قندی

بحث

از نظر شاو[۱] سه گونه کاجی که امروزه به نام‌های *کاج بروتیا تن*[۲]، *کاج پیتیوسا استو*[۳] و *کاج الدوریکا مدو*[۴] خوانده می‌شوند در واقع از تبار *کاج هالپنسیس میلر*[۵] هستند. به هر جهت میرو[۶] معتقد است که احتمالاً کاج بروتیا در دوران سوم زمین‌شناسی در اثر هیبریداسیون بین اجداد کاج حلب و *کاج سیلورستریس*[۷] به‌وجود آمده باشد. کاج الدار به نظر برخی از پژوهش‌گران هم‌نام با کاج بروتیا است، در حالی که بعضی دیگر آن را زیر گونه یا واریته‌ای از کاج بروتیا به حساب می‌آورند. بنا به اظهارات برخی از محققان، کاج بروتیا با پیشروی در جهت شمال در ترکیه به قفقاز راه یافته و در نتیجه از آن در حدود ۵۰ میلیون سال قبل کاج الدار پا به عرصهٔ وجود گذاشته است [۱]،[۳]،[۵]. از مدت‌ها قبل کاج الدار در مناطق جنوبی شهرستان خواف کشت می‌شده است. فرم‌های جدیدی از آن به طور طبیعی به‌وجود آمده است که تفاوت‌های مورفولوژیك آشکاری (از نظر شکل تاج، ارتفاع، رویش، اندازه مخروط و ...) با پایه‌های مادری خود دارند و به نام‌های توپی و کله‌قندی مشهور شده‌اند. در این تحقیق گونهٔ الدار و دو فرم جدید آن یعنی کاج توپی و کله‌قندی از نظر الگوی پروتئین تك بعدی، صفات مورفولوژیك (به عنوان نشانگر) و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی هم‌چون میزان پروتئین کل و محتوای کلروفیل a و b مقایسه شده‌اند. اگر چه آنالیز الکتروفورزی همهٔ پروتئین‌های سلول با الگوهای پروتئینی یك بعدی اندازه‌گیری دشواری را از نظر تعداد و خصوصیات فیزیك‌وشیمیایی محصولات ژن در پی دارد و همچنین تعداد مارکرهایی که می‌توان با این روش ارزیابی کرد محدود هستند، اما در مقایسه با سایر روش‌های پیچیده و دشوار، برای تمایز پرووننانس از جمله جمعیت‌های *کاج پینایستر ایت*[۸] مفید واقع شده‌اند [۸]. بررسی الگوهای

۱.Shaw ۲.*Pinus brutia* Ten. ۳.*P. pithyusa* Stev ۴.*P. eldaricai* Medw
۵.*Pinus halepensis* Miller ۶. Mirov ۷.*P. sylvestris* L. ۸.*Pinus pinaster* Ait.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

پروتئینی در مورد کاج‌های مورد نظر، یعنی گونهٔ الداریکا و دو فرم جدید توپی و کله‌قندی نتایج کاملاً مشابهی را نشان داد و با وجود ظهور باندهای پروتئینی متعدد در ژل پلی اکریل آمید تفاوتی در بین پایه‌ها مشاهده نشد. همچنین مقدار پروتئین کل نمونه‌های برگ اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. بررسی و اندازه‌گیری محتوای کلروفیل کولتیوارهای پسته توسط اگر[1] و همکاران (۲۰۰۵) به دلیل اهمیت رنگ سبز آن‌ها مفید واقع شد. در حالی که نتایج تجزیه واریانس محتوای کلروفیل a و b در مورد کاج‌های بررسی شده تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این نتایج در حالی است که صفاتی نظیر طول، قطر، وزن و قطر پایك مخروط ماده و نیز تعداد بذر در هر مخروط، طول بذر، وزن بذر، ارتفاع نهال و قطر غلاف به ترتیب در کاج‌های الدار، کله‌قندی و توپی روند منظم نزولی را نشان داده که از لحاظ آماری نیز در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار است؛ یعنی بیش‌ترین مقدار، مربوط به کاج الدار و کم‌ترین آن نیز مربوط به کاج توپی بوده است. طول غلاف و قطر تاج نهال‌ها نیز در کاج الدار بیش‌تر از دو کاج دیگر بوده است اما دو کاج توپی و کله‌قندی از این نظر تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. طول برگ نیز بر خلاف سایر صفات، در کاج کله‌قندی بیش از سایرین بوده است. بنابراین می‌توان چنین گفت که ۹ ویژگی اول بهترین صفات در نشان دادن تمایز ایجاد شده در کاج‌های نام برده هستند. در نهایت نبود اختلاف بیوشیمیایی و فیزیولوژیك بین آن‌ها احتمالاً بیان‌گر این مطلب است که تغییرات ایجاد شده در کاج‌های نام برده در این صفات بروز نیافته است. اما بروز تفاوت‌های فاحش و چشم‌گیر در ساختار و ریخت‌شناسی این کاج‌ها نشان دهنده ایجاد تغییراتی در مولکول DNA است. لذا به‌کارگیری روش‌های مولکولی و سیتوژنتیك، کارساز خواهد بود.

منابع

۱. سردابی، ح. مونوگرافی کاج الدار. *مجموعه مقالات تحقیقات منابع طبیعی*، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، چاپ اول (۱۳۶۸) ش ۵۵، ۱۰۰-۶۸.

۲. شایان‌مهر، ف.، جلالی، س.غ.، قناتی ف. و کرتولی‌نژاد د.، *مقایسه موم‌های اپی‌کوتیکولی سطح سوزن‌ها و ساقه‌های کاج الدار با دو شکل طبیعی به وجود آمده از آن*. رستنی‌ها، (۱۳۸۶)، ۸ (۲): ۱۵۹-۱۵۰.

۳. جزیره‌ای، م.ح. *جنگل‌کاری در خشك‌بوم*. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول (۱۳۸۰) ۴۵۰ ص.

۴. مصطفایی، ع. *راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل*، انتشارات یادآوران دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، چاپ دوم (۱۳۸۲) ۱۷۳ ص.

۱.Agar

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

۵. میربادین، ع.ر.، شیبانی، ح.ع.، محمدی، م. و میرکاظمی س.ز.، *علل ضعف فیزیولوژیك کاج الدار پارك چیتگر*، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، چاپ اول (۱۳۷۳) ۶۱ ص.

۶. هاربورن، ج.ب.، روش‌های نوین تجزیه شیمیایی گیاهان، ترجمه یعقوب آئینه چی، انتشارات دانشگاه تهران (۱۳۵۸) ۳۷۷ ص.

7. I.T. Agar, S. Kafkas and N. Kaska, Variation in Kernel Chlorophyll Content of Sifferent Pistachio Variaties Grown in six Countries. ISHS Acta Horticulturae 470, II International Symposium on Pistachios and Almonds (2005).

8. I.N. Aly, M.A. Abdel–Sattar, K.A. Abd-Elsalam, M.S. Khalil and J.A. Varreet, Comparison of Multi-locus Enzyme and Protein Gel Electrophoresis in the Discrimintion of five *Fusarium* Species Isolated from Egyptian Cottons, African Journal of Biotechnology 2 (2003) 206-210.

9. M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dry Binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

10. K.F. Cao, Leaf anatomy and chlorophyll content of 12 woody species in contrasting light conditions in a Bornean heath forest, Canadian Journal of Botany 78 (2000) 1245-1253.

11. T.P. Dawson, P.R.J. North, S.E. Plummer and P.J. Curran, Forest ecosystem chlorophyll content: implications for remotely sensed estimates of net primary productivity, Int. J. Remote Sensing 24 (2003) 611–617.

12. V.G. Konarev, Proteins in Cultivar Identification, Botanical Identification of Varieties. Intenational Symposium ISTA, Leningerad (1988).

13. A.Z. Makaracı, J.A. Flore, The Effect of Terbacil on Chlorophyll Content of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. 'Honeoye') Leaves, Journal of Tekirdag Agricultural Faculty 3 (2006) 50-54.

14. N.T. Mirov, The Genus *Pinus*, University of California, Berkley, The Roland Press Company, Newyork (1967) 602 pp.

15. M.M. Rahman, N. Nito and S. Isshiki, Cultivar Identification of Yuzu (Citrus junos Sieb. Ex Tanaka) and related acid citrus by leaf Isozymes, Scientia Horticulturae 87 (2000) 191-198.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

16. R. Salazar, Genetic Variation in Needles of *Pinus caribaea* var. hondurensis Barr. Et Golf. From Natural Stands, Silvae Genetica 32 (1983) 52-59.
17. A.W. Schoettle and S.G. Rochelle, Morphological Variation of *Pinus flexilis* (Pinaceae), a Bird-Dispersed Pine, across a Range of Elevations, American Journal of Botany 87 (2000) 1797-1806.
18. F. Shayanmehr, S.G. Jalali, F. Ghanati and D. Kartoolinejad, Discrimination of *Pinus eldarica* MEDW. and its two new species by epicuticular wax, lignin content, electrophoretic isozyme and activity of peroxidase, Feddes Repertorium 119 (2008) 644–654.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]