

تأثیر عوامل محیطی بر تولید چوب و لیگنینی شدن در گونه اکالیپتوس کاملدولنسیس رشد یافته در خوزستان

نوشین طغرای، عبدالرحمن حسین زاده، داوود پارسا پتو و فرداد گلبابائی

مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع - بخش تحقیقات علوم چوب و کاغذ

صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵ تهران - ایران

toghraei@rifr-ac.ir

چکیده :

پراکسیدازها جزء آنزیم‌هایی هستند که در کاتالیز دو مرحله نهایی بیوستتز لیگنین چوب شرکت می‌کنند. ارتباط بین فعالیت پراکسیداز و لیگنینی شدن در چوب، بوسیله تعیین میزان فعالیت پراکسیداز در ساقه‌های اکالیپتوس کاملدولنسیس (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn.) در طی دو فصل در سال ۱۳۷۸ در طی رویش درختان بررسی گردید. بعلاوه میزان لیگنین در طی همین دو فصل بر روی همان پایه‌ها اندازه‌گیری شد. این تحقیق نقش احتمالی این آنزیم‌ها را در بیوستتز لیگنین تشریح کرده و برای تحقیقات بعدی، در زمینه پلیمریزاسیون لیگنین در گونه‌های درختی، زمینه مساعدی خواهد بود. میزان فعالیت پراکسیدازی در بعضی از پایه‌های مطالعاتی در فصل پائیز کمتر بوده و در بعضی از پایه‌های مطالعاتی در فصل پائیز افزایش قابل مقایسه‌ای نسبت به زمستان داشته است. ضمن آنکه مناطق تمرکز ایزوآنزیمی تمام پایه‌ها در فصل پائیز بیشتر از زمستان است. نتایج بدست آمده از این تحقیقات نیز مانند بسیاری از تحقیق انجام شده می‌تواند دلیلی بر وجود رابطه بین لیگنین‌سازی با آنزیم پراکسیداز باشد. ضمن آنکه اثبات این مورد نیاز به تکرارهای مختلف روی گونه‌های مختلف دارد.

واژه‌های کلیدی : لیگنینی شدن، پراکسیداز، اکالیپتوس کاملدولنسیس.

مقدمه

چوب تجدید شونده‌ترین منبع کربن در روی زمین است. در حقیقت ۷۰٪ کربن آلی بیوسفر در دیواره سلولی سلولزها و پلیمرهای لیگنین می‌باشند و تخمین زده می‌شود که سالانه ۲۰/۰۰۰ میلیون تن لیگنین در گیاهان ساخته می‌شود. چوب و مواد لیگنوسلولزی معمولاً برای پلی ساکاریدهای دیواره سلولی بکار گرفته می‌شوند. درحالی‌که پلیمرهای لیگنین، بشدت دسترسی به پلی ساکاریدها را محدود می‌سازند. تبدیل مؤثر این مواد به محصولات مفید مانند الیاف سلولز، قندهای قابل تخمیر و یا غذای دام، همیشه موکول به حل مسئله لیگنین است. تاکنون سیستم‌های بسیار مؤثری برای تفکیک لیگنین‌ها از سلولز ابداع شده است که معمولاً نیاز به انرژی زیادی دارند و آلوده کننده محیط نیز می‌باشند. فرآیندهای لیگنین زدایی بیولوژیک مزایایی مانند گزیننده بودن عمل، نیاز به انرژی کم، احتمال ارتقاء کیفی لیگنین و نیز کنترل آلودگی محیط دارند.

بنابراین جهت ارتقاء روشها، بایستی دانش کافی در مورد چگونگی تشکیل دیواره سلولی، لیگنینی شدن و انواع لیگنین و توزیع آنها در لایه‌های مختلف دیواره سلولی یافت.

لیگنین

لیگنین را می‌توان بعنوان یک ماکرو مولکول سه بعدی با وزن مولکولی زیاد حدود ۱۰۰ KD (کیلودالتون) تشریح نمود که از واحدهای سازنده فنیل پروپانی

(C_6C_3) مانند کوماریل، کانیفریل و سیناپیل الکل منشاء می‌گیرد و در گیاهان آوندی وجود دارد. در بافت چوبی نهاندانگان، لیگنین را می‌توان در تراکتیدها، فیبر، آوندها و سلول‌های پارانشیم یافت (Sarkanen و Ludwig ۱۹۷۱). علی‌رغم پیشرفت تکنولوژی در پایان قرن گذشته، هنوز تعیین دقیق پیوندهای بین مولکولی و درون مولکولی لیگنین و دیگر پلیمرها در دیواره سلول ممکن نشده است (۱۹۹۳ Gibeaut و Carpita). بعلاوه ناهمگنی لیگنین جدالی برای محققان چوب در سراسر دنیا بوده است. از آن گذشته مکا نیسم تشکیل لیگنین هنوز کاملاً روشن نیست. برخی شواهد درباره فعل و انفعالات آنزیمی (Yamamoto و Lewis ۱۹۹۰; ۱۹۹۵ Sederoff و Whetten; ۱۹۷۷ Higuchi و همکاران; ۱۹۹۵ Nose و همکاران; ۱۹۹۵ Lewis و Davin)، فعل و انفعالات لیگنین - کربو هیدرات (Atalla ۱۹۹۵ و Houtman) و ظهور ژن (Tirumalai ۱۹۹۶ و همکاران) در دست تحقیق است، در مورد تشکیل لیگنین در دیواره سلول در گذشته تحقیق شده است (Abreu ۱۹۹۹ و همکاران).

لیگنین بر اساس ساختار شیمیایی و واحدهای فنیل پروپانونی به سه دسته تقسیم می‌شود: لیگنین سوزنی‌برگان، پهن‌برگان و گیاهان علفی. در گیاهان چوبی، لیگنین نهاندانگان (پهن‌برگان) با بازدانگان (سوزنی‌برگان) متفاوت است. از آن جهت که علاوه بر واحدهای گویاسیل پروپان، واحدهای سیرینجیل پروپان هم در پهن‌برگان وجود دارد. Fergus و Goring (۱۹۷۰) به این نتیجه رسیدند که در گیاهان چوبی

نهانده لیگنین، سیرینجیل عمدتا در دیواره ثانویه موجود است. حال آنکه لیگنین گویاسیل در دیواره اولیه ولایه میانی وجود دارد (Fengel, ۱۹۸۹).

مقدار لیگنین در گیاهان مختلف متغیر است. در گونه‌های چوبی میزان لیگنین ۴۰-۲۰٪ است و در نباتات علفی و آبری نهانده از جمله بسیاری از تک لپه‌ای‌ها (مانند گونه‌های دم اسبی) ساخت لیگنین محدودتر است (Fengel ۱۹۸۹).

بعلاوه، توزیع لیگنین در دیواره سلول و میزان آن در قسمتهای مختلف یک درخت یکسان نیست. بعنوان مثال قسمتهای تحتانی، فوقانی، داخلی ساقه، شاخه‌های سوزنی‌برگان، پوست و چوب فشاری لیگنین بیشتری دارند. لیگنین سوزنها و برگها متغیر است و گاه زیاد و گاه کم گزارش شده است و بستگی به شرایط فیزیوژیکی رشد و توسعه آنها دارد (Wardrop ۱۹۷۱; Howard ۱۹۷۳; Yasuda و Miksche ۱۹۷۷; Luger و Gampe ۱۹۷۸). در غالب موارد بهره برداری چوب، لیگنین جزئی از چوب به حساب می آید. لیکن در تهیه خمیر کاغذ و سفیدسازی آن را کم و بیش بصورت تغییر یافته و تخریب شده جدا می‌نمایند که پتانسیل بسیار عظیم منبع کربن در سراسر دنیا بمیزان بیش از ۳۵ میلیون تن در سال برای مصارف انرژی و شیمیایی است.

تحقیقات بر روی شیمی لیگنین، نشان داده است که پیچیدگی ساختاری لیگنین بسیار زیاد است. ساختمان آن بر مبنای واحدهای نوع فنیل پروپان است. قسمتی از پیچیدگی مولکول لیگنین ناشی از نحوه اتصال واحدهای C_6 C_3 به یکدیگر است و قسمتی نیز از ناهمانند بودن این واحدها از نظر شیمیایی نشأت می‌گیرد.

در مولکول لیگنین، گروههای معینی با واکنشهای متفاوتی که نسبت به رنگها نشان می دهند از یکدیگر تمیز داده می شوند که در مطالعات آناتومی بی نهایت مفید است (شکلهای ۱ و ۲). باین ترتیب میتوان در تیره های مختلف گیاهان وجود یا عدم این گروهها را بررسی نمود.

مطالعاتی از این دست توسط (Kochneva و Manskaya ۱۹۴۸) و (Gibbs و Towers ۱۹۶۶) Srivastava انجام شده است. در گیاهان اولیه (قدیمی ترین گیاهانی که در منابع ژئولوژیک ثبت شده اند) اساساً گویاسیل حکمفرماست، در حالیکه در گیاهانی که منشاء جدیدتر دارند، مانند نهاندانگان، گویاسیل و سیرینجیل هر دو حضور دارند. البته استثناءهای زیادی نیز وجود دارد (Towers و Gibbs ۱۹۵۳; Srivastava ۱۹۶۶).

حقیقت دیگری که بایستی بدان توجه نمود این است که در یک گیاه معین ممکن است انواع مختلف لیگنین وجود داشته باشد. در مطالعات انجام شده در *Eucalyptus elaeophora* نشان داده شد که زایلیم اولیه، با کلر- سولفیت سدیم مانند واکنش زایلیم سوزنی برگان، برنگ قهوه ای در می آید در حالیکه زایلیم ثانویه به قرمز می گراید (Wardrop ۱۹۵۷). بنابراین زایلیم اولیه واکنشی متفاوت با گز یلم ثانویه از خود نشان می دهد. Bland (۱۹۵۷) از طریق آنالیز شیمیایی نشان داد که لیگنین زایلیم اولیه، عمدتاً از نوع گویاسیل است. در حالیکه در زایلیم ثانویه نوع گویاسیل - سیرینجیل بیشتر است. واکنشهای شیمیایی و رنگ آمیزیها تأیید کرده است

که در قسمتهای مختلف یک گیاه لیگنینهایی با ماهیت‌های متفاوت در واحدهای C_3 و C_6 وجود دارد (Alder، ۱۹۷۷).

باید در نظر داشت که لیگنینی شدن دیواره سلول در تمام سلول‌ها بوقوع نمی‌پیوندد بلکه منحصر به گروه سلول‌هایی (بافت) است که برای عمل خاصی اختصاص یافته‌اند، بعنوان مثال نقل و انتقال مایعات و یا مقاومت مکانیکی. لیگنین در جلبک‌ها (Algae) وجود ندارد و وجود آن در خزها (Musce) نیز مورد تردید است. فقط در گیاهان آوندی حقیقی در سلول‌هایی که برای نقل و انتقال آب و مواد غذایی تخصص یافته‌اند می‌توان میزان لیگنین را بدون ابهام تعیین نمود. بنابراین از نقطه نظر گیاهشناسی پدیده لیگنینی شدن در بافت‌ها همراه با توسعه سیستم نقل و انتقال (آوندها) در گیاهان است (Higuchi ۱۹۹۰).

ساختار دیواره سلولی: دیواره سلول بالغ الیاف و تراکئیدها متشکل از دو ساختار است. دیواره اولیه ساختاری است که در ابتدا تشکیل می‌شود و به منزله پاکت سلول است که در برگیرنده پروتوپلاسم در حین رشد سلول در مرحله تمایزبانی سلول‌های کامبیوم است. دیواره ثانویه پس از اینکه رشد سطح سلول پایان رسید تشکیل می‌گردد.

در سطح داخلی دیواره اولیه، میکروفیبریل‌ها تقریباً متقاطع هستند، لیکن در سطح خارجی این دیواره از این امتداد تبعیت نمی‌کند و بسته به میزان رشد و قطبی بودن آن که در حین تمایزبانی (Differentiation) بوقوع می‌پیوندد، توسعه می‌یابد. بنظر می‌رسد که میکروفیبریل‌ها در هم بافته هستند بنابراین در امتداد میکروفیبریل‌ها در ضخامت دیواره سلولی تغییر و تحول تدریجی خواهیم داشت.

بر خلاف دیواره اولیه، دیواره ثانویه که بسیار ضخیم تر است، لایه لایه است. هر لایه متشکل از تعدادی ورقه است که هر یک شامل یک صفحه میکروفیبریل می‌باشند، در لایه اول وسوم دیواره ثانویه در ورقه‌های متوالی، جهت امتداد میکروفیبریل‌ها متفاوت از یکدیگر است در حالیکه در لایه دومی جهت میکروفیبریل‌ها در تمام ورقه‌ها تقریباً یکسان است. تجزیه سلول‌های در حال تمایزیابی (Differentiation) و اجزاء تشکیل دهنده دیواره سلول‌ها نشان می‌دهد که میزان سلولز دیواره اولیه ۲۰ تا ۲۸٪ و دیواره ثانویه ۵۵ - ۴۵٪ است (Allsop ۱۹۹۰, Meier ۱۹۶۱). بنابراین، ملاحظه می‌شود که در دیواره اولیه مواد تشکیل دهنده ماتریس (غلاف) غالب هستند در حالیکه در دیواره ثانویه اجزاء ساختمانی غلبه دارند.

در مطالعات بعدی که جهت تعیین نحوه توزیع لیگنین در دیواره سلول انجام شد از روشهای رنگ آمیزی و تفاوت حلالیت استفاده کرده‌اند و معلوم شد که در صد لیگنین در لایه میانی و دیواره اولیه بیش از جاهای دیگر است (Kerr ۱۹۳۴ و همکاران). بعداً تلاش‌های دیگری برای تعیین توزیع لیگنین با استفاده از طیف سنجی UV (Lange ۱۹۵۰)، میکروسکوپ تداخلی (Lange و Kjaer ۱۹۵۷) و میکروسکوپ فلئورسانس UV (Hentgarter ۱۹۶۰) و (Ruch) انجام شد. میزان لیگنینی شدن در لایه میانی در گوشه‌های سلول حداکثر و در دیواره‌های شعاعی بیش از مماسی است (Wardrop, ۱۹۷۱).

موقعیت لیگنین‌ها در دیواره سلولی چوب :

روشهای بسیاری برای مطالعه توزیع لیگنین در چوب بکار گرفته شده است یکی از قدیمی ترین آنها رنگ آمیزی انتخابی و سپس مشاهده با میکروسکوپ نوری است (Brauns ۱۹۵۲). از رنگ آمیزی با پرمنگنات پتاسیم برای آشکارسازی لیگنین بوسیله میکروسکوپ الکترونی (Hepler ۱۹۷۰ و همکاران) نیز استفاده شده است البته تردیدهایی در مورد اختصاصی بودن این روش برای لیگنین هنوز وجود دارد (Goring و Saka ۱۹۸۵). توزیع لیگنین را توسط بررسی اسکلت ان پس از حذف کربوهیدراتها بوسیله قارچ پوسیدگی قهوه ای نیز مطالعه کرده اند (Meier ۱۹۵۵) و ضمن حذف کربوهیدراتها از هیدروفلوئوریک اسید نیز استفاده شده است. البته در حین واکنشهای تراکمی، برخی تغییرات در لیگنین رخ می دهد و حضور بقایای کربوهیدراتها می تواند سبب مخدوش شدن اطلاعات گردند لیکن نتایج حاصل از این روش بطور منطقی با نتایج رنگ آمیزی با پرمنگنات پتاسیم همخوانی دارد (Parham ۱۹۷۴).

هر چند روشهای فوق در آشکارسازی وجود لیگنین در مناطق مختلف مرفولوژیک چوب مفیدند، لیکن به تخمین کمی توزیع لیگنین در دیواره سلولها کمکی نمی کنند. برای این کار روشهای مبتنی بر مطالعه برشهای نازک چوب توسط میکروسکوپ UV از بهترین روشها می باشند که نخستین بار توسط Lange (۱۹۵۴) عملی شد. وی تراکم وزنی لیگنین را در دیواره ثانویه و لایه میانی مرکب (CML) تراکئیدهای نوعی نوئل بترتیب ۱۶ و ۷۳٪ بدست آورد این نتیجه تطابق بسیار خوبی با نتایج تحقیقات (Bailey ۱۹۳۶) دارد که تراکم لیگنین را در لایه میانی Douglas fir با روش Microdissection، ۷۱٪ بدست آورد. قبل از آن نیز Ritter

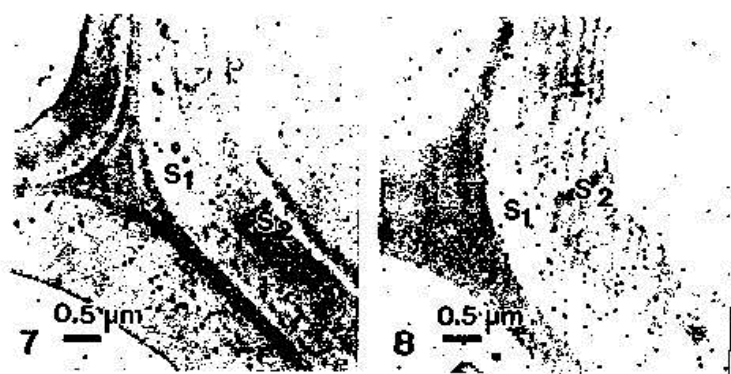
(۱۹۲۶) باین نتیجه رسیده بود که ۷۵٪ لیگنین چوب در لایه میانی و ۲۵٪ دیگر آن در دیواره ثانویه متمرکز است. سپس سردرگمی زیادی در منابع بوجود آمد زیرا بسیاری از نویسندگان ما بین نتایج Ritter و Bailey-Lange مرزی قائل نبودند. بدون تردید مقداری از این اغشاشات بدلیل استفاده از علامت g/g (در صد) هم در درصد کل لیگنین چوب که در یک ناحیه خاص مرفولوژیک وجود دارد و هم در درصد لیگنین آن منطقه می باشد. شاید استفاده از نشانه g/g برای تراکم لیگنین مفیدتر باشد. یعنی نسبت مواد تشکیل دهنده دیواره سلول به میزان لیگنین بر حسب گرم و نشانه درصد را می توان برای نسبت کل لیگنین در یک محدوده خاصی از یک بافت در نظر گرفت.

بالاخره Goring و همکاران (۱۹۷۱) با اصلاح روش میکروسکوپی UV توانستند توزیع کمی لیگنین را در چوب مشخص نمایند. آنها ثابت نمودند که نتایج Bailey-Lange صحت دارد و نظریه (Mark و Berlyn ۱۹۶۵) مبنی بر اینکه "از آنجایی که حجم لایه میانی بسیار ناچیز است نمی تواند بیش از ۴۰٪ کل لیگنین چوب را در خود داشته باشد" را نیز بعد از آن تأیید نمودند (Higuchi, ۱۹۹۰).

توزیع لیگنین در سوزنی برگان :

جدول ۱ توزیع لیگنین را در تراکئیدهای نوعی نوئل (*Picea mariana* Mill.) نشان می دهد که بوسیله میکروسکوپ UV تعیین شده است (Fergus ۱۹۶۹ و همکاران). نتایج نشان می دهد که غلظت لیگنین در لایه میانی بسیار بیشتر از دیواره ثانویه است. هر چند از آنجایی که دیواره ثانویه قسمت بیشتری

از کل چوب را بخود اختصاص می دهد (۷۲٪ در چوب آغاز و ۸۲٪ در چوب پایان) بنابراین غالب لیگنین در دیواره ثانویه متمرکز است، همانگونه که در شکل ۱ دیده می شود، لیگنین بطور یکنواخت در دیواره ثانویه تراکئیدهای نوئل توزیع شده است در جدول ۲ توزیع لیگنین در زایللم Douglas fir آورده شده است (Fergus ۱۹۶۹ و همکاران) در اینجا سلول های اشعه چوبی نیز بررسی شده اند. همانگونه که ملاحظه می شود غلظت و توزیع لیگنین در بخش های مختلف مرفولوژیک تراکئیدها تفاوت چندانی با نوئل در جدول ۱ ندارند.



الف

ب

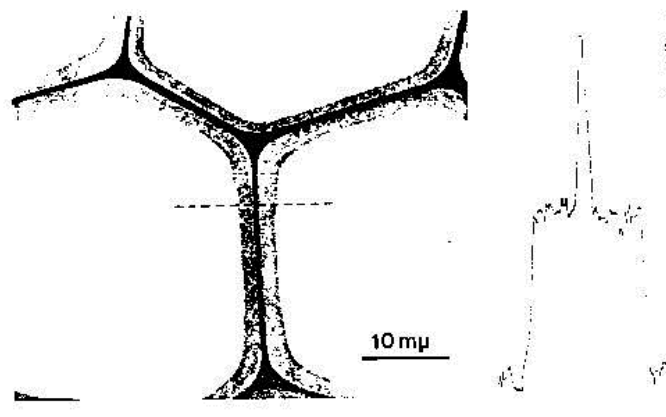
مأخذ: Ruel و همکاران (۲۰۰۱)

شکل ۱ - توزیع لیگنین در چوب کشتی اکالیپتوس *E.gunnii* الف - چوب کشتی کمتر، ب - چوب کشتی با کرنش زیاد

جدول ۱- توزیع لیگنین در تراکنیدهای پیسه آ بیس (میکروسکوپ UV)

لیگنین		کل بافت (%)	منطقه مرفولوژیکی	چوب
غلظت (g/g)	کل (%)			
۰/۲۳	۷۲	۸۷	S	چوب بهاره
۰/۵۰	۱۶	۹	ML	
۰/۸۵	۱۲	۴	ML _{cc}	
۰/۲۲	۸۲	۹۴	S	چوب پاییزه
۰/۶۰	۱۰	۴	ML	
۱/۰۰	۸	۲	ML _{cc}	

مأخذ: Fergus و همکاران (۱۹۶۹)



مأخذ: Fergus (۱۹۶۸)

شکل ۲- دیواره سلولهای تراکتید چوب بهاره پیسه آ آیس (دانسیتومتری در امتداد خط چین بعمل آمده است)

جدول ۲- توزیع لیگنین در زایلیم دوگلاس

لیگنین		کل بافت (%)	منطقه مرفولوژیکی	چوب
غلظت (g/g)	کل (%)			
۰/۲۵	۵۸	۷۴	S تراکتید	چوب بهاره
۰/۵۶	۱۸	۱۰	ML تراکتید	
۰/۸۳	۱۱	۴	ML _{cc} تراکتید	
۰/۴۰	۱۰	۸	S اشعه پارانیشیم	
۰/۲۸	۳	۴	S اشعه تراکتید	
۰/۲۳	۷۸	۹۰	S تراکتید	چوب پاییزه
۰/۶۰	۱۰	۴	ML تراکتید	
۰/۹۰	۶	۲	ML _{cc} تراکتید	
-	۴	۳	S اشعه پارانیشیم	
-	۲	۱	S اشعه تراکتید	

مأخذ: Goring و Wood (۱۹۷۱)

جدول ۳ توزیع لیگنین را در تراکتیدهای کاج تدا نشان می دهد که بر اثر برومیناسیون (Saka و Thomas ۱۹۸۲) تعیین شده است. در کاج تدا غلظت لیگنین بوضوح در لایه S₂ کمتر از S₁ و S₃ است. مقایسه این سه جدول نشان می دهد که با صرف نظر از تفاوت های ناچیز، روند توزیع در تراکتیدهای هر سه سوزنی برگ مشابه است.

سلول های پارانیشیم اشعه که حدود ۰/۵٪ وزن زایلیم را در سوزنی برگان تشکیل می دهند، مشخصاً لیگنین بیشتری را از کل چوب دارا می باشند.

Bailey (۱۹۳۶) با روش مستقیم آنالیز، میزان لیگنین سلول های پارانیشیم اشعه Douglas fir را تعیین کرد. Harada و Wardrop (۱۹۶۵) عدد g/g ۰/۴۴ را برای

کریپتومریا محاسبه کردند. Fergus و همکاران (۱۹۶۹) غلظت 0.40 g/g لیگنین را برای اشعه نوئل سیاه (black spruce) معین نمودند و دریافتند که غلظت لیگنین در دیواره ثانویه سلول‌های پارانشیم اشعه در چوب آغاز و پایان همسان است. هر چند که چوب نرمال و واکنشی متفاوتند لیکن توزیع لیگنین در تراکئیدهای چوب فشاری و نرمال یکسان است با این تفاوت که غلظت لیگنین در چوب فشاری بیشتر بوده و در گوشه سلول‌ها در لایه میانی، لیگنین وجود ندارد، در ضمن در چوب فشاری گزارشهای بسیاری مبنی بر مشاهده یک حلقه در لایه S_2 وجود دارد که در آن غلظت لیگنین تقریباً معادل لایه میانی است. در جدول ۴ مقایسه‌ای ما بین آمار موجود صورت گرفته است.

توزیع لیگنین در پهن برگان :

لیگنین پهن برگان عمدتاً شامل گویاسیل و سیرینجیل است و بنظر می‌رسد که نسبت این دو در مناطق مختلف مرفولوژیک متفاوت است. در جدول ۵ نسبت گویاسیل به سیرینجیل در مناطق مختلف مرفولوژیک آورده شده است (Saka ۱۹۸۵ و Goring) همان گونه که در جدول دیده میشود دیواره ثانویه الیاف (S_2) غالباً از سیرینجیل تشکیل شده در حالیکه دیواره ثانویه آوندها (S_2) بیشتر از گویاسیل است. مطالعه بوسیله آنالیز طیف UV آشکار ساخت که همانگونه که در دیواره ثانویه فیبرها دیده می‌شود، سلول‌های پارانشیم اشعه نیز غالباً شامل لیگنین نوع سیرینجیل می‌باشند. در گوشه سلول‌ها در لایه میانی (MLcc) حدود ۱۰۰ - ۸۰٪ لیگنین از نوع گویاسیل است در حالیکه باقیمانده آن شامل سیرینجیل است. این نتایج البته با طرح‌های

قبلی مانند (Fergus و Goring ۱۹۷۰) که عقیده داشتند "لیگنین لایه میانی اطراف الیاف و سلول‌های اشعه حاوی مقادیر مساوی از گویاسیل و سیرینجیل است" تفاوت دارد لیکن این نتایج با پیشنهادهاى بعدی مربوط به Goring و Musha (۱۹۷۵) مبنی بر تشکیل لیگنین لایه میانی بطور عمده از گویاسیل پروپان مطابقت دارد. نتایج مندرج در جدول ۵ نشان می‌دهد که گروههای سیرینجیل و گویاسیل در پهن‌برگان بطور متفاوتی توزیع شده‌اند. Hardell و همکاران (۱۹۸۰) نشان دادند که لیگنین لایه میانی و دیواره آوند چوب توس از واحدهای گویاسیل غنی‌اند درحالی‌که نسبت سیرینجیل به گویاسیل در دیواره الیاف و سلول‌های اشعه بالاست Cho و همکاران (۱۹۸۰) نسبت سیرینجیل به گویاسیل لایه میانی را بسیار نازل توصیف کردند.

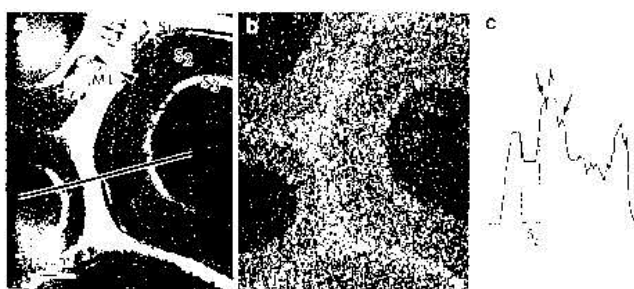
جدول ۳- توزیع لیگنین در تراکئیدهای کاج تدا

لیگنین		کل بافت (%)	منطقه مرفولوژیکی	چوب
غلظت (g/g)	کل (%)			
۰/۲۵	۱۲	۱۳	S ۱	چوب بهاره
۰/۲۰	۴۴	۶۰	S ۲	
۰/۲۸	۹	۹	S۳	
۰/۴۹	۲۱	۱۲	ML	
۰/۶۴	۱۴	۶	ML _{cc}	
۰/۲۳	۶	۶	S ۱	
۰/۱۸	۶۳	۸۰	S ۲	

۰/۲۵	۶	۵	S _۳	چوب پاییزه
۰/۵۱	۱۴	۶	ML	
۰/۷۸	۱۱	۳	ML _{cc}	

مأخذ: Saka و Thomas (۱۹۸۲)

شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی از تراکنیدهای تابستانه کاج تدا



لیگنینی شدن :

در زایلم ثانویه در حال توسعه گیاهان چوبی، سلول‌های ابتدایی فیبر یا تراکنید که از تقسیم سلولی در کامبیوم بوجود آمده‌اند در آغاز دستخوش رشد سطحی می‌شوند که در این فاز درازا و پهنای سلول افزایش می‌یابد. این رشد سطحی ابتدا در میانه سلول پایان می‌رسد و سپس با فاز ضخیم شدن دیواره دنبال می‌شود (تشکیل دیواره ثانویه) (Wardrop ۱۹۶۵) تقریباً در آغاز زمان ضخیم شدن دیواره، نخستین نشانه‌های لیگنینی شدن دیده می‌شود. Wardrop (۱۹۵۷) در مطالعه با میکروسکوپ UV نشان داد که نخستین ته‌نشینی در گوشه‌های سلول‌ها در درون دیواره اولیه صورت می‌پذیرد، این فرآیند سپس سرعت به لایه میانی در گوشه‌های سلول گسترش می‌یابد. این الگوی لیگنینی شدن توسط دیگران (Wardrop ۱۹۶۵; Saleh ۱۹۶۷ و همکاران) نیز تأیید شد. در ادامه این ته‌نشینی در گوشه‌های سلول، لیگنینی شدن در طول لایه میانی و در داخل دیواره ثانویه ادامه می‌یابد. غالباً دیواره‌های مماسی قبل از دیواره‌های

شعاعی مجاور خود لیگنینی می‌شوند. مطالعه دیگری با میکروسکوپ پولاریزان و UV نشان داد که ضخیم شدن دیواره همیشه کمی جلوتر از لیگنینی شدن پیش می‌رود. از آن گذشته باوجود اینکه لیگنینی شدن لایهٔ میانی در مراحل اولیه انجام می‌شود بازهم همزمان با آغاز لیگنینی شدن دیواره ثانویه، این فرآیند در این ناحیه ادامه می‌یابد. بنظر می‌رسد علیرغم اینکه فرآیند لیگنینی شدن در طی تمایزیابی زایلیم ادامه می‌یابد لیکن آغاز آن سلول به سلول است. همانگونه که توقف آن نیز به همین گونه است. این مشاهدات دلالت بر آن دارد که لیگنینی شدن اساساً پروسه‌ای است که توسط سلول تعیین می‌گردد کما اینکه در برخی بررسی‌ها سلول‌های لیگنینی شده در احاطه سلول‌های لیگنینی نشده مشاهده شده است (Higuchi ۱۹۹۰).

جدول ۴- غلظت لیگنین در نواحی مرفولوژیک چوب فشاری دوگلاس

غلظت لیگنین (%)		منطقه مرفولوژیکی
Japanese fir(b)	Douglas fir(a)	
۲۹	۴۰	S1
۴۲	۵۴	S ₂ (L)
۲۶	۳۶	S ₂
۴۹	۴۹	ML
۶۵	۷۵	ML _{CC}

مأخذ(a): Goring و Wood (۱۹۷۱)

در مطالعات میکروسکوپی لیگنینی شدن تغییرات دیگری همراه با این فرآیند دیده شده است. بنابراین دیواره سلول‌ها با قرمز روتنیم قبل از آغاز لیگنینی شدن واکنش شدیدی نشان می‌دهد و همانطور که فرآیند پیش می‌رود، شدت رنگ کمتر

جدول ۵- توزیع گویاسیل و سیرینجیل در لیگنین توس سفید

گویاسیل : سیرینجیل		منطقه مرفولوژیکی
آنالیز باطیف (b) UV	برومیناسیون بوسیله (a) TEM-EDXA	
سیرینجیل	۱۲ : ۸۸	S ₂ فیبر
گویاسیل	۸۸ : ۱۲	S ₂ آوند
سیرینجیل	۴۹ : ۵۱	S پارانشیم
۵۰:۵۰	۹۱ : ۹	ML _{cc(F/F)}
گویاسیل	۸۰ : ۲۰	ML _{cc(F/V)}
۵۰:۵۰	۱۰۰ : ۰	ML _{cc(F/R)}
۵۰:۵۰	۸۸ : ۱۲	ML _{cc(R/R)}

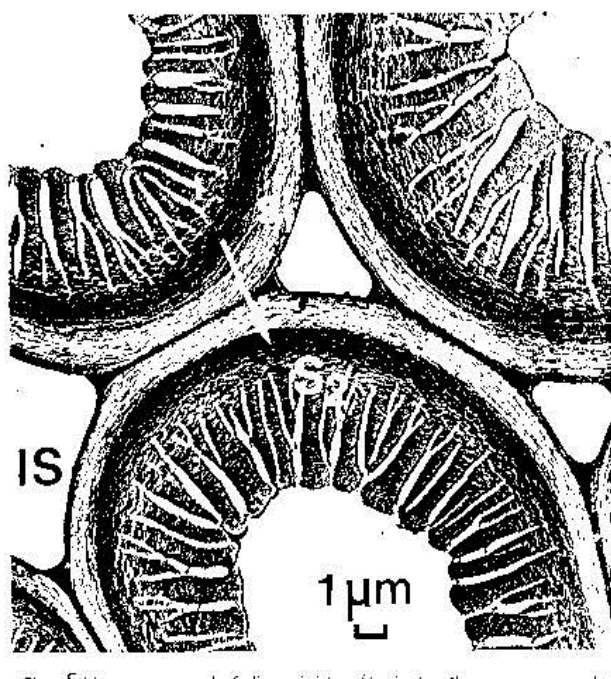
F = فیبر، V = آوند، R = اشعه چوبی

مأخذ (a): Goring و Saka (۱۹۸۴)

مأخذ (b): Goring و Fergus (۱۹۷۰)

می شود. زیرا قرمز روتنیم مواد غنی از گروههای کربوکسیل را رنگ می کند بنابراین هنگامی که لیگنینی شدن آغاز می شود واحدهای فنیل پروپان احتمالاً به گروههای کربوکسیل بعنوان اتصال استری ارونیک اسید متصل می شوند. شدت رنگ در دیوارهای شعاعی بیش از مماسی می باشد (Allen ۱۹۶۱) که احتمالاً بدلیل لیگنینی شدن بیشتر دیواره شعاعی است (Wardrop ۱۹۷۱ و همکاران).

Crocker (۱۹۲۱) در یافت که لیگنین، پرمنگنات پتاسیم را احیاء می‌کند و دی اکسید منگنز می‌دهد. هنگامی که زایلیم در حال تمایزیابی را با پرمنگنات پتاسیم تثبیت می‌کنیم در دیواره سلول‌های ناحیه کامبیوم رنگی مشاهده نمی‌شود و یا بسیار کم است. در بافت‌های بالغ‌تر، رنگین شدن در لایه میانی گوشه‌های سلول دیده می‌شود، لیکن دیواره اولیه بدون رنگ باقی می‌ماند (شکل ۶). برخی اوقات قسمت خارجی لایه S_1 کمی رنگ می‌شود. نتایج حاصله از میکروسکوپ UV نیز نشان داده است که لیگنینی شدن از گوشه‌های سلول شروع شده و سپس به لایه میانی می‌رسد. بنابراین در مراحل اول، لایه میانی و قسمت‌های خارجی لایه S_1 لیگنینی می‌شوند و سپس فرآیند در سرتا سر لایه میانی، دیواره اولیه توسعه یافته و در نهایت به دیواره ثانویه می‌رسد.



مأخذ: Timell (۱۹۸۴)

شکل ۵- اسکلت لیگنین تراکنیدهها در چوب فشاری لاریکس

جدول ۶- توزیع لیگنین در توس سفید

لیگنین (g/g)		کل بافت (%)	منطقه مرفولوژیکی	عناصر
UV(b)	UV-EDXA(a)			
-	۰/۱۴	۱۱/۴	S ۱	فیبر
۰/۱۶	۰/۱۴	۵۸/۵	S ۲	
-	۰/۱۲	۳/۵	S۳	
۰/۳۴	۰/۳۶	۵/۲	ML	
۰/۷۲	۰/۴۵	۲/۴	ML _{cc(F/F)}	
-	۰/۲۶	۱/۶	S ۱	آوند
۰/۲۲	۰/۲۶	۴/۳	S ۲	
-	۰/۲۷	۲/۳	S۳	
۰/۳۵	۰/۴۰	۰/۸	ML	
-	۰/۵۸	۰	ML _{cc(F/V)}	
۰/۲۲	۰/۱۲	۸/۰	S	اشعه پراششیم
-	۰/۳۸	۲/۰	ML	
-	۰/۴۷	۰	ML _{CC(F/R)}	
-	۰/۴۱	۰	ML _{cc(R/R)}	

مأخذ(a): Goring و Saka (۱۹۸۵) مأخذ(b): Goring و Fergus (۱۹۷۰)

مأخذ: Wardrop (۱۹۶۵)



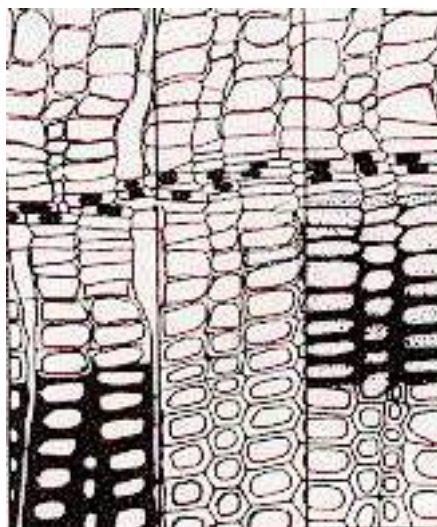
شکل ۶- زایلیم در حال تمایز یابی اکالیپتوس

از این مشاهدات آناتومیک نتیجه می‌شود که لیگنینی شدن سلول به سلول پیش می‌رود ولیکن بدلیل غلظت لیگنین در لایه میانی ماهیت سلولی فرآیند بخصوص در زایلیم ثانویه بنظر مبهم می‌آید. این مشاهدات را اگر در ارتباط با فرضیه بیو شیمیایی ماهیت لیگنینی شدن Freudenberg (۱۹۵۵) ببینیم، موضوع جالب تر خواهد شد.

جنبه‌های بیو شیمیایی لیگنینی شدن :

فرضیه Freudenberg برپایه موادی است که در منطقه زایلیم در حال تمایزیابی احتمالاً، اجزاء سازنده لیگنین می‌باشند (Wardrop ۱۹۷۱). وی نشان داد که توزیع لیگنین در منطقه تمایزیابی بدلیل وجود β - گلوکوزیداز است (شکل ۷) و دو فنول دهیدروژناز بنام‌های لاکاز و پراکسیداز در این منطقه حضور دارند و مقدار این آنزیم‌ها در سلول‌هایی که شدت لیگنینی شده‌اند، کاهش می‌یابد (Freudenberg ۱۹۵۵, ۱۹۵۴, Siegel). بر پایه این مشاهدات بنظر میرسد که واحدهای سازنده لیگنین مانند کانفرین در کامبیوم تولید می‌شوند و یا از جای دیگری در گیاه حمل می‌شوند و سپس بوسیله گلیکوزیداز حاضر، هیدرولیز می‌شوند و در سوزنی برگان اگلیکون - کانفریل الکل اکسیده و پلیمریزه می‌شود تا لیگنین را در دیواره سلول‌های در حال تمایزیابی تشکیل دهد. این فرضیه با مشاهدات قبلی Griffioen (۱۹۳۸) نیز مطابقت داشت. نامبرده تلاش کرد تا بوسیله معرف‌ها نشان دهد که نوعی گرادیان پتانسیل اکسیداسیون و احیا در منطقه تمایزیابی زایلیم وجود دارد و در

نتیجه، منطقه کامبیوم حداکثر فعالیت احیا کنندگی را دارد و دیگر اینکه، در



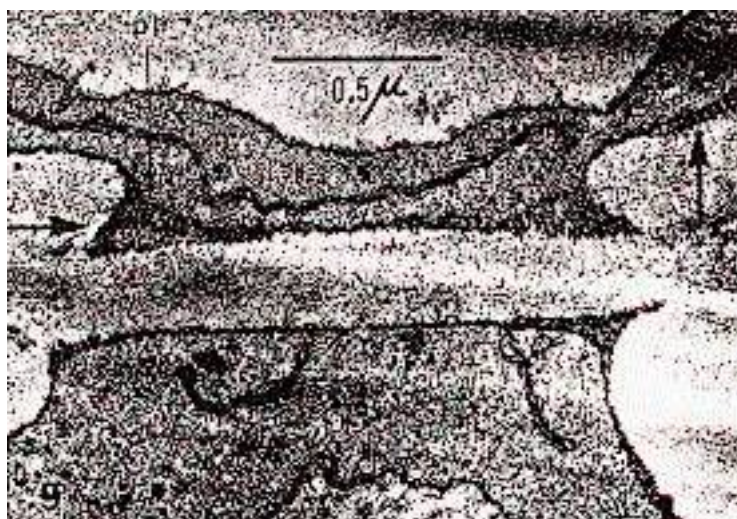
مأخذ: Freudenberg (۱۹۵۵)

شکل ۷- توزیع لیگنین (چپ)، β - گلوکزیداز (راست) در زایلیم در حال تمایزیابی



مأخذ: Wardrop و Daswell (۱۹۵۵)

شکل ۸- چوب کششی راش اروپا، جذب فراوان UV در دیواره میانی، دیواره اولیه و اولین لایه دیواره ثانویه در مقایسه با لایه ژلاتینی که بعداً تشکیل شده است.



مأخذ: Wardrop (۱۹۶۵)

شکل ۹- مقطع عرضی پونکتواسیون هاله‌دار بین دو فیبر زایلیم مجاور هم در اکالیپتوس.

تجمع وزیکول‌ها در ناحیه بین پلاسما و دیواره سلول

Higuchi (۱۹۵۹) در بامبو شکل احیا شده گلوکتاتیون و آسکوربیک اسید را در ناحیه لیگنینی نشده ساقه‌ها مشاهده نمود که این مواد مانع دهیدروژناسیون - پلیمریزاسیون کانیفریل‌الکل می‌شوند. علاوه بر این Manskaya (۱۹۴۸) نشان داد که در طی دوره سالبانه رشد در سوزنی‌برگان، مقدار پراکسیداز تناسب معکوس با مقدار کانیفرین تولید شده دارد.

باید در نظر داشت که ماهیت این فرضیه‌ها اساساً بیوشیمیایی است و رفتار سلول‌ها را در کنترل لیگنینی شدن دیواره آنها نشان نمی‌دهد.

در بسیاری از مشاهدات آناتومیکی، ثابت شده است که لیگنینی شدن دیواره توسط سلول بصورت مستقیم کنترل می‌شود. به عنوان مثال با وجود اینکه دیواره فیبرها و تراکنیدها لیگنینی شده است لیکن لفاف روزنه‌ها (pit) معمولاً غیر لیگنینی باقی می‌ماند (Bamber ۱۹۶۱). ویا فیبرهای چوب کششی (چوب واکنشی نهاندانگان) که در مراحل اولیه تمایزیابی غالباً به صورتی است که از فیبر معمولی با دیواره ثانویه بخوبی لیگنینی شده تمیز داده نمی‌شود و علاوه بر این، یک لایه ضخیم لیگنینی نشده نیز بعداً تشکیل می‌گردد (شکل ۸) و یا درزایلیم اولیه کاج رادپاتا Wardrop (۱۹۵۷) مشاهده نمود که ضخامت ماریپیچی لیگنینی شده دیواره سلول روی دیواره اولیه که لیگنینی نشده است تشکیل می‌گردد.

هیچ یک از این مشاهدات سد راه فرضیه Freudenberg مبنی بر منشاء برون سلولی واحدهای سازنده لیگنین نمی‌شوند لیکن روشن است که قاعدتاً پروتوپلاست

کنترل کننده مرحله اصلی در ستر لیگنین است. زیرا ته نشینی سلولز و اجزاء ماتریس درزایلم ثانویه در حال تمایزیابی، همیشه مقدم بر لیگنینی شدن است. بدان معنا که سطح پروتوپلاست از ناحیه تحت لیگنینی شدن شدید دیواره، حذف می شود. اگر اینطور باشد، همانگونه که شواهد آناتومیکی نشان می دهند و پروتوپلاست، لیگنینی شدن را کنترل کند، می توان تصور نمود که واحدهای سازنده پس از تغییرات متابولیکی در پروتوپلاست به دیواره در حال تحول، عرضه می شوند. حالت دیگر این است که ماهیت شیمیایی ماتریس توسط پروتوپلاست بدین نحو کنترل شود که حاوی سوپسترای مناسبی باشد که واحدهای سازنده خارج سلول لیگنین بتوانند بعداً روی آن ته نشین شوند (Higuchi ۱۹۹۰). آزمایش های Siegel (۱۹۵۷) این فرضیه را مطرح کرد که ماهیت سوپسترا بر مقدار لیگنین ته نشین شده بر روی آن مؤثر است. نامبرده برای اینکار از سیستم های مدلی استفاده کرد که در آن کاغذ صافی مشتقات سلولز با پراکسیداز در حضور پراکسید هیدروژن و اوژنول اشباع شده بود.

Wardrop (۱۹۶۵) مشاهده نمود که در سلول هایی که در حال لیگنینی شدن هستند، وزیکول های کوچکی از سمت خارجی پلاسما، بخصوص در کناره های اتاق روزنه ها (Pit chambers) جمع می شوند (شکل ۹). هر چند محتویات این وزیکل ها معلوم نبود لیکن حدس زده می شد که حاوی واحدهای سازنده لیگنین، آنزیم ها و یا مواد معدنی باشند (Wardrop, ۱۹۶۵). Pickett – Heaps (۱۹۶۸) وقتی سینامیک اسید تریتم دار را به زایلم در حال تمایزیابی ریشه گندم وارد کرد، در داخل لیگنین ضخامت های دیواره گیاه جای گرفت و مشاهده شد که به وزیکل های مشتق شده از

دستگاه گلژی و رتیکولوم آندو پلاسمیک پیوسته است. از سوی Wardrop (۱۹۷۱) پیشنهاد شد که در حین لیگنینی شدن، β - گلوکوزیداز از سیتوپلاسم بداخل دیواره سلول منتشر می‌شود، و انتشار این آنزیم در حین عمل آزاد کردن اگلیکون از واحد سازنده گلوکوزید، می‌تواند فرآیند لیگنینی شدن را کنترل نماید .

جنبه‌های فیزیولوژیکی لیگنینی شدن :

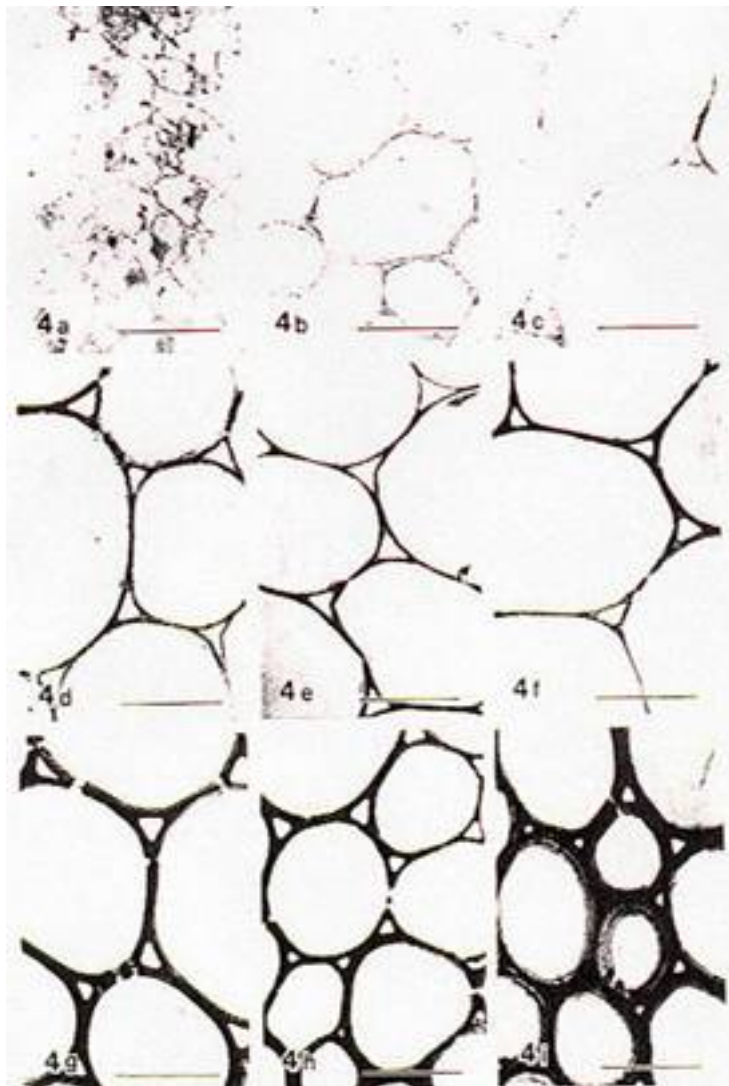
دوره رشد سالیانه در گیاهان چوبی در نوع سلول‌های تشکیل شده و ابعاد و درجه لیگنینی شدن آنها انعکاس می‌یابد. این تفاوتها را در دوایر رویشی ساقه و ریشه بصورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی می‌توان ملاحظه نمود. تجزیه چوب آغاز و چوب پایان تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان لیگنین نشان می‌دهد به طوری که لیگنین چوب پایان می‌تواند بسته به محل قرار گرفتن نمونه در درخت، کمتر، بیشتر و یا مساوی لیگنین چوب آغاز باشد. هر چند تحقیقات Manskaya (۱۹۴۸) (شکل ۱۰) نشان داد که در دایره رویشی تمایزیابی چوب آغاز و چوب پایان موازی تغییرات واحدهای سازنده لیگنین و آنزیم‌های اکسید کننده در ناحیه تمایزیابی پیش می‌رود.

تأثیر عوامل ژنتیکی در لیگنینی شدن توسط Nelson و Kuc (۱۹۶۴) و نیز تأثیر عوامل محیطی بر لیگنینی شدن نیز بررسی شد. Philips (۱۹۵۴) تأثیر نور مستقیم و غیر مستقیم را بر لیگنینی شدن زایلیم نشان داد.

Siegel (۱۹۵۶) دریافت که در گیاهان زرد شده سیب زمینی، لیگنین کمتری نسبت به گیاهان با شرایط روشنایی عادی یافت می‌شود و نیز مقدار لیگنین گیاهانی که تحت شرایط روشنایی قوی روئیده بودند کمتر از گیاهان تحت شرایط ملایم‌تر بود.

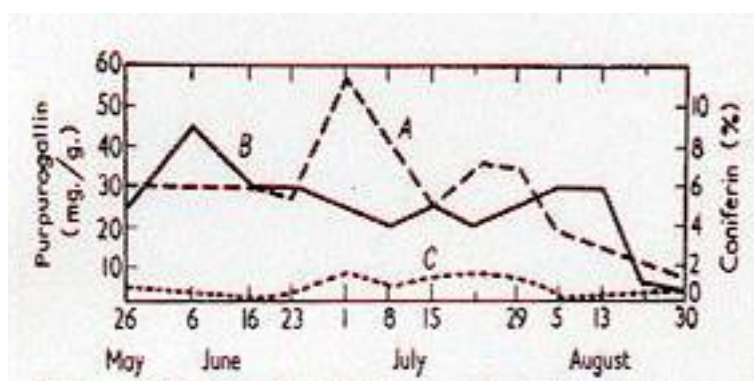
لیگنینی شدن در بامبو در زمان تمایزیابی در فیبر و پارانشیم‌ها در بافت زمینه خارج از ساقه (culm) آغاز شده و بطرف داخل گسترش می‌یابد. در هر میان‌گره

(internode) قسمت‌های فوقانی و تحتانی در میزان گسترش لیگنینی شدن به خصوص در حین طویل شدن ساقه‌ها متفاوتند.



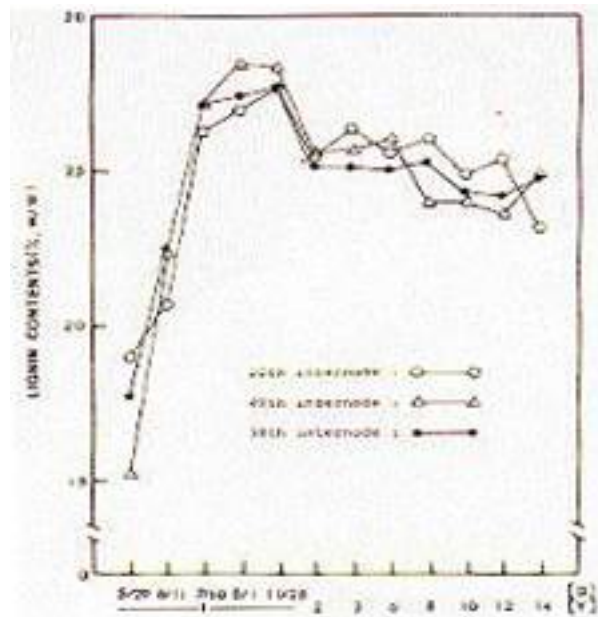
مأخذ: Itoh (۱۹۹۹)

شکل ۱۰- سلولهای پارانسیم بامبو در مراحل مختلف رشد



مأخذ: Manskaya (۱۹۴۸)

شکل ۱۱- تغییر پذیری فصلی کانفرین (B) و فعالیت پراکسیداز در کامبیوم نزدیک زایلوم (A) و در شیره کامبیوم (C)



مأخذ: Itoh (۱۹۹۹)

شکل ۱۲- میزان لیگنین در مراحل مختلف رشد بامبو

لیگنینی شدن تمام سلول‌های تشکیل دهنده در یک میان گره، روبه پائین گسترش می‌یابد. لیگنینی شدن سلول‌های پارانشیم حدود یک هفته دیرتر از فیبرها شروع می‌شود و در طی توسعه جست‌های جانبی و باز شدن برگ‌های جدید ادامه می‌یابد تا اینکه حد لیگنینی شدن به سطح معینی تا ۱۰ جولای (۱۹ تیر) و یا اول اگوست (۱۰ مرداد) برسد، یعنی هنگامی که عمل فتوسنتز بطور کامل انجام می‌شود. بنابراین افزایش معنی‌دار لیگنینی شدن تا آخر نوامبر (۹ آذر) دیده نمی‌شود (شکل ۱۱ و ۱۲).

روش بررسی :

نمونه برداری - نمونه برداری در دو فصل پاییز و زمستان از دو منطقه هفت تپه و کارون انجام شد. نمونه برداری پائیز (نیمه آبان) از منطقه هفت تپه و کارون صورت گرفت (سه درخت از هر منطقه). شاخه‌هایی با در نظر گرفتن ارتفاع شاخه بر روی درخت و جهت رویش آنها، بقطر حدود ۴ سانتیمتر با اره قطع شد. در فصل زمستان نیز (نیمه بهمن) از مناطق مذکور از هر محل سه درخت نمونه برداری شد و در حرارت ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه حمل شده است.

تهیه نمونه جهت بررسی آنزیمی:

عصاره‌گیری - کلیه نمونه‌ها بلافاصله بعد از برداشت در یخدان حاوی یخ خشک به ایستگاه تحقیقات منتقل و عصاره‌گیری شدند. جهت عصاره‌گیری ابتدا ۳ گرم از نمونه مورد نظر درهاون به خوبی سائیده و با ۶ cc محلول عصاره‌گیری (نسبت ۱ به ۲) (Eberman و Korori ۱۹۹۱) مخلوط و داخل لوله آزمایش که با پارافین درب آن بسته شده بود در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت ذخیره شد. نمونه‌ها در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و قسمت زلال رویی برای مطالعات بعدی در شیشه ای جداگانه نگهداری شد.

روش بررسی فعالیت کمی پراکسیداز (روش اسپکتروفتومتری):

مطالعات کمی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Colmant model 6/2) و طبق روش شیروانی (۱۳۷۷) انجام گرفت .

مواد لازم عبارتند از :

- ۱- بافر استات ۰/۱ مولار ۲ میلی لیتر { یک میلی لیتر بافر استات A (۱۱/۵۵) میلی لیتر اسید استیک / ۱۰۰۰ میلی لیتر } + یک میلی لیتر بافر استات B (۲۷/۲) گرم $C_2H_3O_3Na.3H_2O$ / ۱۰۰۰ میلی لیتر {
- ۲- آب اکسیژنه ۳۳٪ ۰/۴ میلی لیتر
- ۳- بنزیدین ۰/۰۱ مولار ۰/۲ میلی لیتر

بافر استات و بنزیدین را مخلوط کرده و سپس به مجموعه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه نمودیم در انتها آب اکسیژنه ۳٪ اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر هر ۶۰ ثانیه و تا ۶ دقیقه قرائت شد. از حداقل، حداکثر و

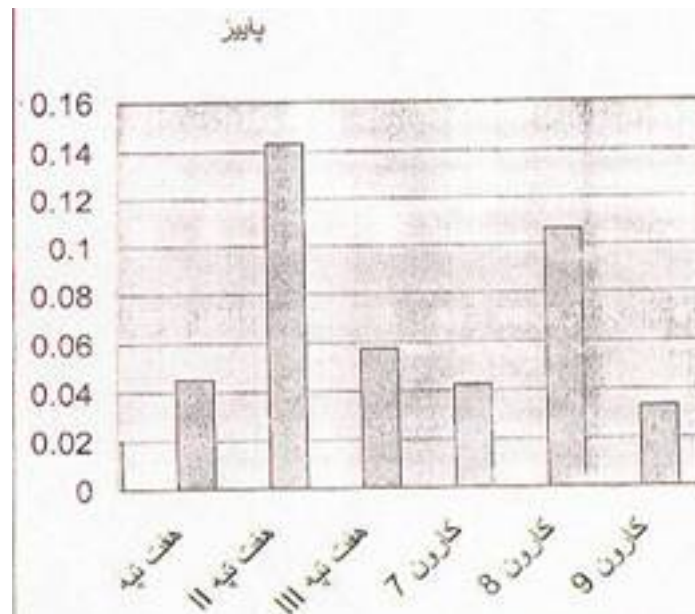
میانگین اعداد قرائت شده میزان فعالیت آنزیم در واحد زمان تعیین و مورد بحث قرار گرفت.

روش بررسی کیفی آنزیم پراکسیداز :

مطالعات کیفی با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی به روش PAGE (پلی اکریل امید ژل الکتروفورز) و طبق روش (Korori و Ebermann ۱۹۹۱) صورت گرفت (طراحی و ساخت دستگاه مذکور توسط کروری و خوشنویس انجام شده است).

تهیه نمونه جهت بررسی میزان لیگنین :

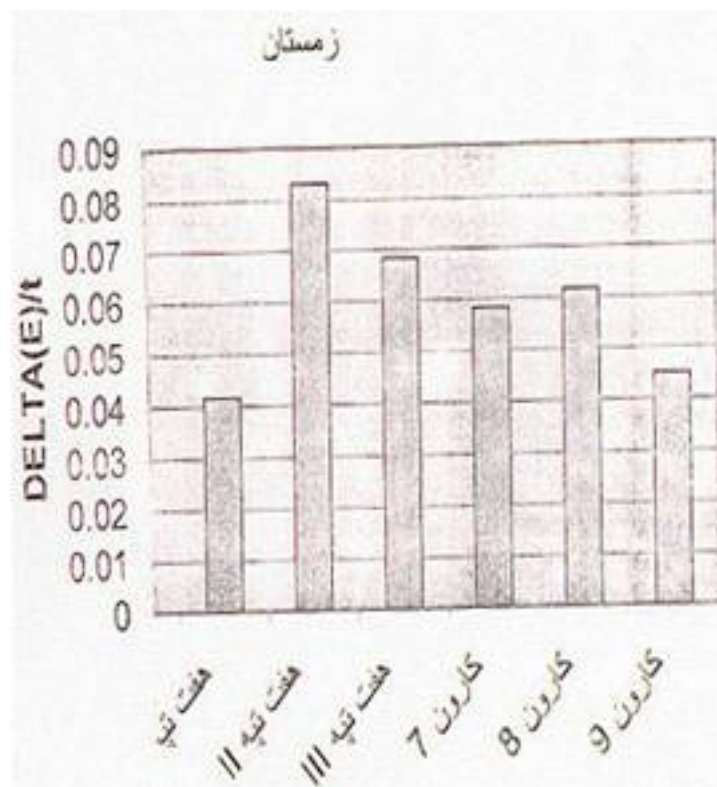
شاخه‌های مورد نظر را همراه با پوست بصورت خلال در آورده و سپس با آسیاب بصورت پودر و سپس با الک بصورت ذرات با ابعاد مورد نظر (جمع آوری شده بر روی الک ۸۰ مش) جمع آوری کردیم. پودر حاصل بوسیله مخلوط اتانول و استن عاری از مواد استخراجی شد. سپس لیگنین آن اندازه‌گیری و ثبت گردید (ASTM-D1106 – 84). در انتها بحثی در باره همبستگی قطر شاخه منطقه رویش، فصل فعالیت آنزیم و میزان لیگنین انجام شد.



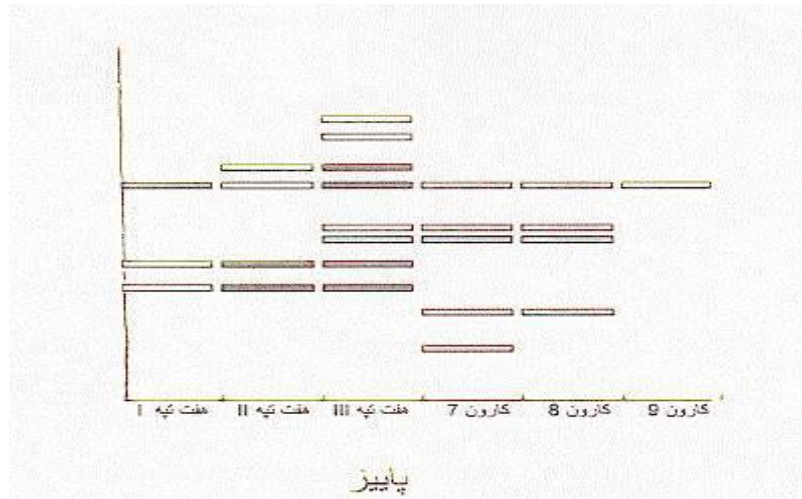
نمودار ۱- تغییرات کمی فعالیت آنزیم پراکسیداز در قطع پاییزه و ۳۲/۵

۵۷۱/۲

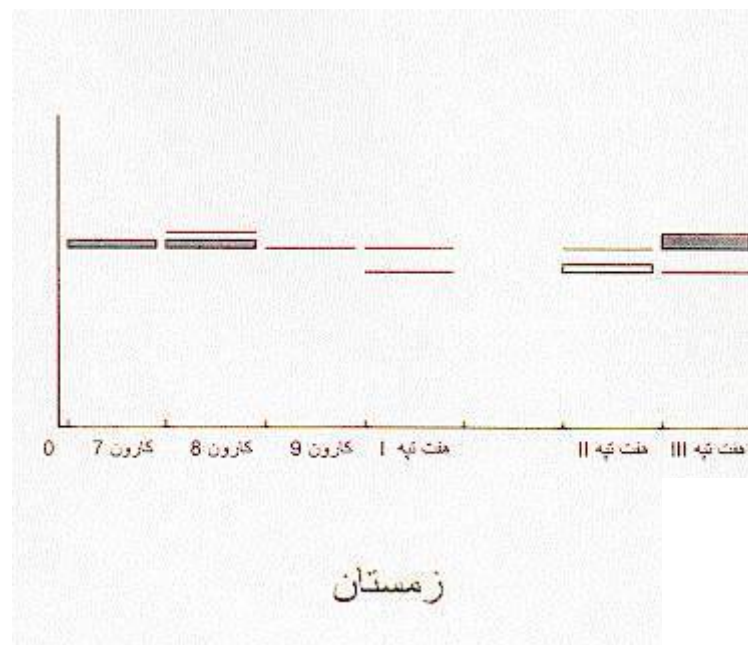
و ۲۷۳ میلیمتر است. اقلیم خشک بیابانی (بر اساس دو مارتن اصلاح شده) حداقل دما ۱۵/۳ حداکثر ۳۱/۷ و میانگین ۲۰ ساله آن ۲۳/۵ درجه است.



نمودار ۲- تغییرات کمی فعالیت آنزیم پراکسیداز از قطع زمستانه



نمودار ۳- الگوهای آنزیمی پراکسیداز در نمونه‌های پاییز



نمودار ۴- الگوهای آنزیمی پراکسیداز در نمونه‌های زمستان

مشخصات درختان بشرح جدول ذیل است. در منطقه کشت و صنعت کارون درختان سریعتر رشد کرده‌اند و تعدادی از پایه‌ها بعلت وزش باد سرنگون شده‌اند (عدم تعادل بین رشد ریشه و تاج) زمین پلات مسطح و کاملاً پوشیده از شاخه و برگ خشکیده اکالیپتوس است. درختان منطقه کارون آبیاری شده و بیشترین طراوت و شادابی را در منطقه داشتند.

سن (سال)	ارتفاع (متر)	قطر (سانتیمتر)	درخت
۱۵	۲۶	۴۰/۵	کارون ۷
۱۵	۲۳	۳۴	کارون ۸
۱۵	۲۵/۵	۳۳	کارون ۹
>۴۰	۲۵	۹۲	هفت تپه I
>۴۰	۲۶	۸۷	هفت تپه II
>۴۰	۲۳/۷	۱۱۱	هفت تپه III

نتایج :

نمودارهای ۱ و ۲ تغییرات کمی آنزیم پراکسیداز را در درختان نمونه و در دو فصل پائیز و زمستان نشان می دهد همانگونه که ملاحظه می شود در نمونه های آبان (پاییز) ما بین یک گونه در مناطق مختلف و نیز پایه های موجود در یک منطقه اختلاف زیادی وجود دارد.

در فصل زمستان بطور کلی تفاوت بین پایه های موجود در یک منطقه بسیار محدودتر شده است و نیز کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز بیش از افزایش آن چشمگیر است. جالب آن است که روند تغییرات فعالیت پراکسیدازی پایه در یک منطقه در پائیز و زمستان مشابه است.

در منطقه هفت تپه توافق فعالیت آنزیمها و الگوی ایزوآنزیمها دیده نمی شود (حداقل در مورد هفت تپه II)، لیکن سه باند ثابت در هر سه پایه وجود دارد. و نیز باندها در محل استقرار مولکولهای سنگین و سبک بیشتر گرایش می یابند بیشترین تعداد ایزوآنزیمها را هفت تپه III از خود نشان می دهد که هشت بانداست و در منطقه آبیونها بیشتر گسترش دارند. آخرین الگو متعلق به منطقه کارون است که مولکولهای تندرونده و کندرونده در اینجا ظاهر شده اند و مطابقت نسبی بین فعالیت آنزیم و این الگو وجود دارد.

نمودار ۴ الگوی ایزوآنزیمهای پراکسیداز را در فصل زمستان نشان داده است. در این فصل باندهای ظاهر شده به تعداد بسیار کم و با فعالیت کم می باشند، در منطقه هفت تپه، جایگاه ایزوآنزیمی پایه ها از شباهت نسبی برخوردارند و تعداد باندها هم مشابه است و این نتایج با فعالیت کمی آنزیم نیز مطابقت دارد. ضمن آنکه نسبت به

پائیز، تعداد باندها تقلیل یافته است و اکثر مولکول‌های تندرونده حذف شده‌اند تعداد باندهای ایزوآنزیمی در زمستان بمراتب محدودتر از پاییز و بین یک تا دو باند در منطقه استقرار مولکول‌های متوسط متغیر است. در جدول ذیل مشخصات مربوط به قطر شاخه‌ها، فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان لیگنین در دو فصل نمونه برداری آورده شده است :

جدول ۷- میزان لیگنین و فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاخه‌های اکالیپتوس کاملدولنسیس در دو فصل پاییز و زمستان

فعالیت آنزیم $\bar{X} \times 10^{-3}$		میزان لیگنین (%)		قطر (سائیمتر)		منطقه
زمستان	پاییز	زمستان	پاییز	زمستان	پاییز	
۴۱/۷	۴۹/۱	۲۲/۴۹	۲۵/۶۳	۲/۵	۳	هفت تپه I
۸۳/۳	۱۴۵/۰	۲۲/۵۹	۲۳/۸۰	۲/۴	۳/۲	هفت تپه II
۶۸/۳	۶۰/۰	۲۳/۸۳	۲۵/۲۶	۳/۱	۴/۶	هفت تپه III
۵۸/۳	۴۲/۵	۲۲/۹۰	۲۲/۳۴	۲/۰	۳/۵	کارون ۷
۶۱/۷	۱۰۶/۷	۲۴/۸	۲۷/۲۰	۳/۰	۳/۳	کارون ۸
۴۵/۰	۳۶/۷	۲۳/۱۰	۲۳/۳۰	۲/۵	۲/۸	کارون ۹

همانگونه که مشاهده می‌شود در نمونه‌های هفت تپه حداقل میزان لیگنین با حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز همراه است، بعلاوه حداقل قطر شاخه‌ها در هفت تپه با حداقل فعالیت آنزیم و حداکثر میزان لیگنین ارتباط دارد. بطور کلی در تمام نمونه‌ها حداقل قطر شاخه با حداقل فعالیت آنزیم همراه است.

بحث و نتیجه گیری :

پژوهش اخیر در زمان محدود و روی پایه‌های درختی معدودی انجام گرفته است. ولی هر چند با تردید حاوی نتایج قابل ملاحظه‌ای است. آنزیم پراکسیداز از آنزیمهای شناخته شده در فرآیند نهائی سنتز لیگنین می‌باشد. پژوهش در دو فصل مختلف سال (پائیز و زمستان)، همزمان، فعالیت پراکسیدازی و میزان لیگنینی شدن را مطالعه نموده است. نواحی نمونه‌برداری در این تحقیق شامل مناطق هفت تپه و کارون (خوزستان) بوده است. این پژوهش تنها روی ۶ پایه درختی نواحی هفت تپه و کارون از استان خوزستان بطور کامل انجام گرفته است. میزان لیگنین سازی و همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان مبتنی بر نوع گونه، محل نمونه‌برداری، فصل نمونه‌برداری و طبیعتاً زیربنای ژنتیکی درختان است. با توجه به ثبوت نوع گونه و فصل نمونه‌برداری، عوامل متغیر در این پژوهش شامل محل نمونه‌برداری و زیربنای ژنتیکی درختان است. دو منطقه هفت تپه و کارون هر دو متعلق به استان خوزستان و از نظر شرایط اقلیمی و بستر کاشت تقریباً مشابه می‌باشند. ضمناً در دو نقطه هفت تپه و کارون هر یک ۳ تکرار درختی داشته‌ایم. در این تکرار تغییرات میزان لیگنین‌سازی محدود، ولی تغییرات کمی آنزیم پراکسیداز، دامنه بسیار وسیعی داشته است.

مطالعه الگوهای ایزوآنزیمی پراکسیداز نیز معرف تنوع ژنتیکی زیاد پایه‌های تحت بررسی است. آنزیم پراکسیداز سه پایه هفت تپه و سه پایه کارون در فصل پائیز بسیار متغیر بوده، بنحوی که حداکثر فعالیت پراکسیدازی $10^{-3} * 145$ و حداقل آن

$10^{-3} * 36/7$ بوده است. تکرار پراکسیداز از ۶ پایه برداشت شده در فصل زمستان ۵۰٪ کاهش فعالیت و ۴۰٪ افزایش فعالیت پراکسیداز از زمستان را نسبت به پائیز معرفی نموده است.

پژوهش‌های انجام شده ثابت کرده است که ایزوآنزیمهای آندی پراکسیداز در عمل لیگنین سازی نقش دارند و این ایزوآنزیمها در ۵ مورد از ۶ مورد مطالعاتی، در فصل پائیز ظاهر و در زمستان ناپدید شده‌اند.

بنابراین نتیجه می‌شود که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز طی فصول مختلف در بافت‌های ثابت گیاهی متغیر است. حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز در شروع پریود سرما، حوالی اواسط پاییز مشاهده شده است (کروری و همکاران ۱۳۷۹). و بالاخره مجموعاً در ۶ پایه مطالعاتی در مناطق هفت تپه و کارون در دو فصل پائیز و زمستان متوسط میزان لیگنین ۲۴/۵٪ در برابر متوسط فعالیت پراکسیداز $10^{-3} * 73$ در فصل پائیز و متوسط میزان لیگنین ۲۳/۵٪ در برابر متوسط فعالیت $10^{-3} * 59$ در فصل زمستان قرار گرفته است.

نتایج این تحقیقات بخوبی رابطه لیگنین سازی را با تغییرات آنزیم پراکسیداز از نظر کمی و کیفی هر چند در تکرارهای معدود و زمان نمونه برداری محدود در گونه اکالیپتوس کاملدولنسیس پیشنهاد نموده است.

منابع:

- Abreu, H.S. , Nascimento, A.M. and Maria, M. A., 1999. lignin structure and wood properties, Wood and fiber science , 31 (4) PP . 426-433
- Adler, E . ,1977. lignin chemistry , past , present and future , wood Sci. technol. 11 : 169-218
- Allen ,C .E . ,1961 . Bot . Gaz , 32 , 1-34
- Allsop, A . and misra, P . ,1940. Biochem , J. 34, 1078
- Bailey I . W . , 1936. lignin in Douglas fir composition of the middle lamella . Ind. Eng . Chem . 8 , 52 – 55
- Bamber R . K . , 1961. Properties of the cell walls of the resin canal tissue of the sapwood and heartwood of Pinus lambertiana Dougl. and P . radata D . Don . J . Inst. wood Sci : 6 , 32 – 35
- Berlyn, G.p., and Mark, R. E . ,1965 . For . Prod. J . 140
- Bland, D.E., Foster,R.C. and Logan, A.F., 1971. Holzforschung. 25,137-143
- Brauns, F . E . ,1952 . The chemistry of lignin , Academic Press , New York , P . 440
- Carpita, N , C. and Guibeaut, D . M . , 1995. Structural models of primary cell walls in flowering plants : Consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth , the plant journal 3 (1) : 1- 30
- Cho, N . S. ,lee J . Y. , Meshitsuka, G . and Nakam, J . ,1980. On the characteristics of hard wood compound middle lamella lignin , Mokuzai Gakkaishi 26 : 527 – 533
- Crocker, E.C., 1921. Ind. Eng. Chem. 13,625-627
- Davin, L. B. and lewis, N. G. ,1995. lignin and lignin biochemical pathway in plant : an Unprecedented discovery in phenolic coupling . An . Acad . bras , Ci , 67 (supl . 3) : 364 – 378
- Ebermann, R. and Korori, S.A.A., 1991. Temperature dependant alteration of peroxidase and amylase isoenzymes in Quercus robur, Phyton, V.31: 121-128
- Fengel, D . and Wegener, G. ,1989 . Wood chemistry , Ultrastructure ,

- reactions. Walter de Gruyter ., Berlin , New York .
- Fergus , B . J. , Procter , A . R ., Scott , J . A. N . and Goring , D. A. I., 1969. wood Sci . Techhnol . 3 : 117
- Fergus, B.J. and Goring, D.A.I., 1970. Holzforschung
- Fukazawa, K., 1974 . The distribution of lignin in Compression and lateral – wood of *Abies sachalinensis* using ultraviolet microscopy . Res. Bull . Coll . Exp . For . Hokkaido Univ . , No. 31 . pp . 87-114
- Griffoen, K . , 1938. Rec . Trav . Bot . Neerl ., 35-322
- Hardell, H. L., leary G.Z., Stoll, M. and Westermarck, U. , 1980. Variations in lignin structure in defined morphological parts of birch . Svensk papperstid , 83 , 44 – 49 , 71 – 74
- Hepler, P. K . , Fosket, D. E. and Newcomb, E. H. , 1970. lignification during secondary wall formation in *Coleus* : an electron microscope study . Am . J . Bot . 57, 85- 96
- Higuchi , M ., Shimada, F ., Nakatsubo. F . and Tanahashi, M ., 1977. Difference in biosynthesis of Guaiacyl and Syringyl lignins in woods . wood Sci . Technol . 11: 153-167
- Higuchi T., 1959. Studies on the biosynthesis of lignin in : Biochemistry of wood (K . Kratz and G . Billek , eds) Pergaman Press , New York pp. 161 – 188
- Higuchi T., 1990. Lignin biochemistry, Biosynthesis and biodeyadation wood Sci . and Technol . 24 , 25 – 63
- Hotman, C. J . and Atalla, R . H. , 1995. Cellulose – lignin interaction , Plant physiol , 107: 977 –984
- Howard, E . T ., 1973. Wood Sc : 5 , 312-317
- Kerr, T. and Bailey, I.W., 1934. The cambium and its derivative tissues . IV, Structure , optical properties and chemical composition of the so – called middle lanella J . Arnold Arb . 15 , 327 –349
- Kuc,J. and Nelson, O.E., 1964. Arch. Biochem. Biophys., 105,103
- Lange, P.W. and Kjaer, M., 1957. Quantitative chemical analysis of the different parts of the cell wall in wood and cellulose fibers by interference microscopy Nor, Skogind , 17 , 425-432
- Lange, P W . (1954) Svensk papperstid , 57 , 235

- Lewis N . G . and Yamamoto, E ., 1990. Lignin Occurrence biogenesis and biodegradation. Ann. Rev . Plant Physiol. plant Mol . Biol , 41 : 455-496
- Luger, F. and Gampe, S., 1978. Potentel forstlicher Reststoffe (Waldabfale) , Vol . 2 Bericht Forstl . Fak . Universtat Munchen pp. 84 – 158
- Manskaya, S. M. and Kochneva ,M. N., 1948. Doklady Akad , Nauk S.S.S. R 6 : 505
- Meier, H., 1961. J. Polym , Sci . 51, 11-18
- Meier, H., 1955. Holz Roh- Uwerkstoff, , 13, 323
- Musha Y . and Goring, D.A.I., 1975. Wood Sci . Technol 9, 45-58
- Miksche, G.E. and Yasuda ,S., 1977. Holzforschung 31 , 57-59
- Nose, M., Bernards, M.A., Furlan, M., Zajcek, J., Eberhardt, T. and Lewis, N.G., 1995. Toward the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. Phytochemistry 39: 71-79
- Parham, D., 1974. Distribution of lignin in kraft pulp as determined by electron microscopy . Wood Sci. : Technol . 5 , 49-62
- Philips, E.W.J., 1954. Nature,174,85
- Pickett – Heaps, J. D., 1968. Xylem wall deposition radioautographic investigations using lignin precursors. Protoplasma 65 , 181-205
- Ritter, B.J. and Flek, L. C., 1926. Chemistry of wood , IX , Springwood and Summerwood, Industrial and engineering chemistry 18 : 608-9
- Ruch, F. and Hentgartner, H., 1960. Beih , Z . Schweiz . Forstrers . 30 – 75
- Ruel, K., Burlat, V. and Joseleau, J. P., 1999. Relationship between ultrastructural topochemistry and wood properties . IAWA Journal , Vol. 20 (2) , 203-211
- Saka, S. and Goring, D.A.I., 1985. Localization of lignins in wood cell walls , In : Biosynthesis and biodegradation of wood components (T . Higchi , ed .) Academic Press , Orlando , pp. 51 – 62
- Saka, S. and Thomas, R.J., 1982 . A study of lignification in loblolly

- pine tracheids by the SEM – EDXA technique wood Sci. Technol . 16 : 167-179
- Saleh, T.M. , Leney, L. and Sarkanen, K.V.,1967. Radioautographic studies of cotton wood , Douglas fir and wheat plants , Holzforschung 21 , 116 –120
- Sarkanen, K. V. and Ludwig, C.H., 1971. Lignins, occurrence formation, Structure and reactions. Wiley – Interscience . New York , NY, 882 pp : 325 –380
- Siegel, S. M., 1954. Physiologia Plantarum. 7 . 41
- Siegel, S. M., 1957. J. Amer, Chem , Soc. 79, 628
- Siegel, S. M., 1956. Quart , Rev. Biol , 31, 1
- Srivastava, L. M., 1966. Histochemical studies on lignin . Tappi 49 (4) 173 – 183
- Tirumalai , V. C., Agarwal, U. P. and Obst, J. R., 1996. Heterogeneity of lignin concentration in cell corner middle lamella. J. Pulp paper Sci. 16,150-155
- - - Towers, G. H. N. and Gibbs, R. D., 1953. Nature , 172 , 25
- Wardrop, A. B., 1957. The phase of lignification in the differentiation of wood fibers , In : the formation of wood in forest trees (M. H Zimmermann ed .) pp. 87 – 88 Academic Press , New York .
- Wardrop, A. B., 1971. Occurrence and formation in plants In : lignins ; Occurrence , Formation , Structure and reactions (K . V . Sarkanen , and C. H. Ludwig , eds.) wiley Interscience , New York PP : 19 – 4
- Wardrop, A. B., 1965. Cellular differentiation in xylem In : cellular Ultrastructure of woody plants W. H. Cote (ed.) Syracuse , New York : Syracuse Univesity Press .
- Wardrop, A. B. and Harada , 1965. J.Exp. Bot. 16, 356-371
- Wardrop, A. B. and Dadswell, 1955. Aust. J . Bot ., 3, 177 .
- Whetten, R. and Sederoff, R., 1995. Lignin biosynthesis. The plant cell, 7 : 1001 – 1013
- Wood, J.R. and Goring,D.A.I., 1971. Pulp and Paper Magazine of canada, 72,no. 3,61-68
- Yamasaki, T., Hata, K. and Higuchi, T., 1976. Dehydrogenation polymer of sinapyl alcohol by peroxidase and hydrogen

peroxide , Mokuzai Gakkaishi 22 , 582 – 588 .

**Effects of environmental factors on formation of lignin in
Eucalyptus Camaldulensis Dehn. grown in Khosestan-Iran**

By:

Toghraei N. ; A. Hosseinzadeh; D. Parsapajouh and F. Golbabaei

**Wood and Paper Science Division
Research Institute of Forests and Rangelands
P.O.Box: 131585-363. Fax: 021-6603482
Tehran-Iran
toghraei@rifr-ac.ir**

Abstract :

Peroxidases are enzymes which catalyse two final steps in the wood lignin biosynthesis. The connection between xylem peroxidase activities and wood xylem lignification was examined by determining peroxidase activities in the stems of eucalypt (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn.) trees during two seasons in 1999 over the period of annual growth. In addition, samples from the same trees were examined for lignin content. This study clarifies the possible roles of this enzyme in lignin biosynthesis and forms a background for further work on the last steps in lignin polymerisation. The peroxidase activity of some samples was lower in Autumn. But in the others there was a great increase in Autumn vs. winter. Though in Autumn there were more isoenzyme. The results show a relation between lignification and Peroxidase enzyme zones. In *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. In khozestan.

Key words: Lignification, Peroxidase, *Eucalyptus camaldulensis*.

