

"مقاله پژوهشی"

بررسی صفات ریزریختی برگ و گرده در جنس افرای (*Acer L.*) ایران

داود کرتولی نژاد^۱، فاطمه شایان مهر^۲ و علیرضا مشکی^۳

۱- استادیار گروه جنگلداری مناطق خشک، دانشکده کویرشناسی دانشگاه سمنان (نویسنده مسوول: kartooli58@semnan.ac.ir)

۲- دانش آموخته دکتری رشته جنگلداری دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار گروه جنگلداری مناطق خشک، دانشکده کویرشناسی دانشگاه سمنان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/ / تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/ /

صفحه: تا

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: جنس افرا (*Acer L.*) از خانواده *Aceraceae* اغلب درختانی خزان‌کننده‌اند که تقریباً پراکنش همه آنها در مناطق معتدله نیم کره شمالی است. این جنس دارای ۱۴۸ تا ۱۵۰ گونه سراسر جهان است و در فلورهای مختلف ایران به حضور ۸ تا ۱۰ گونه بومی از این جنس اشاره شده است. برخی از گونه‌های افرا در جنگل‌های هیرکانی دارای ارزش تجاری فراوانی هستند و ارتفاع این درختان به ۴۰ تا ۴۵ متر می‌رسد. جنس افرا از مهم‌ترین عناصر رویشی درختی در اغلب رویشگاه‌های جنگلی ایران است و جنگل‌های هیرکانی بیشترین تنوع آرایه‌های این جنس در ایران را در خود جای داده است. علی‌رغم مطالعات مولکولی و ریختی بر روی اعضای این جنس در دنیا، بررسی‌های کاملی در زمینه صفات ریزریختی آنها صورت نگرفته است. بنابراین، تحقیق حاضر به تشریح ارزش رده‌بندی صفات ریزریختی اپیدرم برگ و گرده اعضای این جنس در ایران می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۱ آرایه افرای موجود در ایران (۹ آرایه بومی و ۲ آرایه وارداتی) از رویشگاه‌های هیرکانی و زاگرس جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. آرایه‌ها مورد بررسی عبارت بودند از: *A. hyrcanum*, *A. velutinum*, *A. platanoides*, *A. mazandaranicum*, *A. campestre*, *A. cappadocicum*, *A. negundo*, *A. palmatum*, *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens*, *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum*, *A. monspessulanum* subsp. *ibericum* نمونه‌های برگ هر یک از پایه‌ها، از شاخه‌های رشد کرده در آفتاب تهیه و جهت جلوگیری از کپک زدن به روش نمونه‌های هر بار بومی خشک شدند. نمونه‌های خشک شده برگ جهت تهیه برش به مدت ۳ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. سپس با استفاده از تیغ جراحی برش‌های نازکی از اپیدرم فوقانی و تحتانی وسط برگ و از مجاورت رگبرگ مرکزی تهیه شد. جهت رنگبری و شفاف شدن نمونه‌ها، به مدت ۵ دقیقه در محلول آب ژاول قرار داده شدند. پس از شستشوی با آب مقطر در زیر میکروسکوپ توری عکسبرداری و مطالعه شدند. برای مطالعه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، اپیدرم سطح پشتی و رویی برگ و نمونه‌های گل‌های هر یک از آرایه‌ها بر روی پایه‌های آلومینیومی چسبانده شد. سپس با استفاده از دستگاه لایه نشان طلا بر سطح کلیه نمونه‌های گرده و برگ، ورقه‌های نازک طلا پاشیده شد و با استفاده از Scanning Electron Microscope فلپس عکس برداری شدند. شدت ولتاژ ۲۰ کیلو ولت و بزرگنمایی تصاویر از ۲۵۰۰ تا ۵۱۰۰ برابر بوده است. نوع گرده، صفات ریخت‌شناسی گرده‌ها، موم‌های اپی کوتیکولی، کرک‌ها، شکل دیواره سلول‌های اپیدرم، تیپ روزنه، تراکم و شاخص روزنه از میکروفوتوگراف‌های تهیه شده، طبقه‌بندی و مطالعه شد.

یافته‌ها: ریخت‌شناسی موم‌های اپی کوتیکولی در آرایه‌هایی همچون *A. platanoides*, *A. hyrcanum*, *A. mazandaranicum*, *A. velutinum* و حتی برخی از زیرگونه‌های *A. monspessulanum* کاملاً منحصر به فرد بوده است. ساختارمندترین نوع موم‌های اپی کوتیکولی در *A. velutinum* مشاهده شد. به طوری که اطراف برخی از روزنه‌ها ساختارهای روزنه‌مانند مدوری را تشکیل می‌دهند که در هیچ آرایه دیگری قابل مشاهده نبود. سطح تحتانی برگ در *A. platanoides* نیز به طور منحصر به فردی با یک لایه کاملاً صاف و یکدست از موم پوشیده شده بود. ساختارهای خاصی از موم بر سطح *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens* و *A. mazandaranicum* مشاهده می‌شود که باعث می‌شود سطح سلول‌های اپیدرمی آرایه اولی برجسته و در دومی فرورفته به نظر برسد. بیشترین شاخص روزنه و تعداد روزنه در واحد سطح مربوط به دو گونه غیربومی یعنی *A. negundo* و *A. palmatum* و کمترین آن مربوط به آرایه‌های *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens*, *A. velutinum* var. *velutinum* و *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum* است. که بسیاری از روزنه‌ها در زیر لایه‌های موم اپی کوتیکولی پوشیده و مدفون می‌شوند و در اطراف سایر روزنه‌ها نیز کرک‌ها و کریستال‌های موم جهت کاهش میزان تبخیر و تعرق حضور می‌یابند. بنابراین می‌توان ادعان نمود آرایه‌های بومی نام برده مقاومت به خشکی بالاتری نسبت به سایرین دارند. الگوی دیواره سلول‌های اپیدرم آرایه‌ها، در سه نوع مختلف طبقه‌بندی شد؛ متمایزترین آنها در *A. platanoides* دیده شد که دیواره کاملاً مواج داشت. دیواره نسبتاً مواج فقط در *A. negundo* دیده شد و در سایر آرایه‌ها دیواره سلولی صاف و مستقیم مشاهده شد. تیپ سلول‌های همراه روزنه در همه آرایه‌ها آموسیتیک بود در حالی که در *A. mazandaranicum* تیپ پاراسیتیک کاملاً متمایز و غالب بوده است. کرک‌ها در همه آرایه‌های واجد کرک، ساده و بدون انشعاب بودند که از نظر اندازه به دو گروه دارای کرک‌های کوتاه و دارای کرک‌هایی بلند قابل تفکیک هستند. در هیچ یک از صفات ریختی گرده نظیر شکل گرده (Isopolar) کشیده یا Prolate تا کروی یا spheroidal)، تزئینات اگزینی (شیاردار یا Striate)، فرم شکاف‌های گرده (Colpi) و حتی تعداد شکاف‌های گرده (سه شکاف-حرفه‌ای Tricolporate) تمایز اختصاصی منحصر به آرایه خاصی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد، صفات ریزریختی برگ می‌تواند به حل مشکلات رده‌بندی جنس افرا کمک کند. اما ریخت‌شناسی و نوع گرده برای این جنس چنین قابلیت را ارائه نمی‌دهد. در کل تمایز صفات اپیدرم میان آرایه‌های جنس افرای مورد مطالعه نشان داد که سطح زیرین برگ، دارای مشخصه‌های اپیدرمی مفیدی به خصوص از نظر موم‌های اپی کوتیکولی است که می‌تواند نقش مهمی در طبقه‌بندی، توصیف و تعیین حدود آرایه‌ها ایفا نموده و به عنوان ابزاری مفید در سیستماتیک گیاهی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: افرا، موم‌های اپی کوتیکولی، شاخص روزنه، کرک، میکروسکوپ الکترونی

مقدمه

جنس افرا (*Acer L.*) از خانواده *Aceraceae* اغلب درختانی خزان‌کننده‌اند که پراکنش همه آنها به‌استثنای گونه *A. laurinum* در مناطق معتدله نیم کره شمالی است (Suh et al., 2000; Hakim and Miyakawa, 2013).

نیز همیشه سبزاند که بومی مناطق مدیترانه و جنوب آسیا هستند (نظیر *A. sempervirens*، *A. oblongum*، *A. coriaceifolium*...). قاره آسیا و به‌ویژه چین و ژاپن اکثر

گونه‌های این جنس را در خود جای داده است. به نظر می‌رسد منشأ این گونه کشور چین باشد؛ چراکه امروزه بیشترین تعداد گونه و سکشن افراها در این کشور وجود دارد (van Gelderen et al., 1994; Suh et al., 2000; Kim and Kim, 2023; Novotná et al., 2023). بنا به نظر برخی از محققین نه تنها حدود نیمی از گونه‌های افرا در کشور چین وجود دارد بلکه نزدیک‌ترین خویشاوند این جنس (*Dipteronia*) که تنها دارای دو گونه است نیز اندمیک چین است (Kim and Kim, 2023; Wang et al., 2023). جنس افرا دارای ۱۴۸ تا ۱۵۰ گونه است (Suh et al., 2000) که بر اساس گزارش The Plant List (2010) از ۶۰۱ نام علمی ثبت شده برای این جنس، تعداد ۱۶۰ گونه افرا در دنیا پذیرفته شده است. بیشتر این گونه‌ها در اوراسیا و به‌ویژه شرق آسیا وجود دارند و سهم آمریکای شمالی تنها ۹ گونه است (van Gelderen et al., 1994; Kim and Kim, 2023; Wang et al., 2023).

در ایران ثابتی (Sābitī, 1976) به حضور ۸ گونه بومی در قالب ۱۳ آرایه اشاره نموده است؛ از این تعداد *Acer monspessulanum* دارای ۵ زیرگونه و *A. velutinum* دارای دو وارسته است. در فلورا ایرانیکا نیز به حضور ۱۰ گونه افرا در ایران اشاره شده است (Murray and Rechinger, 1969). در کروموفیت‌های ایران (Ghahreman, 1992) نیز به حضور ۱۰ گونه افرا در ایران اشاره نموده است که غالباً عناصر اصلی رویشگاه‌های جنگلی ایران را تشکیل می‌دهند. این در حالی است که در فلور کشورهای مجاور نیز حدوداً همین تعداد ذکر شده است. مثلاً Davis (1965) نیز در فلور ترکیه از ۱۱ گونه افرا نام برده است. گونه‌های افرای موجود در ایران، از درختان بزرگ (مانند *A. velutinum* Boiss. و *A. mazandaranicum* Amini, Zare & Assadi, sp. nov.)

با ارتفاع تا ۴۵-۴۰ متر و قطر برابر سینه بیش از ۱۵۰ سانتیمتر تا درختچه‌هایی با ارتفاع کمتر از ۲ متر را شامل می‌شوند. بزرگ‌ترین گونه‌های جنس افرا در ایران، در جنگل‌های با تنوع زیستی زیاد هیرکانی واقع در شمال ایران (دامنه‌های شمالی البرز) مشاهده می‌شوند (*A. velutinum*, *A. mazandaranicum*, *A. cappadocicum* Gled., *A. hyrcanum* Fisch. & C. A. Mey.؛ جایی که برخی از این گونه‌ها (*A. platanooides* L., *A. campestre* L. و *A. hyrcanum*) تا ارتفاع ۲۶۰۰ متری از سطح دریا و برخی دیگر (نظیر *A. velutinum*) تا پایین‌ترین حد ارتفاعی رویش یعنی ۵- متر از سطح دریا به چشم می‌خورند. بیشترین تنوع گونه‌ای جنس افرا در ایران نیز مربوط به ناحیه هیرکانی است و سایر گونه‌های این جنس در دامنه‌های خشک و نیمه خشک جنوبی رشته کوه البرز و همچنین در دامنه‌های زاگرس واقع در غرب و حتی جنوب ایران می‌رویند (Sābitī, 1976; Amini et al., 2008).

گرچه در بررسی‌های فیلوژنتیک با استفاده از مارکرهای مولکولی و ژنوم کلروپلاستی تا حدودی موقعیت قرارگرفتن گونه‌های نزدیک و مشابه این جنس معین شده است، اما روابط فیلوژنیک میان سکشن‌ها و گونه‌های مورد بررسی کاملاً درک نشده و هنوز صفات ریختی ماکرو، از ارکان اساسی شناسایی برخی از گونه‌های این جنس محسوب می‌گردند (Suh et al., 2023).
Scotland و همکاران (2003) معتقدند که مطالعات دقیق صفات ریزریختی در کنار مطالعات ویژگی‌های ریختی و فیلوژنی مولکولی جهت کامل کردن رده‌بندی جنس‌ها می‌تواند مفید باشد. از آنجا که بررسی اپیدرم برگ در مطالعات فیلوژنی و رده‌بندی مهم تلقی می‌شود (Soheili et al., 2023) توجه متخصصین رده‌بندی به سمت صفات ریزریختی اپیدرم برگ جهت حل مشکلات رده‌بندی جلب شده است (Hardin, 1979). سیستم روزنه از دو سلول محافظ که منفذی را احاطه می‌کنند و غالباً با سلول‌های مجاور (*Subsidiary cells*) همراه می‌شوند تشکیل شده است. سلول‌های محافظ روزنه ساختار بسیار خاصی داشته و با سایر سلول‌های اپیدرم متفاوت هستند (Abid et al., 2007). تعداد و نظم سلول‌های همراه مدت‌های طولانی است که به عنوان ویژگی‌های سیستماتیک استفاده شده است. ویژگی‌های ریزریختی اپیدرم داری ارزش ویژه‌ای هستند؛ چراکه محققان با داشتن تکه‌ای از مواد گیاه قادر به بررسی دقیق آن هستند. Radford (1974) ویژگی‌های کوتیکول، اپیدرم، روزنه، سلول‌های همراه و کرک‌ها را صفات ریزریختی دارای اهمیت سیستماتیک بالا می‌داند. روزنه اولین بار توسط Stresburger (1866) و به دنبال او Vesque (1889) مطالعه شد که ۴ طبقه عمده از روزنه بر اساس حضور و نظم سلول‌های همراه تشخیص داده شد. تاکنون اشخاص زیادی روزنه‌ها را بر اساس ساختار و شکل سلول‌های همراه طبقه بندی نموده اند که مهمترین آنها Rasmussen (1981), Payne (1979), Cotthem (1970) و Metcalf و Chalk (1950) می باشند. همچنین Stace (1980) ۳۱ نوع مختلف از تیپ روزنه را در دوپله ای‌ها گزارش نمود. Yasmin و همکاران (2009) اپیدرم برگ ۶ گونه متعلق به ۲ جنس از خانواده Polygonaceae را با استفاده از میکروسکوپ نوری مطالعه کردند. ویژگی‌های سطح برگ شامل شکل سلول‌های اپیدرم، الگوی روزنه، توزیع آن در دو طرف سطح برگ و انواع کرک دارای اهمیت رده‌بندی فراوانی بوده است. Hayat و همکاران (2010) نیز، اهمیت رده‌بندی خصوصیات اپیدرمی برگ را با بررسی میکروسکوپی روزنه در ۲۴ گونه *Artemisia* مورد بحث قرار دادند. نتایج مطالعات ایشان نشان داد که خصوصیات آناتومیکی اپیدرم برگ در این جنس به اندازه‌ای حائز اهمیت هستند که می‌توان برای طبقه بندی نژادها در داخل این جنس از آن‌ها بهره برد. در ایران نیز در سال‌های اخیر استفاده از صفات ریزریختی برای حل مشکلات رده‌بندی جنس‌هایی از درختان جنگلی همچون

مطالعه صفات ریزریختی برگ و گرده گونه‌های مهم این جنس در ایران بپردازد. بنابراین یکی از اهداف اصلی تحقیق حاضر تشریح ارزش رده‌بندی صفات ریزریختی اپیدرم برگ در میان گونه‌های مختلف افرای ایران بوده است. در این تحقیق تیپ روزنه و سلول‌های همراه، شکل موم و نوع کرک ۹ آرایه بومی و ۲ آرایه وارداتی (که در فضای سبز اکثر شهرهای ایران کاشته شده است) با استفاده از میکروسکوپ SEM و نوری مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۱۱ آرایه افرای موجود در ایران مورد بررسی قرار گرفت: ۹ آرایه بومی و ۲ آرایه وارداتی.

A. velutinum Boiss.; *A. cappadocicum* Gled.; *A. platanoides* L.; *A. hyrcanum* Fisch & C. A. Mey; *A. mazandaranicum* Amini, Zare & Assadi sp. nov.; *A. campestre* L.; *A. monspessulanum* L. subsp. *Ibericum* (M.Bieb.) Yalt.; *A. monspessulanum* F. & M. subsp. *cinerascens* (Boiss.) Yaltrik; *A. monspessulanum* L. subsp. *Turcomanicum* (Pojark) Rech. F.; *A. negundo* L.; *A. palmatum* var. *atropurpureum* Van Hootte.

جدول ۱ نمونه‌های تهیه شده مربوط به آرایه‌های افرا که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت را نشان می‌دهد.

Fagus توسط Saeedi و همکاران (2015)، *Carpinus* توسط *Chapolagh Paridari* و همکاران (2012)، جنس *Alnus* توسط *Shayanmehr* و همکاران (2018)، جنس *Betula* توسط *Kordalivand* و *Sattarian* (2015)، جنس *Castanea* توسط *Akbarinia* و همکاران (2011) و حتی فرم‌های ریختی به وجود آمده از گونه *Pinus eldarica* توسط *Shayanmehr* و همکاران (2009) به خوبی مورد استفاده قرار گرفته است.

به رغم کاربرد و اهمیت اکولوژیکی درختان جنس افرا، هنوز از نظر رده‌بندی ابهامات زیادی در مورد جایگاه آنها وجود دارد. زیرا به دلیل استفاده از صفات محدود (کمتر از ۱۵ صفت) در رده‌بندی این سرده، نبود سیستم شناسایی دقیق گونه‌های این جنس (به علت همپوشانی پراکنش گونه‌ها که در ایجاد افراد هیبرید و واریته‌های متعدد نقش مهمی دارد)، وجود نام‌های مترادف متعدد، تأثیر تغییرات اقلیمی و آب و هوایی بر گونه‌زایی و همچنین وجود پلی‌مورفیسم برگ، وضعیت رده‌بندی برخی از گونه‌های آن همچنان با ابهام روبرو است (Gao et al., 2020). از آنجایی که این جنس یکی از عناصر اصلی اغلب رویشگاه‌های جنگلی ایران را تشکیل می‌دهد و نیز به دلیل ارزش اکولوژیک، حفاظت خاک و مصارف اقتصادی زیاد آن و وضعیت نامشخص رده‌بندی آن، در این پژوهش، سعی شده به

جدول ۱. مشخصات آرایه‌های افرای نمونه برداری شده در تحقیق حاضر

Table 1. Characteristics of maple taxa sampled in this research

آرایه‌های افرا و نام فارسی Maple taxa and Persian name	پراکنش Distribution	محل جمع آوری Sampling location	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)
<i>A. cappadocicum</i> Gled. شیردار	بومی Native	سیاهکل، سنگده، ویسر، لاهیجان Siahkal, Sangdeh, Veysar, Lahijan	1200-1600
<i>A. platanoides</i> L. افرای چناری	بومی Native	رامسر، نوشهر، چالوس Ramsar, Noshahr, Chalous	500-1000
<i>A. campestre</i> L. کرب	بومی Native	کجور، اسالم، چالوس، رامسر Kojour, Asalem, Chalous, Ramsar	1500-2000
<i>A. velutinum</i> Boiss. افرا پلت	بومی Native	مینودشت، انزلی، پارک ملی گلستان، نور Minoudasht, Anzali, Golestan national park, Nour	800-1500
<i>A. hyrcanum</i> Fisch. & C.A.Mey. افرای هیرکانی یا سفید کرکو	بومی Native	کجور، چالوس، رامیان Kojour, Chalous, Ramian	1700-2100
<i>A. monspessulanum</i> subsp. <i>cinerascens</i> (Boiss.) Yalt. کیکم شیرازی	بومی Native	نمونه هرباریومی-فیروزآباد، سنندج، خرم آباد Herbarium sample-Firouz Abad, Sanandaj, Khoram Abad	2000-2200
<i>A. monspessulanum</i> subsp. <i>ibericum</i> (Willd.) Yalt. کیکم قفقازی	بومی Native	نمونه هرباریومی-کجور، پل سفید Herbarium sample-Kojour, Pol Sefid	1300-2000
<i>A. monspessulanum</i> subsp. <i>turcomanicum</i> (Pojark.) Rech.f. کیکم ترکمنی	بومی Native	نمونه هرباریومی-بجنورد، قوچان Herbarium sample-Bojnord, Ghouchan	1100-1500
<i>A. mazandaranicum</i> Amini, Zare & Assadi, sp. nov.	بومی Native	نمونه هرباریومی-دودانگه ساری، سنگده Herbarium sample-Dodandeh Sari, Sangdeh	1500-1900
<i>A. negundo</i> L. افرای سیاه یا ابلغ	وارداتی Introduced	نور، ساری، نوشهر Nour, Sari, Noshahr	10-50
<i>A. palmatum</i> Thunb. افرای ژاپنی	وارداتی Introduced	نور، ساری، لاهیجان Nour, Sari, Lahijan	10-50

قرار گرفتند تا در اثر تورژانس، دیواره سلول‌ها ترد شده و برش گیری آسان شود. سپس به روش دستی و با استفاده از تیغ‌های جراحی برش‌های نازکی از اپیدرم فوقانی و تحتانی آن‌ها از قسمت وسط برگ و از مجاورت رگبرگ مرکزی تهیه شد. برش‌های میکروسکوپی، جهت رنگبری سلول‌ها از رنگبزه کلروفیل به مدت ۵ دقیقه در محلول آب ژاول قرار داده شد

روش بررسی با میکروسکوپ نوری

نمونه‌های برگ از شاخه‌های رشد کرده در آفتاب، مربوط به هر یک از آرایه‌ها جهت جلوگیری از کپک زدن ابتدا خشک شدند (به روش نمونه‌های هرباریومی لابه‌لای صفحات روزنامه و تحت فشار). نمونه‌های خشک شده برگ در زمان مطالعه ریزریختی و جهت تهیه برش به مدت ۳ دقیقه در آب جوش

(Shayanmehr et al., 2009). پس از شستشوی با آب مقطر دو بار تقطیر بر روی لام قرار گرفت و با میکروسکوپ نوری MICROS AUSTRIA مدل N-180 عکسبرداری و مطالعه شد (بزرگنمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰). مطالعات میکروسکوپ نوری در آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در نهایت، شناسایی، توصیف و طبقه بندی کرک و سلول‌های روزنه از روی میکروفوتوگراف‌های تهیه شده بر اساس روش Metcalf و Chalk (1950) و طبقه بندی موم-های اپیکوتیکولی بر اساس روش Barthlott و همکاران (1998) انجام شد. جهت تعیین مقیاس و ابعاد سلول‌های محافظ و شکاف روزنه، از لام مدرج در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی‌های ۴۰۰x و ۱۰۰۰x عکسبرداری شد. سپس از نمونه‌های اپیدرم با این بزرگنمایی‌ها در زیر میکروسکوپ عکسبرداری گردید. از هر نمونه ۱۰ تصویر و در هر تصویر ۵ عدد روزنه مورد اندازه گیری ابعاد سلول‌های محافظ روزنه و شکاف روزنه قرار گرفت. از روی میکروفوتوگراف‌های تهیه شده، در محیط نرم افزارهای Zeiss AxioVision 4.8 و ImageTools 3.0 ابعاد سلول‌ها و ویژگی‌های اپیدرم با دقت 0.02 μm اندازه گیری گردید (Shayanmehr et al., 2007, 2009).

روش بررسی با میکروسکوپ الکترونی SEM

جهت مطالعه ویژگی‌های موم‌ها و اپیدرم سطح پشتی و رویی برگ آرایه‌های مختلف افرا، نمونه‌های برگ بالغ به صورت کاملاً خشک شده در ابعاد ۶-۵ میلی‌متر مربع برش خورد و بر روی پایه‌های آلومینیومی (stub) ثابت شدند. گل‌های دارای کیسه-های گرده بالغ در داخل کیسه‌های پلاستیکی جمع آوری شد و نمونه‌های گرده آنها نیز بدون هر گونه شستشو با اسید به طور مستقیم بر روی پایه‌های آلومینیومی با چسب تثبیت شد. سپس با استفاده از دستگاه لایه نشان طلا (Sputter coater) BAL-TEC مدل SCDOOS (ساخت کشور سوئیس) بر سطح کلیه نمونه‌های گرده و برگ، ورقه‌های نازک طلا پاشیده شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning Electron Microscope) فلیپس مدل XL30 (ساخت کشور هلند) عکس برداری شد (Shayanmehr et al., 2009, 2015, 2018). شدت ولتاژ ۲۰ کیلو ولت و بزرگنمایی تصاویر از ۲۵۰۰ تا ۵۱۰۰ برابر بوده است. مطالعات میکروسکوپ الکترونی در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در انتها، شاخص روزنه بر اساس تصاویر میکروسکوپ نوری اندازه گیری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Shayanmehr et al., 2008, 2009):

$$\text{تراکم سلول‌های روزنه} = \frac{\text{تراکم سلول‌های اپیدرم} + \text{تراکم سلول‌های روزنه}}{\text{شاخص روزنه}} \times 100$$

نتایج

سطح زیرین (Abaxial) برگ گونه افرا پلت یا *Acer velutinum* پوشیده از موم‌های گرانولی به ابعاد غالباً کمتر از ۱۰ میکرومتر است. علاوه بر این، بر خلاف کلیه آرایه‌های مورد مطالعه، ساختارهای کریستالی روزت ماندنی به ابعاد ۵ تا ۱۰ میکرومتر در اطراف بسیاری از روزنه‌ها تجمع یافته‌اند. این روزت‌ها عمدتاً به تعداد ۷ تا ۱۰ عدد در گرداگرد هر روزنه

مشاهده می‌شوند. کرک‌ها بلند، ساده، بسیار انبوه و کشیده‌اند. روزنه‌ها همسطح با اپیدرم هستند و تیپ سلول‌های اطراف روزنه‌ها Anomocytic می‌باشد (شکل ۱ A و B).

سطح زیرین برگ افرای چناری یا *Acer platanoides* از یک لایه موم بسیار صاف و یکدست بدون هر نوع بیرون‌زدگی و نیز بدون تشکیل هر نوع ساختار کریستال خاصی از موم‌ها پوشیده شده است. کوتیکول فاقد کرک و روزنه‌ها نیز هم‌سطح با اپیدرم هستند (شکل ۱ C و D). تیپ روزنه در این گونه از افرا Anomocytic می‌باشد. بر خلاف سایر آرایه‌ها، سلول‌های اپیدرم دارای دیواره بسیار موجدار و موج می‌باشند (شکل ۴ B). سطح زیرین اپیدرم برگ شیردار یا *Acer cappadocicum* با لایه‌ای از موم که سطحی ناصاف و چروکیده داشته پوشیده شده است و اغلب در محل تلاقی دیواره‌های سلولی، کمی بیرون‌زدگی دارد. در کل کوتیکول در این گونه نیز همچنان فاقد کریستالوئیدهای خاصی است. کرک‌ها بسیار اندک و پراکنده هستند و تنها بر روی رگبرگ‌ها و محل انشعاب رگبرگ‌ها مشاهده می‌شوند. سطح کرک‌ها دارای ظاهری پرزدار می‌باشد. روزنه‌ها همسطح بوده و در اغلب موارد کاملاً در زیر لایه موم مخفی می‌باشند. تیپ روزنه‌ها Anomocytic است (شکل ۱ E و F).

سطح زیرین برگ کرب یا *Acer campestre* پوشیده از یک لایه موم صاف و یکدست است که در برخی موارد دارای بیرون‌زدگی‌های بی‌شکل و فاقد کریستال می‌باشد. اپیدرم فاقد کرک و روزنه‌ها همسطح با سلول‌های اپیدرم هستند (شکل ۱ G و H). تیپ روزنه Anomocytic است.

اپیدرم تحتانی افرای خزری (سفید کرکو) یا *Acer hyrcanum* پوشیده از یک لایه موم ناصاف است که در روی سلول‌های اپیدرم برجسته به حالت بی‌شکل بیرون‌زدگی‌های لیه‌دار و اغلب رشته‌مانند ایجاد نموده است. رگبرگ‌ها در زیر لایه موم به سختی دیده می‌شوند. کرک‌ها ساده و بلند هستند که در اطراف رگبرگ‌ها و انشعابات آن حضور دارند. روزنه‌ها با انبوه موم‌های بی‌شکل محصور و اغلب در زیر لایه موم پوشیده شده‌اند (شکل ۲ A و B). تیپ روزنه Anomocytic است و سلول‌های اپیدرم دارای دیوار صاف و مستقیم‌اند (شکل ۴ D). سطح زیرین برگ سیاه کرکو یا کیکم قفقازی *A. monspessulanum* subsp. *ibericum* پوشیده از یک لایه موم ناصاف است که اغلب در روی نیمی از مرز سلول‌های اپیدرم کمی بیرون زده است. کرک‌های ساده و بلند در اطراف رگبرگ‌ها مشاهده می‌شوند. روزنه‌ها کاملاً همسطح و تیپ روزنه Anomocytic است (شکل ۲ C و D). سلول‌های اپیدرم دارای دیوار صاف و مستقیم هستند.

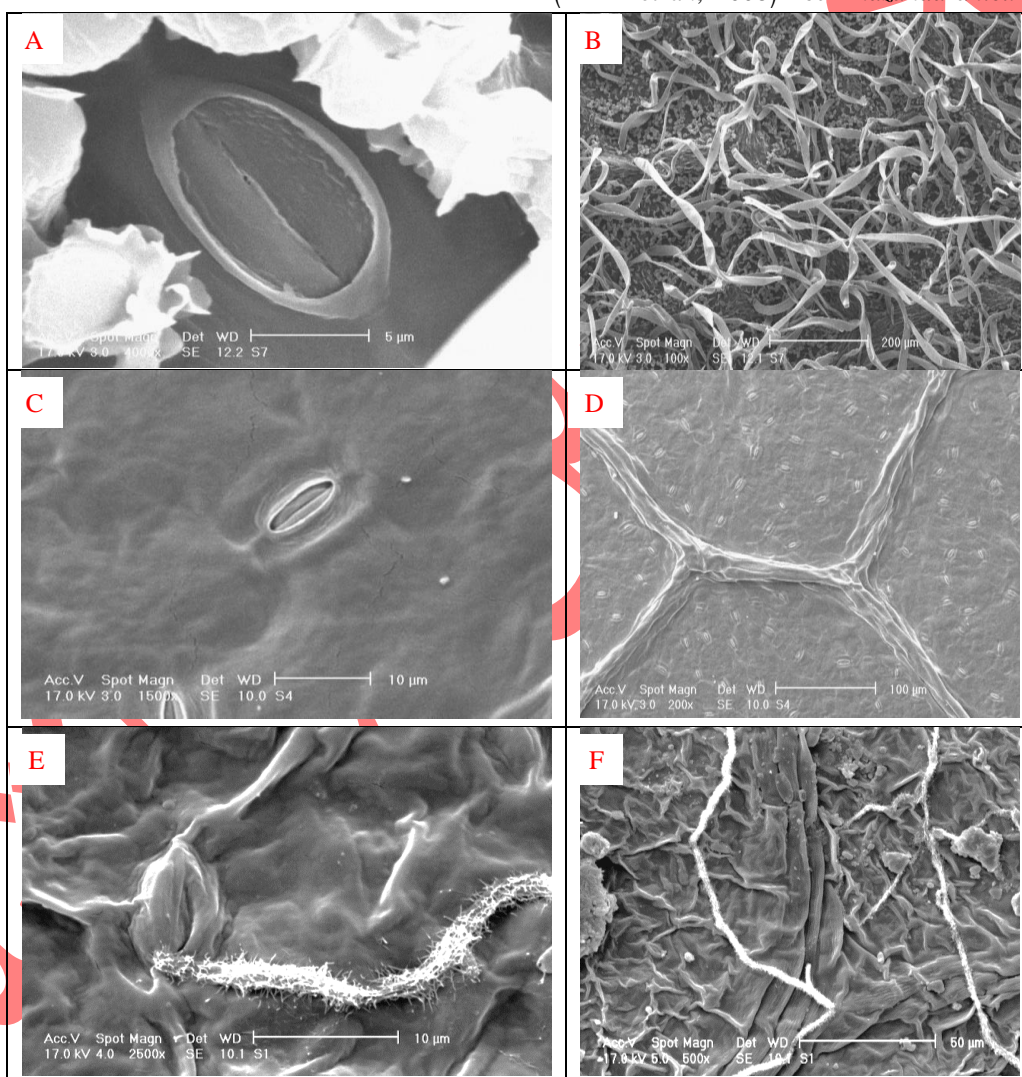
سلول‌های اپیدرم تحتانی کیکم ایرانی یا کیکم شیرازی با نام علمی *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens* به واسطه کپه‌های موم بر سطح هر سلول برجسته شده و مرز سلول‌ها را به طور بارزی مشخص نموده است؛ به طوری که در بسیاری موارد سلول‌های اپیدرم به راحتی قابل شمارش‌اند. موم‌ها به شکل رشته‌های ظریف و کوچکی روی یک لایه ضخیمی پاشیده شده‌اند. کرک‌ها بسیار فراوان، کوچک و یک اندازه در تمام سطوح اپیدرم مشاهده می‌شوند. روزنه‌ها هم

پوشیده از یک لایه ضخیم موم ناصاف است و رگبرگها از زیر لایه موم به سختی دیده می شوند. مومها در مرز بین سلولها (دیواره سلولها) برجسته شده به طوری که بر روی مرکز سلولهای اپیدرم به حالت فرورفتگی دیده می شود. سطح سلولهای اپیدرم نیز با کریستالهای رشته ای کوچک پوشیده شده است. اپیدرم فاقد کرک و روزنهها هم سطح اما در زیر مومها فرورفته اند و به سختی دیده می شوند (شکل ۳ A و B). تیپ روزنه بر خلاف تمامی گونه های تشریح شده، Paracytic است و سلولهای اپیدرم مانند اکثر آرایه های این جنس دارای دیوار صاف و مستقیم هستند (شکل ۴ A).

سطح و اغلب توسط مومها محصور شده اند (شکل ۲ E و F). تیپ روزنه Anomocytic و دیواره سلولهای اپیدرم نیز صاف و مستقیم است.

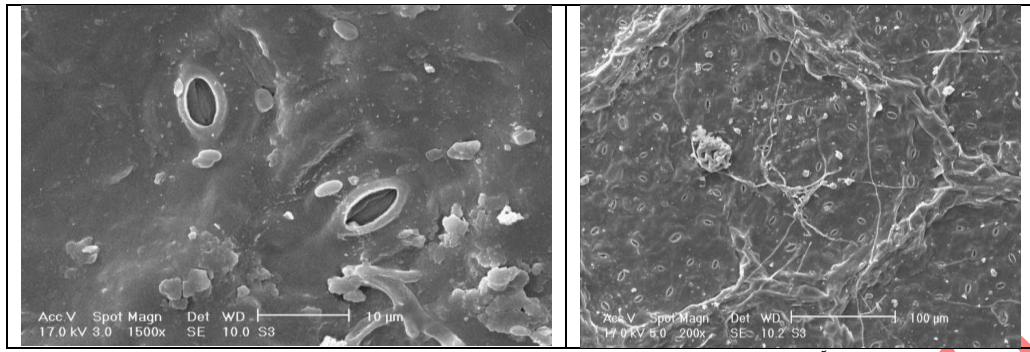
سطح زیرین یکم ترکمنی با نام علمی A. *monspessulanum* subsp. *turcomanicum* از یک لایه موم ناصاف و ضخیم پوشیده شده است. کرکها در اطراف رگبرگها تجمع دارند. روزنهها هم سطح اما اغلب به سختی از زیر لایه ضخیم موم پیدا هستند (شکل ۲ E و F). تیپ روزنه Anomocytic و سلولهای اپیدرم دارای دیواره صاف و مستقیم است.

سطح زیرین در گونه جدیداً معرفی شده از استان مازندران یعنی *Acer mazandaranicum* (Amini et al., 2008)



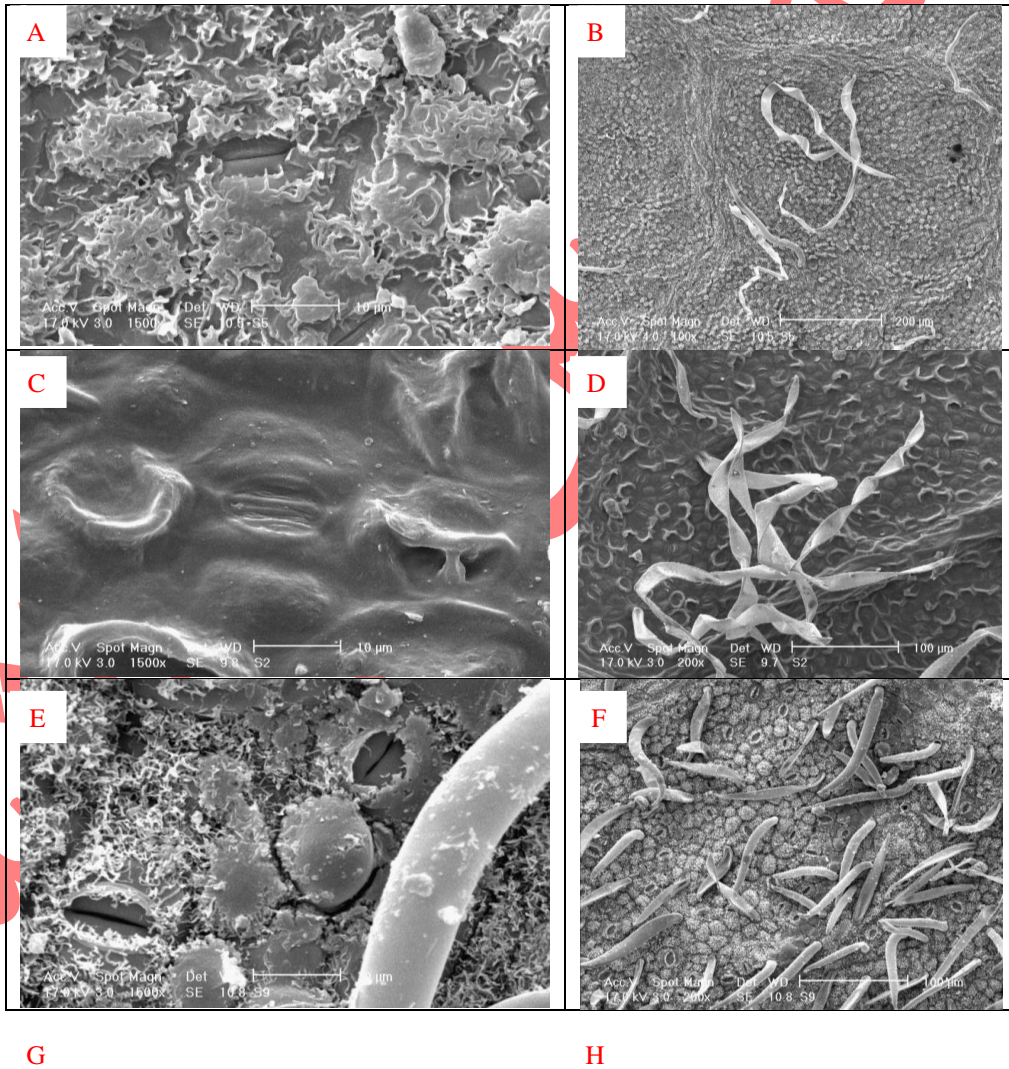
G

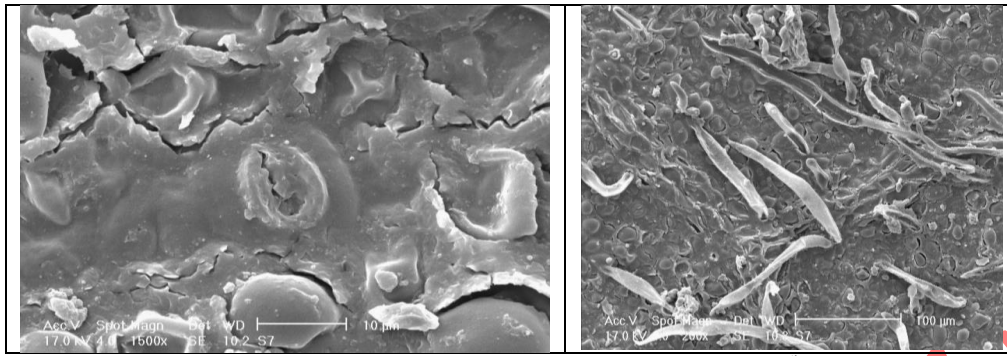
H



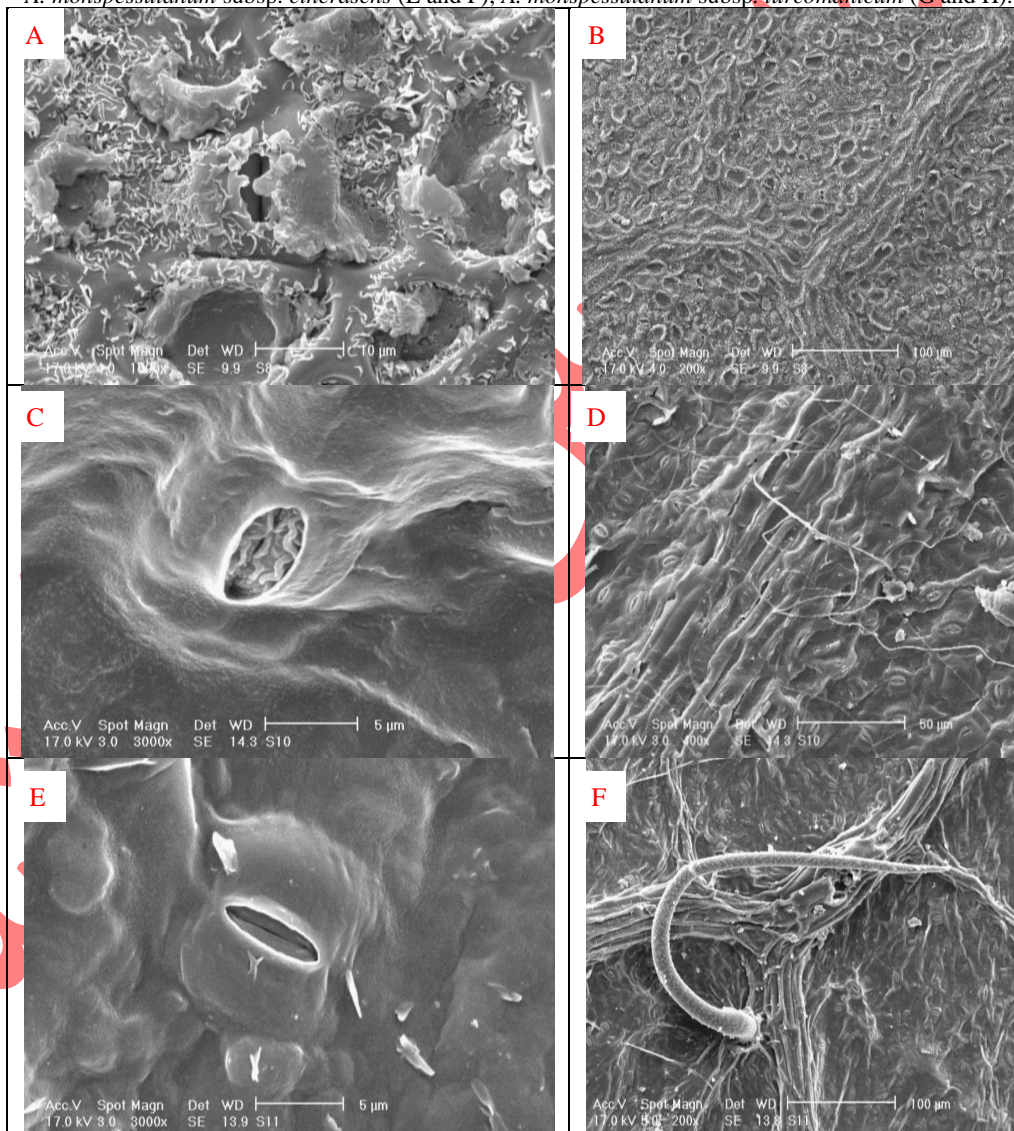
شکل ۱. سطح زیرین برگ آرایه‌های افرا: (B و A) *A. velutinum*; (D و C) *A. platanoides*; (F و E) *A. cappadocicum*; (H و G) *A. campestre*

Figure 1. Leaf abaxial surface of maple taxa: *A. velutinum* (A and B); *A. platanoides* (C and D); *A. cappadocicum* (E and F); *A. campestre* (G and H).





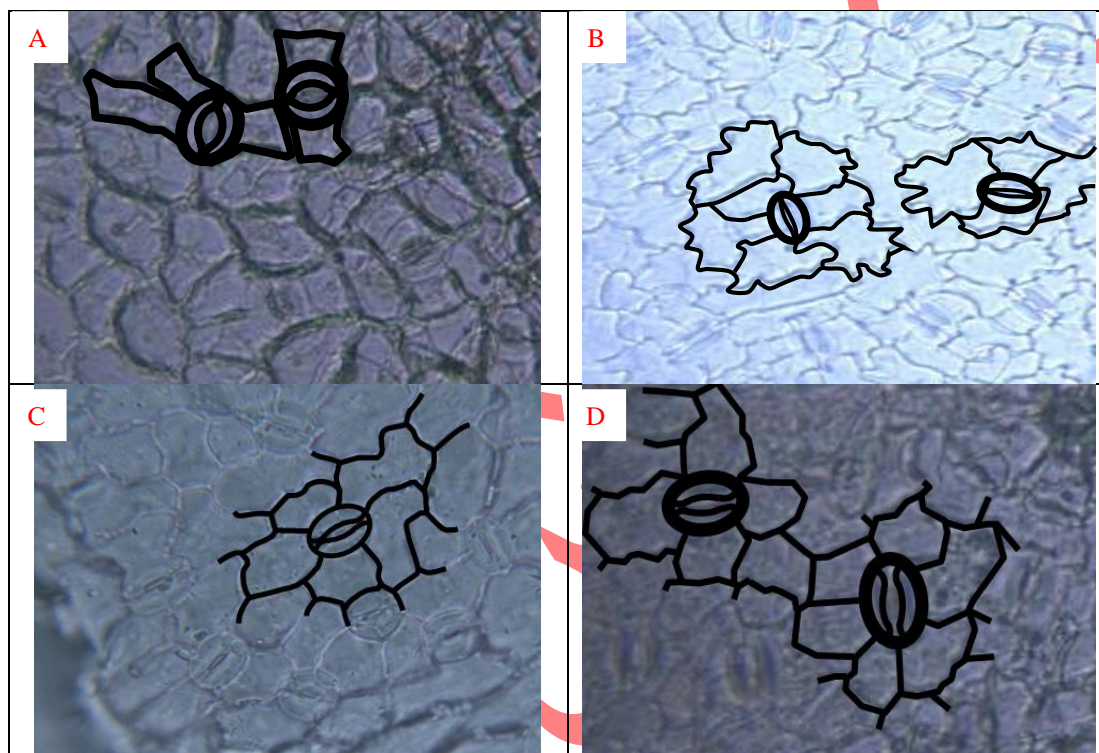
شکل ۲. سطح زیرین برگ آرایه‌های افرا: (B و A) *A. hyrcanicum*; (D و C) *A. monspessulanum* subsp. *ibericum*; (F و E) *A. monspessulanum* subsp. *cinerasens*; (H و G) *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum*; (A and B) *A. hyrcanicum*; (C and D) *A. monspessulanum* subsp. *ibericum*; (E and F) *A. monspessulanum* subsp. *cinerasens*; (G and H) *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum*.



شکل ۳. سطح زیرین برگ آرایه‌های افرا: (B و A) *Acer mazandaranicum*; (D و C) *A. palmatum*; (F و E) *A. negundo*; (A and B) *Acer mazandaranicum*; (C and D) *A. palmatum*; (E and F) *A. negundo*.

سطح زیرین اپیدرم برگ گونه وارداتی سیاه یا ابلغ با نام علمی *Acer negundo* پوشیده از یک لایه موم ناهموار و بدون شکستگی و بیرون زدگی خاصی می‌باشد. کرک‌های ساده و بلند در اطراف و روی رگبرگ‌ها مشاهده می‌شوند. روزنه‌ها هم‌سطح و مشخص‌اند (شکل ۳ E و F). تیپ روزنه Anomocytic و سلول‌های اپیدرم دارای دیواره کمی موج‌اند (شکل ۴ C).

سطح زیرین اپیدرم برگ گونه غیر بومی وارداتی و رایج در فضاهای سبز ایران یعنی افرا ژاپنی با نام علمی *Acer palmatum* پوشیده از یک لایه موم ناصاف بدون شکستگی و بیرون زدگی کریستالی است. اپیدرم فاقد کرک و سلول‌های لوبیایی روزنه نسبت به سطح اپیدرم برجسته است. روزنه‌ها کاملاً آشکار و مشخص‌اند و دارای موم‌های رشته‌ای بر روی اتاقک روزنه هستند (شکل ۳ C و D). تیپ روزنه در این گونه Anomocytic است. سلول‌های اپیدرم دارای دیواره موج‌اند.

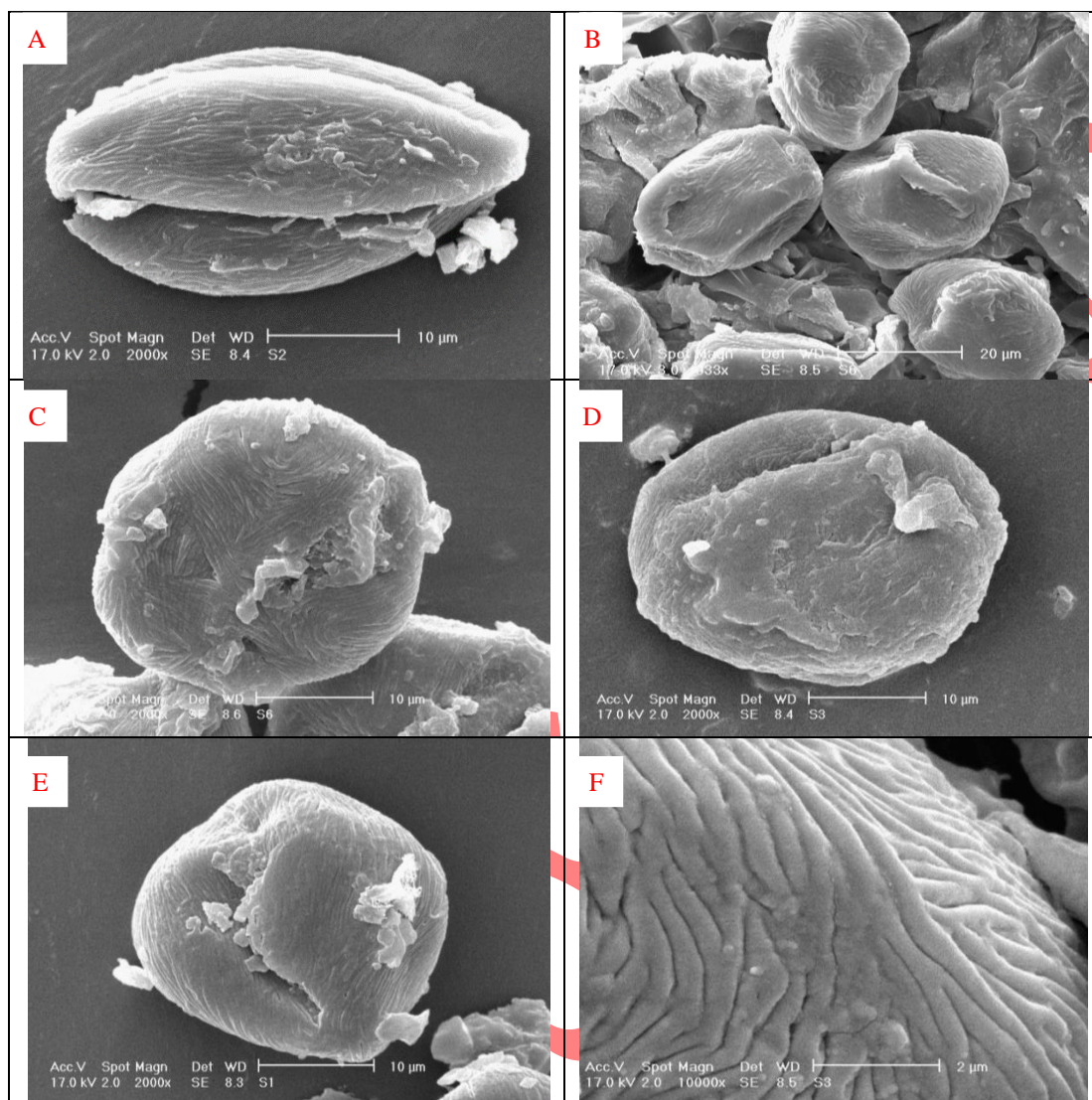


شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰۰X) از اپیدرم تحتانی برگ *A. mazandaranicum* (A)، *A. platanoides* (B)، *A. negundo* (C)، *A. hyrcanum* (D).

Figure 4. Light microscope images (200x magnification) of leaf abaxial epidermis of *A. mazandaranicum* (A), *A. platanoides* (B), *A. negundo* (C), *A. hyrcanum* (D).

دانه‌های گرده تمامی افراهای ایران سه شکاف-حفره‌ای (Tricolporate) است که از نظر شعاعی متقارن یا نسبتاً متقارن‌اند. شکاف‌های Colpi تقریباً تا نزدیکی قطب‌ها گسترش داشته و پهن هستند. قطر گرده‌ها ۲۲-۳۵ میکرومتر و قطر Apocolpi ۲-۹ میکرومتر است. سطح گرده در همه آرایه‌های مورد بررسی، دارای تزئینات اگزینی شیاردار یا Striate است که دارای چین‌های ظریف (Rugulose) و غالباً موازی است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی از گرده ۱۱ آرایه جنس افرا در شکل ۵ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود شکل گرده در این جنس Isopolar کشیده یا Prolate تا کروی یا spheroidal است. هیچ گونه تنوعی در بین آرایه‌ها از نظر نوع و ساختار گرده قابل تفکیک نیست؛ به گونه‌ای که تمامی انواع این گرده‌ها تقریباً در همه این آرایه‌ها قابل مشاهده بوده و هیچ یک از آرایه‌ها نوع گرده منحصر به خود را نشان ندادند.



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از گرده آرایه‌های جنس افرا. شکل گرده در این جنس Isopolar، کشیده یا Prolate تا کروی یا spheroidal است.

Figure 5. SEM electron microscope images of the pollen of maple taxa. The shape of pollen in this genus is isopolar, prolate to spheroidal.

تیپ روزنه، شاخص روزنه (%، تراکم روزنه در واحد سطح (تعداد روزنه در میلی‌متر مربع)، ابعاد روزنه و سلول‌های محافظ اندازه‌گیری و در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. مشخصه‌های اندازه‌گیری شده از روزنه‌ها در اپیدرم تحتانی برگ ۱۱ آرایه افرا (میانگین \pm انحراف معیار)

Table 2. Measured characteristics of stomata in leaf abaxial epidermis of the 11 maple taxa (Mean \pm Standard error)

آرایه‌ها Taxa	تیپ روزنه Type of stomata	کرک Trichome (μm)	شاخص روزنه (%) Stomatal index (%)	تراکم روزنه Stomata density (n/mm^2)	سلول محافظ Guard cell (μm)		حفره روزنه Stomatal aperture (μm)	
					طول Length	عرض Width	طول Length	عرض Width
<i>A. campestre</i>	Anomocytic	-	15.1	465.6	19.08 \pm 1.46	6.90 \pm 0.96	9.82 \pm 2.52	4.64 \pm 1.63
<i>A. cappadocicum</i>	Anomocytic	-	18.1	535.5	21.97 \pm 1.92	6.78 \pm 1.24	9.54 \pm 2.32	3.34 \pm 1.22
<i>A. monspessulanum</i> subsp. <i>cinerascens</i>	Anomocytic	103 \pm 15.6 Very dense	14.3	308.3	27.59 \pm 3.23	8.33 \pm 1.45	16.06 \pm 3.02	7.07 \pm 1.84
<i>A. monspessulanum</i> subsp. <i>turcomanicum</i>	Anomocytic	111 \pm 17.2 Frequent	12.5	422.8	25.01 \pm 2.92	7.27 \pm 1.02	14.12 \pm 1.81	6.44 \pm 1.35
<i>A. monspessulanum</i> subsp. <i>ibericum</i>	Anomocytic	273 \pm 27.7 Sparse	18.8	438.8	24.05 \pm 2.46	7.33 \pm 0.98	14.47 \pm 1.80	7.82 \pm 1.15
<i>A. mazandaranicum</i>	Paracytic	-	11.4	293.9	19.66 \pm 1.81	6.71 \pm 0.60	10.47 \pm 1.00	6.42 \pm 0.97

<i>A. platanoides</i>	Anomocytic	-	16.3	525.9	20.42±2.49	6.39±1.04	7.46±1.25	2.56±0.61
<i>A. hyrcanum</i>	Anomocytic	376±35.2 Sparse	14.5	527.6	20.97±2.58	6.67±1.54	10.37±1.93	4.71±1.47
<i>A. velutinum</i> var. <i>velutinum</i>	Anomocytic	357±42.6 Very dense	14.2	413.3	26.20±4.15	8.31±1.45	16.78±1.79	6.90±1.61
<i>A. negundo</i>	Anomocytic	437±52.1 Very sparse	27.5	632.7	17.23±1.60	5.41±1.04	8.92±1.10	3.11±0.59
<i>A. palmatum</i>	Anomocytic	-	19.2	859.7	16.10±1.23	5.81±1.40	7.17±1.24	1.99±0.60

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت رده‌بندی ویژگی‌های اپیدرمی توسط بسیاری از گیاه‌شناسان برجسته گزارش شده است (Metcalf and Chalk, 1950; Pavne, 1979; Rasmussen, 1981; Bassi and Monet, 2008; Omuchi et al., 2018; Santos et al., 2020). Stace (1980) اظهار داشت که برگ بیشتر از تمامی اندام‌های زایشی و رویشی در مطالعه رده‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین مطالعه‌ای که توسط Soheili و همکاران (2023) بر روی ۱۰ گونه از ۱۰ جنس درختی و درختچه‌ای مختلف در ایلام انجام شد بیانگر تمایز زیاد صفات ریزریختی در بین جنس‌های مورد بررسی بوده است.

در مطالعه حاضر، چنانچه از تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشخص است آرایه‌های افرا به دو گروه دارای کرک و فاقد آن تقسیم می‌گردند. کرک‌ها در افراها ساده و بدون انشعاب که از نظر اندازه به دو گروه کرک‌های کوتاه و بلند قابل مجزا شدن هستند. آرایه‌های دارای کرک‌های کوتاه شامل *A. monspessulanum* subsp. *cinerasens* و *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum* و دارای کرک‌های بلند شامل *A. negundo* و *A. monspessulanum* subsp. *ibericum* و *A. velutinum* بودند. سایر آرایه‌ها یا فاقد کرک در سطح اپیدرم تحتانی بودند و یا دارای کرک‌های بسیار پراکنده در نواحی خاصی همچون انتهای برگ، روی دم‌برگ و یا محل انشعاب رگبرگ‌ها (جدول ۲).

موم‌ها نیز در کنار سایر صفات ریزریختی جهت تفکیک گونه‌ها می‌توانند بسیار مفید واقع شوند (Shayanmehr et al., 2007, 2018). چنانچه مشاهده شد موم‌ها دارای تفاوت‌هایی در الگوی پراکنش بر سطح کوتیکول و در برخی موارد دارای نوع خاصی از ساختار کریستالی (مانند *A. velutinum* و *A. mazandaranicum* و *A. hyrcanum*) بودند. ساختارمندترین نوع موم‌های اپی کوتیکولی در *A. velutinum* مشاهده شد. به طوری که اطراف روزه‌ها ساختارهای روزت مانند و مدوری را تشکیل می‌دهند که در هیچ آرایه دیگری قابل مشاهده نیست. سطح تحتانی برگ در *A. platanoides* نیز به طور منحصربه‌فردی با یک لایه کاملاً صاف و یکدست از موم پوشیده شده است. ساختارهای جذاب موم بر سطح *A. monspessulanum* subsp. *cinerasens* و *A. mazandaranicum* مشاهده می‌شود که بر سطح سلول‌های اپیدرمی آرایه اول برجسته و در دومی فرورفته به نظر می‌رسد. *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum* و *A. monspessulanum* subsp. *ibericum* نیز ساختار کمابیش مشابهی از موم را بر سطح اپیدرم تحتانی برگ نشان دادند که با سایر آرایه‌ها تفاوت دارد. در مابقی آرایه‌ها نیز عموماً موم‌های یکدست و ناصاف مشاهده می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط

Karimi (2021) با استفاده از روش‌های خوشه‌بندی و رسته‌بندی ۵۲ صفت ریختی و ریزریختی برگ و میوه ۱۰ گونه افرا انجام شد نتیجه‌گیری شد که تفاوت و یا شباهت‌های بین گونه‌های افرا به محیط اکولوژیکی و شرایط رویشگاهی آن‌ها بستگی دارد. اما بر اساس نتایج تحقیق حاضر و مقایسه تصاویر موم‌های اپی کوتیکولی ارائه شده در تحقیق Karimi شباهت‌های بسیار زیاد ساختارها و کریستال‌های موم مشابهی را میان آرایه‌های یکسان با این تحقیق نشان می‌دهد. این موضوع، به دلیل اینکه نمونه‌های برگ افرا از رویشگاه‌های متفاوتی تهیه شده است، به نوعی ارزش ژنتیکی صفات موم در جنس افرا را اثبات می‌نماید. چراکه اگر تشکیل ساختارهای موم تنها وابسته به نوع رویشگاه می‌بود، نمی‌بایست شکل‌های مشابهی از آنها در آرایه‌های یکسان مشاهده می‌گردید.

از صفات کیفی مورد مطالعه در تحقیق حاضر، تیپ سلول‌های همراه روزه می‌تواند گونه‌ها را به دو دسته دارای تیپ آنموسیتیک و پاراسیتیک تقسیم نماید. فقط در *A. mazandaranicum* به طور انحصاری تیپ روزه پاراسیتیک مشاهده شد (شکل ۴ A) و در سایر آرایه‌ها تیپ آنموسیتیک ثبت شد. تیپ آنموسیتیک تیپ رایج روزه است که تاکنون در اغلب جنس‌های درختی جنگل‌های هیرکانی به ثبت رسیده است نظیر جنس راش (Saeedi et al., 2015)، ممرز توس (Chapolagh Paridari et al., 2012)، شاه‌بلوط (Kordalivand and Sattarian, 2015)، و... نتایج تحقیق Chapolagh Paridari et al. (2011) و همکاران (2012) بر روی سه گونه رایج از جنس *Carpinus* در جنگل‌های هیرکانی نشان داد که نمی‌توان تیپ روزه خاص و منحصر به یک گونه از این جنس را یافت نمود و تقریباً اکثر تیپ‌ها در هر سه گونه مشاهده می‌شود.

نتایج تحقیق Kordalivand & Sattarian (2015) با استفاده از صفات ریزریختی برگ به خصوص تیپ روزه نیز نشان داد که با اینکه در مورد حضور گونه‌هایی غیر از *Betula pendula* در جنگل‌های ایران بین محققین علم رده‌بندی مختلف اختلاف نظر وجود دارد، اما تنوعی در بین پایه‌های گونه توس در سه رویشگاه اصلی آن مشاهده نمی‌شود.

الگوی دیواره سلولی اپیدرم، نیز که در اکثر مطالعات سیستماتیک-ریزریختی استفاده می‌شود و در زمره صفاتی محسوب می‌گردد که بیانگر تنوع ژنتیکی است (Santos et al., 2020)، ویژگی دیگری بود که به سه نوع مختلف در آرایه‌ها مشاهده شد: دیواره کاملاً موج و پازل مانند که تنها در *A. platanoides* دیده شد، دیواره نسبتاً موج فقط در *A. negundo* و دیواره سلولی صاف و مستقیم که شکل رایج در سایر آرایه‌ها بوده است.

در کل تمایز صفات اپیدرم میان آرایه‌های جنس افرای مورد مطالعه نشان داد که سطح زیرین برگ دارای مشخصه‌های اپیدرمی مفیدی است که می‌تواند نقش مهمی در طبقه‌بندی، توصیف و تعیین حدود آرایه‌ها ایفا نموده و بنابراین به‌عنوان ابزاری مفید در سیستماتیک گیاهی استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد، صفات ریزریختی برگ می‌تواند به حل مشکلات رده‌بندی جنس افرا کمک کند. اما ریخت‌شناسی و نوع گرده برای این جنس چنین قابلیت را ارائه نمی‌دهد. طبقه‌بندی موم‌های اپی کوتیکولی در برخی از آرایه‌ها مانند *A. A. mazandaranicum* *A. velotinum* و حتی برخی از زیرگونه‌های *A. monspessulanum* منحصر به فرد بوده است. الگوی دیواره سلول‌های اپیدرم، به سه نوع مختلف در آرایه‌ها دیده شد. منحصر به فردترین آنها در *A. platanoides* دیده شد که دیواره کاملاً موج و پازل مانند داشت. دیواره نسبتاً موج فقط در *A. negundo* و دیواره سلولی صاف و مستقیم در سایر آرایه‌ها مشاهده شد. تیپ سلول‌های همراه روزه در همه آرایه‌ها آنموسیتیک بود در حالی که در *A. mazandaranicum* تیپ پاراسیتیک غالب بوده است. از نظر کرک‌ها در آرایه‌های واجد کرک، ساده و بدون انشعاب بودند که آرایه‌ها از نظر اندازه به دو گروه دارای کرک‌های کوتاه و بلند قابل مجزا شدن هستند. صفات ریخت‌شناسی گرده، هیچ گونه تمایزی را در بین آرایه‌ها نشان نداد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از جناب آقای دکتر حبیب زارع عضو هیئت‌علمی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و کشاورزی نوشهر به‌خاطر در اختیار قراردادن تعدادی نمونه هرباریومی تشکر و قدردانی به عمل آورند.

چنانچه ملاحظه می‌گردد بیشترین تعداد روزه در واحد سطح و شاخص روزه مربوط به دو گونه وارداتی افرا یعنی *A. palmatum* و *A. negundo* است و کمترین آن مربوط به آرایه‌های *A. monspessulanum* *A. mazandaranicum* *A. velutinum* var. *velutinum* subsp. *turcomanicum* *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens* است. با توجه به این دو مشخصه می‌توان اذعان نمود آرایه‌های بومی نام برده مقاومت به خشکی بالاتری نسبت به سایرین دارند. قابل ذکر است در این آرایه‌ها، بسیاری از روزه‌ها در زیر لایه‌های موم اپی کوتیکولی پوشیده و مدفون می‌شوند و در اطراف سایر روزه‌ها نیز کرک‌ها و کریستال‌های موم جهت کاهش میزان تبخیر و تعرق حضور می‌یابد (شکل‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰). استفاده از صفات ظاهری و ریزریختی گرده نیز تاکنون در طبقه‌بندی و حل مشکلات رده‌بندی بسیاری از گونه‌های گیاهی در سراسر جهان مؤثر واقع شده است (Garg et al., 2015; Hao et al., 2023; Shayanmehr et al., 2023). اما برای جنس افرا، مطالعه گرده، ارزش رده‌بندی چندانی برای تمایز بین آرایه‌ها نشان ندهد. نتایج تحقیق حاضر برای گرده جنس افرا نیز نشان داد که نه شکل گرده (Isopolar) کشیده یا Prolate تا کروی یا (spheroidal)، نه تزئینات اگزینی (شیاردار یا Striate)، نه فرم شکاف‌های گرده (Colpi) و نه حتی تعداد شکاف‌های گرده (سه شکاف-حفره‌ای Tricolporate) هیچ گونه تمایزی که در انحصار آرایه خاصی باشد ارائه نمی‌نماید و همه آرایه‌ها می‌توانند به‌نوعی این صفات را در گرده‌های خود ارائه نمایند. باتوجه به نتایج بدست آمده می‌بایست اذعان داشت که از نظر صفات ظاهری گرده، تمایزی میان اعضای این جنس در ایران مشاهده نمی‌شود و صفات ریختی گرده نسبتاً در تمامی اعضای این جنس تغییرات سیستماتیک بارزی را ارائه نمی‌دهد؛ چرا که تمامی صفات ریختی گرده تقریباً در همه آرایه‌ها به چشم می‌خورد. نتایج مشابهی توسط Siahkolaee و همکاران (2017) به دست آمده است.

منابع

- Akbarinia, M., Zarafshar, M., Sattarian, A., Babaie Sustani, F., Ghanbari, E., & Chaplagh Paridari, I. (2011). Morphological variations in stomata, epidermal cells and trichome of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Caspian ecosystem. *Taxonomy and Biosystematics*, 3(7), 23-32. DOI: 20.1001.1.20088906.1390.3.7.4.0
- Amini, T., Zare, H., & Asadi, M. (2008). *Acer mazandaranicum* (Aceraceae), a new species from northern Iran. *Iranian Journal of Botany*, 14, 81-86.
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., & Wilhelmi, H. (1998). Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical journal of the Linnean society*, 126(3), 237-260. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x>
- Bassi, D., & Monet, R. (2008). Botany and taxonomy. In *The peach: botany, production and uses* (pp. 1-36). Wallingford UK: Cabi.
- Chang, C. S., & Kim, H. (2003). Analysis of morphological variation of the *Acer tschonoskii* complex in eastern Asia: implications of inflorescence size and number of flowers within sect. *Macrantha*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143(1), 29-42. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00191.x>
- Chaplagh Paridari, I., Jalali, S. G., Sonboli, A., & Zarafshar, M. (2012). Leaf, Stomata and Trichome morphology of the species in *Carinus* Genus. *Taxonomy and Biosystematics*, 4(10), 11-26. DOI: 20.1001.1.20088906.1391.4.10.3.2
- Davis, J.C. (1965). Flora of Turkey (Aceraceae): Edinburgh at the University. No: 2. 655n.
- Gao, J., Liao, P. C., Huang, B. H., Yu, T., Zhang, Y. Y., & Li, J. O. (2020). Historical biogeography of *Acer L.* (Sapindaceae): genetic evidence for Out-of-Asia hypothesis with multiple dispersals to North America and Europe. *Scientific reports*, 10(1), 21178.
- Garg, A., Singh, P., & Ouamar, M. F. (2023). Pollen morphology of family Thymelaeaceae Juss. in India and its taxonomic implications. *Flora*, 303, 152291. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2023.152291>

- Ghahreman, A. (1992). Iranian Chormophytes (Plant Svstematic). Centre of University Press. Vol. 2. 842p.
- Hakim, L., & Miyakawa, H. (2013). Plant trees species for restoration program in Ranupani, Bromo Tengger Semeru National Park Indonesia. *Biodiversity Journal*, 4(3), 387-394.
- Hao, L., Fan, Y., da Silva, J. A. T., & Yu, X. (2023). Pollen morphology of 16 species of *Fritillaria* L. and its taxonomic implications. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 17(2), 123-137.
- Karimi, Z. (2021). Leaf anatomical and morphological characters of some species of *Acer*. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(3), 616-631. DOI: 20.1001.1.23832592.1400.34.3.4.5
- Kim, H. T., & Kim, J. S. (2023). The complete chloroplast genome sequence of the Korean maple tree (*Acer pseudosieboldianum* (Pax) Kom.). *Mitochondrial DNA Part B*, 8(6), 691-694. <https://doi.org/10.1080/23802359.2023.2224623>
- Kordalivand, A., & Sattarian, A. (2015). Different types of leaf stomata Birch (*Betula* spp.) In the northern forests of Iran. *Journal of Wood and Forest Science and Technology*, 22(2), 55-74. DOI: 20.1001.1.23222077.1394.22.2.4.8
- Metcalf, C. R., & Chalk, L. (1950). Anatomy of the Dicotyledons, vol I. Clarendon Press, Oxford.
- Murrav, E., & Rechinger, K.H. (1969). Flora Iranica –Aceraceae. Vol 30 (4). Akademische Druck - u. Verlaesanstalt.
- Novotná, T., Jahn, P., Šamonilová, F., Kabešová, M., Pospišilová, S., & Maršálek, P. (2023). Hypoglycin A in *Acer* genus plants. *Toxicon*, 234, 107271. DOI: 10.1016/i.toxicon.2023.107271
- Oguchi, R., Onoda, Y., Terashima, I., & Tholen, D. (2018). Leaf anatomy and function. *The leaf: a platform for performing photosynthesis*, 97-139.
- Payne, W. W. (1979). Stomatal patterns in embryophytes: their evolution, ontogeny and interpretation. *Taxon*, 28(1-3), 117-132.
- Rasmussen, H. (1981). Terminology and classification of stomata and stomatal development—a critical survey. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 83(3), 199-212.
- Sābitī, H. A. (1976). Forests, trees, and shrubs of Iran. – Ministry of Agriculture and Natural Resources.
- Saeedi, Z. D., Azadfar and Kh. Saghebtalebi (2015). Leaf stomata characteristics Diversity of Oriental beech in Hyrcanian forests. *Journal of Wood and Forest Science and Technology*, 22(1), 167-184. DOI: 20.1001.1.23222077.1394.22.1.11.3
- Santos, J. V. D. C., Oliveira, M. D. F. V. D., Santos Filho, F. S., Silva, I. N. N. D. S., & Araújo, J. S. (2020). The taxonomic value of leaf anatomy for species *Byrsonima*: a difficult genus of Malpighiaceae Juss. *Acta Botanica Brasilica*, 34, 570-579.
- Shayanmehr, F., Jalali, G. A., Ghanati, F., & Kartoolineiad, D. (2009). The study of Conical and Ball-shaped pines, two probable mutant forms of *Pinus eldarica*: comparison of needle anatomy structure. *Iranian Journal of Forest*, 1(2), 151-161.
- Shayanmehr, F., Jalali, S. G., Colagar, A. H., Zare, H., Kartoolineiad, D., & Yousefzadeh, H. (2018). Leaf cuticle and wax ultrastructure of genus *Alnus* Mill. in Hyrcanian forests of Iran. *International Journal of Environmental Studies*, 75(6), 877-890. <https://doi.org/10.1080/00207233.2018.1464278>
- Shayanmehr, F., Jalali, S. G., Ghanati, F., & Kartoolineiad, D. (2008). Discrimination of *Pinus eldarica* MEDW. and its two new species by epicuticular wax, lignin content, electrophoretic isozyme and activity of peroxidase. *Feddes Repertorium*, 119(7-8), 644-654. <https://doi.org/10.1002/fedr.200811188>
- Shayanmehr, F., Jalali, S. G., Ghanati, F., Kartoolineiad, D., & Apple, M. (2009). Two new morphotypes of *Pinus eldarica*: Discrimination by macromorphological and anatomical traits. *Dendrobiolog*, 61, 27-36.
- Shayanmehr, F., Jalali, S., Hosseinzadeh Colagar, A., Yousefzadeh, H., & Zare, H. (2015). Pollen morphology of the genus *Alnus* mill. In Hyrcanian forests, north of Iran. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13(3), 833-847.
- Shayanmehr, F., Kartoolineiad, D., Jalali, S. G., & Ghanati, F. (2007). Comparison of epicuticular wax on needles and stems of *Pinus eldarica* with its two naturally generated forms. *Rostaniha*, 8(2), 150-159.
- Siahkolae, S. N., Sheidai, M., Assadi, M., & Noormohammadi, Z. (2017). Pollen morphological diversity in the genus *Acer* L. (Sapindaceae) in Iran. *Acta Biologica Szegediensis*, 61(1), 95-104.
- Soheili, F., Panahi, P., Hatamnia, A. A., Woodward, S., Abdul-Hamid, H., & Naji, H. R. (2023). Leaf microstructure and adaptation relationships in ten woody species from the semi-arid forests. *Iranian Journal of Forest*, 15(1), 53-72. DOI:10.22034/IJF.2022.330879.1853
- Stace, C. A. (1980). Plant Taxonomy and Biosystematics Edward Arnold (Publishers) Limited. *London WC1B 3DQ*.
- Suh, Y., Heo, K., & Park, C. W. (2000). Phylogenetic relationships of maples (*Acer* L.; Aceraceae) implied by nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Plant Research*, 113, 193-202.
- The Plant List. (2010). Version 1. Published on the Internet: <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- van Gelderen, D. M., De Jong, P. C., & Oterdoom, H. J. (1994). *Maples of the world*. Timber Press Inc., Portland, Oregon, USA.
- Wang, Z. E., Cao, R., Ding, H., Huang, Y. T., Song, Z. H., Ding, S. T., & Wu, J. Y. (2023). Fossil samaras of *Acer* L. (Sapindaceae) from the Upper Pliocene of western Yunnan, southwestern China. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*, 1-16. DOI:10.1007/s12549-023-00575-1

“Research Paper”

Investigation of leaf and pollen micromorphology of maples (*Acer L.*) of Iran

Davoud Kartoolinejad¹, Fatemeh Shayanmehr² and Alireza Moshki³

1- Assistant Professor of Aridland Forestry, Faculty of Desert Studies, Semnan University, Semnan, Iran
(Corresponding author: Kartooli58@gmail.com)

2- PhD of Forestry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor of Aridland Forestry, Faculty of Desert Studies, Semnan University, Semnan, Iran
Received: 08 October, 2023 Accepted: 00 October, 2024

Extended Abstract

Introduction and Objective: The genus *Acer L.* (maples) from the Aceraceae are mostly deciduous trees, almost all of which are distributed in the temperate regions of the Northern Hemisphere. This genus has 148 to 150 species around the world, and the presence of 8 to 10 native species of this genus has been mentioned in different floras of Iran. Some species of maples in Hyrcanian forests have great commercial value and the height of these trees reaches 40 to 45 meters. Maples are of the major vegetation elements in most forest ecosystems of Iran. Hyrcanian forests in north of Iran contain the highest diversity of this genus. Despite the molecular and morphological studies on the taxa of the genus in the world, no comprehensive studies have been conducted on its micro-morphological characteristics. Therefore, the present research describes the taxonomic value of the anatomical features of the leaf epidermis and pollen morphology of the members of the genus in Iran.

Material and Methods: In current study, 11 maple taxa available in Iran (9 native and 2 introduced taxa), mainly from Hyrcanian and Zagros ecosystems, were collected and analyzed. The investigated taxa were: *A. hyrcanum*, *A. velutinum*, *A. platanoides*, *A. mazandaranicum*, *A. campestre*, *A. cappadocicum*, *A. negundo*, *A. palmatum*, *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens*, *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum*, and *A. monspessulanum* subsp. *ibericum*. The leaf samples of each individual were prepared from the branches grown in the sun and were dried such herbarium sample method to prevent mold. Dried leaf samples were placed in boiling water for 3 minutes to prepare dissections. Then, using a surgical blade, thin slices were prepared from the dorsal and ventral epidermis from the middle of the leaf and in the vicinity of the mid rib. In order to remove the color of chlorophyll and make the samples transparent, they were placed in a sodium hypochlorite solution for 5 minutes. After washing with distilled water, they were photographed and studied under a light microscope. For studying using an electron microscope, the dorsal and ventral epidermis and the pollen samples of the taxa were stabled on aluminum stubs. Then, a very thin gold layer was sprinkled on the surface of all pollen and leaf samples using a gold sputter coater and then photographed using a Philips Scanning Electron Microscope. The intensity of the voltage was 20 kV and the magnification of the images was from 2500 to 5100 x. Epicuticular waxes, trichomes, epidermal cell wall shape, stomatal type, pollen type, pollen morphological characteristics, stomatal density and index were classified and studied from the prepared microphotographs.

Results: Morphology of epicuticular wax in taxa such as *A. velutinum*, *A. mazandaranicum*, *A. hyrcanum*, *A. platanoides* and even some subspecies of *A. monspessulanum* was absolutely unique. The most structured type of epicuticular waxes was observed in *A. velutinum*. So that circular rosette-like structures are formed around some stomata, which could not be seen in any other taxa. The dorsal surface of the leaf in *A. platanoides* was also uniquely covered with a completely smooth and uniform layer of wax. Certain wax structures on the surface of *A. monspessulanum* subsp. *cinerasens* and *A. mazandaranicum* is observed, which makes the surface of the epidermal cells appear prominent in the prior and indented in the latter taxa. The highest stomatal index and the number of stomata per unit area are related to two non-native species, namely *A. palmatum* and *A. negundo*, and the lowest are related to *A. mazandaranicum*, *A. monspessulanum* subsp. *turcomanicum*, *A. velutinum* var. *velutinum*, and *A. monspessulanum* subsp. *cinerascens*. Many of the stomata are covered and buried under the thick layers of epicuticular wax, and there are trichomes and wax crystalloids around other stomata to reduce the rate of evaporation and transpiration. Therefore, it can be acknowledged that the mentioned native taxa have higher drought resistance than others. The pattern of the epidermal cell wall of the taxa was classified into three different types; The most distinctive of them was seen in *A. platanoides*, having a completely wavy and puzzle-like wall. Relatively wavy wall was seen only in epidermis cell of *A. negundo*. The other taxa showed the smooth and straight cell wall. The arrange of subsidiary cells of the stomata was anomocytic in all taxa, while the paracytic type was completely distinctive and dominant in *A. mazandaranicum*. Trichomes in all the owning taxa were simple and branchless, being divided into two groups of short and long in terms of size. None of the morphological characteristics of pollen such as pollen shape (Isopolar prolate to spheroidal), exine ornamentation (striate), the form of pollen colpi and even the number of pollen pores (Tricolporate) revealed a specific differentiation exclusive to a certain taxon.

Conclusion: The results of current research revealed that the micro-morphological traits of leaves can help remove the taxonomical obstacles of the genus *Acer*; while the pollen type and morphology does not provide such a capability for the genus. In general, the differentiation of epidermal characteristics among the studied maple taxa showed that the leaf dorsal has useful micromorphological characteristics, especially in terms of epicuticular waxes, which can play an important role in classifying, describing and determining the boundaries of the taxa and to be used as the useful tool in plant biosystematics.

Keywords: Maple Tree, Epicuticular Wax, Stomatal Index, Trichomes, SEM

ضمائم (اصطلاحات تخصصی):

موم‌های اپی کوتیکولی: سطح کوتیکول برگ اکثر گیاهان توسط لایه‌های غیر قابل نفوذی از ترکیبات لیپیدی پیچیده پوشیده شده است که در بسیار موارد به شکل ساختارها و تشکیلات مشخصی ظهور پیدا می‌کنند که شکل آنها می‌تواند به شناسایی برخی از گونه‌ها کمک نماید.

ساختارهای کریستالی روزت (Roset): نوعی از تشکیلات موم است که به شکل یک گل رز در نقاط مختلف کوتیکول ظاهر می‌شود.

تیپ روزنه Anomocytic: در این تیپ، سلول‌های اپیدرم به صورت نامنظم اطراف دو سلول محافظ روزنه آرایش می‌یابند.

تیپ روزنه Paracytic: عموماً محور طولی سلول‌های لوبیایی محافظ روزنه توسط دو (یا بیشتر) سلول اپیدرمی (یک سلول همراه در هر طرف سلول محافظ روزنه) احاطه می‌شود.

تزیینات اگزینی: سطح خارج کرده گیاهان را Exine گویند که به واسطه داشتن شکل‌ها و تزیینات خاصی قابل دسته بندی و طبقه بندی است و به شناسایی انواع گرده‌ها کمک می‌کند. تزیینات اگزینی شیاردار تحت عنوان Striate و در صورتی که دارای چین خوردگی‌های ظریف و غالباً موازی نیز باشد Rugulose نامیده می‌شود.

Isopolar: شکلی از انواع گرده در گیاهان است که دانه گرده دارای دو قطب برابر است و صفحه استوایی گرده، آن را به دو قسمت مساوی تقسیم می‌کند. Prolate یا کشیده: دانه‌های گرده که محور قطبی آنها بزرگ‌تر از قطر استوایی است. نسبت این دو قطر تقریباً ۱ به ۰٫۷۵-۰٫۵ است یعنی قطر استوایی ۰٫۵٪ تا ۰٫۷۵٪ محور قطبی است.

Spheroidal یا کروی: گرده‌هایی که شکل آنها کروی یا بسیار نزدیک به کروی و بدون داشتن قطبین مشخص هستند. نسبت تقارن جهت قطبی و استوایی آنها نزدیک به عدد ۱ است.

Colpi یا شکاف: سطح روزنه جهت انجام عمل لقاح دارای سوراخ‌هایی است که سلول‌های گرده از آن خارج می‌گردند. نوع Colpi زمانی است که این روزنها کشیده و شیارمانند باشند نه مدور.

Tricolporate یا سه شکاف-حفره‌ای: نوعی از طبقه بندی شکاف گرده است که در آن دانه‌های گرده دارای سه روزنه یا شکاف با فاصله مساوی و موازی با محور قطبی دانه باشد. یعنی شکاف‌ها از هر قطب با زاویه یکسان از یکدیگر جدا شده و تا نزدیکی قطب مقابل امتداد داشته باشند.

پایگاه

پایگاه