بررسی بافت شناختی و سیتوشیمیایی مراحل مختلف رویانزایی گیاه قیچ

الهام محجل کاظمی*، مینا کاظمیان، فاطمه مجیدزاده و محبوبه علی اصغرپور

ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۶

چکیده

شکل‌گیری دانه یکی از مراحل مهم تولید مثل در گیاهان دانه‌دار به شمار می‌رود. در این پژوهش بررسی تکوین تخمک، اندوسپرم و رویان زایی گیاه قیچ (*Zygophyllum fabago*) با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی مدنظر قرار گرفته است. نمونه‌ها از مراحل مختلف نموی جمع‌آوری و تثبیت گردیدند، سپس نمونه‌های تثبیت‌شده با روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف هیستولوژیکی و سیتوشیمیایی مطالعه شدند. مشاهدات اولیه نشان داد که تخمک از نوع واژگون و دو پوسته‌ای است. پوشش خارجی تخمک در طی تکوین، به تزئینات پوسته دانه تبدیل می‌گردد؛ بنابراین دانه از نوع تستایی است. در دانه قیچ آندوسپرم ابتدا از نوع هسته‌ای می‌باشد؛ این امر ارتباط رویان با بافت اندوسپرم را سهولت می‌بخشد. با ادامه نمو دانه روند سلولی شدن آندوسپرم دیده می‌شود. آندوسپرم سلولی شده در این گیاه به‌تدریج به سمت فضاهای مرکزی کیسه جنینی توسعه پیدا می‌کند و کل فضای کیسه جنینی را اشغال می‌نماید. درواقع دانه از نوع اندوسپرم دار بوده و بافت اندوسپرم تا مرحله رویان بالغ باقی مانده و تحلیل نمی‌رود. همچنین مراحل رویان کروی، قلبی، اژدری و رویان بالغ به همراه بخش‌های مریستم انتهای ریشه، هیپوکوتیل، مریستم انتهای ساقه و لپه‌ها مشخص مشاهده شد. نتایج سیتوشیمیایی نشان داد که با رشد بیشتر دانه، تشکیل دانه‌های انبوه نشاسته و به دنبال آن ضخیم‌شدگی دیواره‌ها اتفاق می‌افتد که موجب کاهش شدید حفره‌های سلولی و نیز سخت شدن این بافت می‌گردد. از طرفی مشخص شد که فراوانی مواد ذخیره‌ای لیپیدی در بافت اندوسپرم نسبت به مواد پروتئینی بیشتر است. بر خلاف اندوسپرم، در بافت رویان بالغ مواد کربوهیدراتی با رنگ آمیزی PAS تشخیص داده نشد.

واژه های کلیدی: اندوسپرم هسته‌ای، دو پوسته‌ای، رویان، روش‌های بافت‌شناسی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۲۸۰۸۹۵۵ ، پست الکترونیکی: e.mohajelkazemi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

تیره زیگوفیلاسه به ۵ زیرتیره تقسیم می‌شود و شامل ۲۷ جنس و ۲۸۵ گونه است که معمولاً گیاهان این تیره علفی و یا به صورت درختچه و درختی هستند (۲۹). یکی از بزرگترین زیر خانواده‌های این تیره، Zygophilloideae است که جنس‌های *Zygophyllum* ، *Roeper* ، *Melocarpum*، *Fagonia*، *Augea* و *Tetraena* را شامل می شود (۲)، هرچند همچنان مطالعات مولکولی در زمینه ی ارتباط فیلوژنتیکی و رده‌بندی این تیره وجود دارد (۱). جنس *Zygophyllum* متعلق به این تیره می‌باشد که دارای دو گونه *Z. album* , *Z. fabago* است و به‌طور گسترده‌ای در مناطق مدیترانه‌ای رویش دارد. تعداد برچه‌های مادگی بین ۲ تا ۱۲ عدد در این تیره متغیر بوده و هر خانه‌ی تخمدان محتوی تخمک‌های غالباً واژگون با میوه کپسول است. *Z. fabago* (گیاه قیچ) گیاهی پایا و چندساله، علفی یا چوبی، به ارتفاع ۴۰ تا ۹۰ سانتی‌متر، تخمدان دارای ۴ تا ۵ خانه، محتوی دو یا چند تخمک و شامل دانه‌های مسطح و ناصاف می‌باشد (۴).

فرآیند تشکیل دانه در گیاهان به عنوان یک مرحله مهم محسوب می‌گردد زیرا این فرآیند برای ایجاد گیاه جوان به طریق تولیدمثل جنسی و ادامه حیات گونه الزامی می‌باشد

(۶). دانه از تخمک لقاح یافته حاصل می‌شود و از سه بخش پوسته‌ی دانه، اندوسپرم و رویان تشکیل شده است (۲۵). پوسته دانه پوشش خارجی احاطه‌کننده‌ی رویان در گیاهان به شمار می‌آید که از پوشش یا پوشش‌های تخمک حاصل می‌گردد (۸). در اغلب دانه‌ها بافت‌های ساختمانی پوشش تخمک در طی نمو دانه تخریب شده و پوسته دانه صرفاً از بقایای پوشش‌های تخمک حاصل می‌شود (۱۹) و ممکن است این سلول‌ها با تغییرات مورفولوژیکی به تزئینات متفاوتی دست یابند (۹). در تکوین مادگی در ابتدا تخمک‌ها به شکل برجستگی کوچک در جدار تخمدان پدیدار می‌شوند. در رایج‌ترین نوع نمو تخمک، پس از شکل‌گیری تخمک‌ها به دنبال رشد سریع یکی از یاخته‌های خورش، یاخته مادر مگاسپور تمایز می‌یابد که با تقسیم میوزی موجب تشکیل تتراد می‌شود . یک سلول، به تقسیمات میتوزی ادامه می‌دهد و کیسه رویانی را می‌سازد که پس از تندش دانه گرده، لوله گرده روی کلاله نفوذ کرده و یکی از آنتروزوئیدها با تخمزا ترکیب شده و سلول تخم را تشکیل می‌دهند (۸). درنهایت با ادامه تقسیمات رویان شانزده سلولی و کروی شکل می‌گیرد. مرحله‌ی رویان کروی با تشکیل لپه‌ها در دو طرف مریستم رأسی ساقه، رویان قلبی را ایجاد کرده و پس از تمایزات سلولی رویان اژدری و در انتها رویان لپه‌ای پدیدار می‌گردد (۸).

شاخص‌های مربوط به دانه مانند مورفولوژی، رنگ و اندازه دانه، ساختار و ترکیبات پوسته دانه، شکل رویان، نوع ذخایر دانه و وجود یا فقدان اندوسپرم دارای ارزش تاکسونومیکی به ویژه در سطح جنس می‌باشند (۱۰). این شاخص‌ها به خصوص با کاهش ویژگی‌های رویشی و کاهش گل که تعیین روابط فیلوژنتیکی را مشکل می‌نماید، موردتوجه قرار می‌گیرند (۱۳). در حال حاضر از الگوهای تکوینی دانه جهت اهداف مختلفی استفاده می‌شود: حل مشکلات رده‌بندی، ایجاد رابطه خویشاوندی تکاملی و کاربرد آن به عنوان مارکرهای ژنتیکی جهت تعیین ژنوتیپ (۲۸).

اندوسپرم گیاهان گل‌دار درنتیجه‌ی لقاح مضاعف و به دنبال الحاق هسته‌های قطبی سلول مرکزی کیسه رویانی با اسپرم حاصل شده است (۱۶). به‌طورمعمول سلول‌های اندوسپرمی تریپلوئید و یا پلی پلوئید می‌باشند (۱۴). ساختار کیسه جنینی و فرایند لقاح مضاعف در تعیین درجه پلوئیدی اندوسپرم نقش دارند (۲۵) عموماً بر اساس روند تکوین، اندوسپرم به سه نوع تقسیم می‌شود: اندوسپرم هسته‌ای، اندوسپرم سلولی و اندوسپرم هلوبیال. اندازه و ساختار اندوسپرم در دانه‌های بالغ تیره‌های مختلف گیاهی متفاوت است (۱۵).

با توجه به اهمیت بافت اندوسپرم به عنوان بافتی مغذی برای تغذیه رویان در گیاهان گلدار و نیز نحوه تقسیمات سلولی متفاوت این بافت، نحوه نمو و تغییراتی که در مراحل مختلف تکوینی آن اتفاق می‌افتند ضرورت مطالعه این بافت را تبیین می‌کنند. ناهمگنی در تیره زیگوفیلاسه زیاد بوده در نتیجه مطالعه هر یک از گونه ها از دیدگاه آناتومی می تواند بعدها در تفکیک جنس های این تیره کمک کند و این امر اهمیت مطالعه ی جنس های این تیره از لحاظ تاکسونومی را نشان می دهد. از آنجاییکه گیاه *Z. fabago* در نواحی شمال ایران، آذربایجان، خراسان و اطراف تهران می‌روید و گلدهی گیاه به مقدار فراوان در مدت زمان نسبتاً طولانی از سال (از اواخر بهار تا تقریباً اواخر تابستان) انجام می‌گیرد، همچنین هر تخمدان محتوی تعداد زیادی از دانه (حدود ۳۰ عدد) می‌باشد، در نتیجه موجب گردیده تا این گیاه به عنوان نمونه مطلوب در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گیرد. مطالعه تخمک، مراحل تکوینی اندوسپرم و رویان و همچنین تغییرات هیستولوژیکی و سیتولوژیکی آنها از اهداف این پژوهش به شمار می‌روند.

مواد و روشها

نمونه های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در مراحل مختلف نموی (مادگی غنچه‌های نشکفته تا دانه‌های بالغ)

جهت بررسی های بافت شناسی، سیتوشیمیایی و تکوینی از محوطه دانشگاه تبریز جمع آوری شدند.

تهیه نمونه های Whole mount : به منظور مطالعه مقدار فضای اشغال شده توسط جنین در دانه، ابتدا دانه ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۰٫۵ درصد ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد از زایل شدن رنگ آنها بلافاصله به داخل آب مقطر منتقل شدند، برای شفاف شدن ابتدا ۱۵ دقیقه در داخل الکل ۹۷ درصد قرار گرفته و سپس به داخل محلول الکل-گزیلول منتقل شدند و با لوپ مناسب مطالعه و عکس‌برداری گردیدند(۷).

مطالعه بافت شناسی: نمونه‌ها پس از تثبیت در فیکساتور (FAA) و فرمال کلسیم (جهت شناسایی ترکیبات فنولی و لیپیدها)، گذراندن مراحل آب‌گیری با درجات رو به افزایش الکل، شفاف سازی با گزیلول، قالب گیری در پارافین، برش گیری با میکروتوم و درنهایت نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و سافرانین-فست گرین برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شدند (۷).

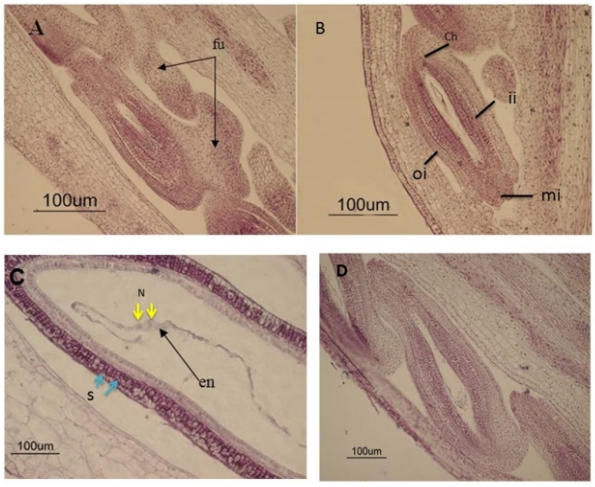
مطالعه سیتوشیمیایی: شناسایی پلی ساکارید ها به روش Periodic Acid Schiff (PAS) با رنگ آمیزی هماتوکسیلن، لایت گرین و تولوئیدین بلو ۲ درصد (۷) صورت گرفت.

جهت شناسایی لیپیدها با روش Gahan (1984) ، لامها پس از طی مراحل پارافین زدایی و آبدهی، با Sudan Black Bرنگ آمیزی شدند. شناسایی پروتئین ها با روش کوماسی برلیانت بلو Gahan (1984) انجام شد.

نتایج

تکوین تخمک و اندوسپرم: برش‌های تهیه شده از تخمدان‌های گل‌های گرده‌افشانی نشده (غنچه‌های ۳ میلی-متری)، ویژگی‌های تخمک واژگون گیاه *Zygophyllum fabago* را آشکار نمود. تخمک در این گیاه دارای دو پوشش است (شکل ۱-A, B) که در داخل سلول‌های ردیف دوم پوشش خارجی تخمک، با انجام تست سیتوشیمیایی PAS دانه‌های متعدد نشاسته مشخص گردید (شکل ۱-C).

پوشش داخلی تخمک از سه تا چهار ردیف سلول تشکیل شده است و در ایجاد میکروپیل نقش دارند. لایه سلول اپیدرم و یک تا دو ردیف سلول پارانشیمی در فاصله میان آنها قرار دارد که همگی دورتا دور کیسه رویانی را احاطه کرده اند. دانه‌های نشاسته در سلول‌های اپیدرم خارجی به مقدار فراوان وجود دارد که با فلش مشخص شده است (شکل ۱-C).



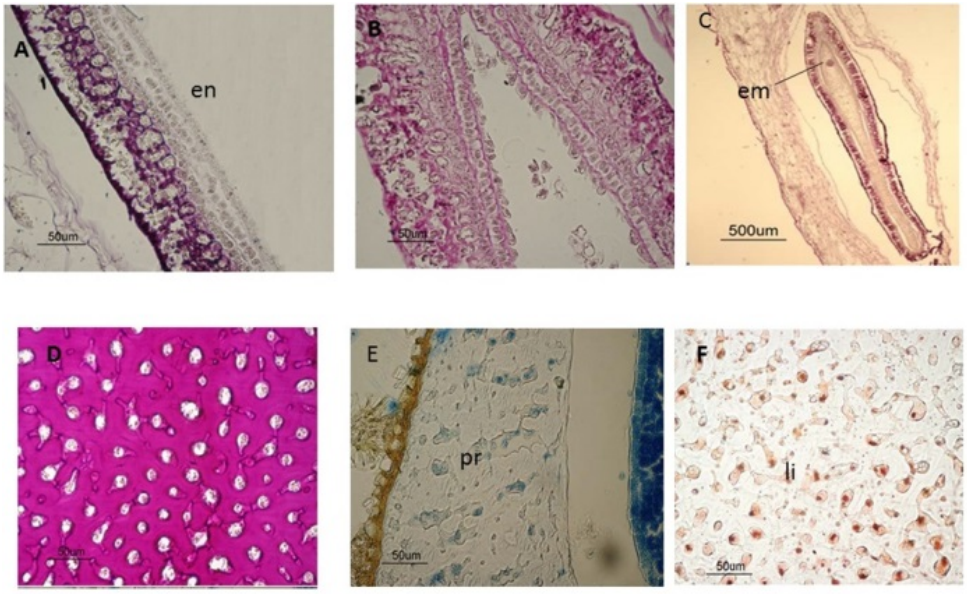
شکل ۱- برش طولی تخمک رنگ‌آمیزی شده با روش هماتوکسیلن. A, B: پوشش داخلی و خارجی تخمک. C: هسته‌های آزاد اندوسپرم که هسته‌ها با فلش زرد رنگ و دانه‌های نشاسته با فلش آبی مشخص شده است.D: شروع تقسیمات آندوسپرم قبل از نمو رویان. mi : میکروپیل، fu: فونیکول، ii: پوشش داخلی تخمک، oi: پوشش خارجی تخمک، ch: شالاز، en: اندوسپرم، N: هسته، s: نشانسته.

با رشد بیشتر تخمدان، اندازه تخمک‌ها نیز بزرگتر می‌شود. در طول این مراحل و تکوین اندوسپرم، به تدریج لایه های پوشش تخمک دچار تغییر می‌گردد. به گونه ای که کیسه جینی با سلول‌های اندوسپرم پر می‌شود (شکل ۲-B, C).

با توجه به نمونه های مطالعه شده، بعد از لقاح در فضای کیسه جنینی هسته های آزاد اندوسپرم قابل مشاهده می باشد. در این مرحله هیچ‌گونه دیواره‌ای در اطراف هسته‌ها دیده نمی‌شود و تنها مقداری سیتوپلاسم اطراف هسته‌های آزاد را فراگرفته است. بنابراین اندوسپرم تشکیل یافته در این گیاه در این مرحله از نوع اندوسپرم هسته‌ای می‌باشد. این هسته‌ها به شکل رشته‌ای در فضای کیسه جنینی قرار می‌گیرند که با فلش نمایش داده شده است (شکل۱-C). در واقع هرچند تقسیم هسته‌های آزاد اندوسپرم نسبت به سلول تخم سریعتر آغاز می‌شود اما به نظر می‌رسد فرآیند سیتوکینز به کندی ادامه پیدا می‌کند. سپس هسته ها به حاشیه کیسه جنینی نقل مکان می‌کنند و به صورت منظم در ردیفی قرار میگیرند (شکل ۲-A).

در مرحله بعد، در فضای کیسه جنینی دیواره‌های متعددی مابین هسته‌های آزاد تشکیل می‌گردد (شکل ۲-B) و اندوسپرم به تدریج از سمت قطب میکروپیلی، سلولی می-شود. در نهایت در مرحله رویان کروی، فضای کیسه جنینی به‌طور کامل با سلول‌های اندوسپرم پر می‌گردد (شکل ۲-C و شکل۳-A). نتایج نشان می‌دهد که بافت اندوسپرم تا مراحل پایانی تکوین دانه تحلیل نمی‌رود، در نتیجه دانه از نوع اندوسپرم دار معرفی می‌گردد (شکل ۳-C,D).

با ادامه رشد جنین تا رسیدن به مرحله لپه‌ای شکل، دانه-های نشاسته در سلول‌های اندوسپرم تجزیه می‌شوند (شکل ۳-E). زمانیکه دانه زرد رنگ است، ضخیم‌شدگی دیواره-های سلول‌های اندوسپرم به حداکثر میزان خود می‌رسد (شکل ۲-D). تست‌های سیتوشیمیایی نشان داد که ذخایر سلول در دانه بالغ، بیشتر لیپیدی است (شکل ۲-E و F).



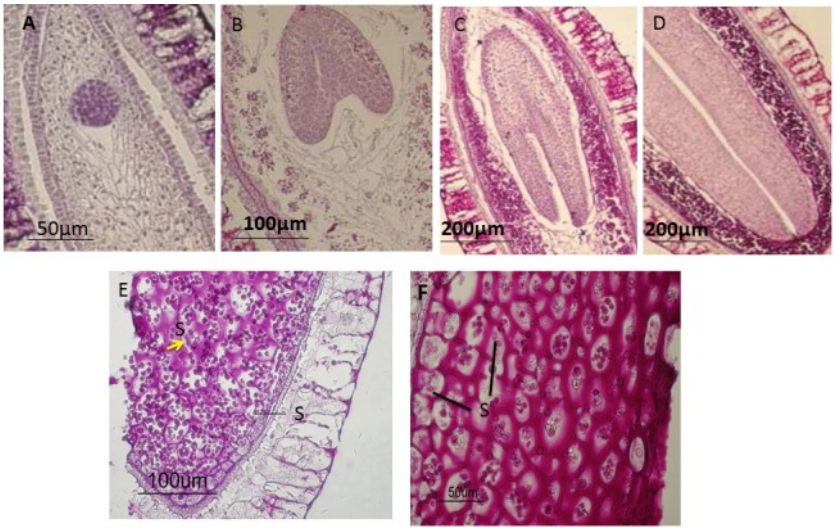
شکل ۲- تکوین اندوسپرم و مواد ذخیره‌ای آن در گیاه قیچ. A: مهاجرت هسته‌های آزاد به حاشیه کیسه جنینی. B: سلولی شدن اندوسپرم (en) در بخش میکروپیلی. C: نمای کلی تخمک حاوی رویان کروی (em) که کامل شدن مرحله سلولی اندوسپرم را نیز نشان می‌دهد. D: افزایش ضخیم شدگی دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم رنگ‌آمیزی شده با روش PAS. E,F: وجود ذرات پروتئینی (pr) و ذرات لیپیدی (li) در اندوسپرم.

در واقع به طور کلی مراحل تکوین آندوسپرم گیاه قیچ در چند مرحله مشخص به شرح زیر است:

۱- تقسیمات اولیه آندوسپرم و تشکیل آندوسپرم هسته‌ای، ۲- سلولی‌شدن آندوسپرم، ۳- ظهور دانه‌های نشاسته در بافت آندوسپرم، ۴- هیدرولیز دانه‌های نشاسته، ۵- ضخیم-شدگی غیریکنواخت دیواره‌های سلول‌های بافت آندوسپرم و درنتیجه ایجاد حفره‌های سلولی کوچک یا نامنظم در این بافت (شکل ۲-D)، ۴- ذخیره‌شدن مواد لیپیدی و پروتئینی در بافت آندوسپرم.

در آندوسپرم قیچ از آنجایی که در طول نمو رویان، کاهش دانه‌های نشاسته دیده نمی‌شود، به نظر می‌رسد در گیاه قیچ دانه‌های نشاسته در تغذیه رویانی نقش ندارند. از طرف دیگر با کاهش تدریجی آنها در اواخر مرحله رویانی، که همزمان با ضخیم شدن دیواره سلول‌های آندوسپرم می-باشد، به نظر می‌رسد که این دانه‌ها درجهت ضخیم‌شدن دیواره‌ها به مصرف می‌رسند(شکل ۳-F). شاهد برای این امر مشاهده دانه‌های نشاسته‌ای است که بخش‌هایی از آن به‌مصرف رسیده است. دیواره‌های ضخیم آندوسپرم، حتی پس از بلوغ نیزباقی می‌مانند(شکل ۳-D).

رویان زایی: از تغییرات دانه طی رویان زایی می‌توان به سلولی شدن اندوسپرم در مرحله رویان کروی اشاره کرد (شکل ۳-A). همچنین در مرحله رویان قلبی سلول‌های ردیف اول اندوسپرم نسبت به سایر سلول‌های بافت اندوسپرم کوچک‌ترند و این حالت تا پایان رشد دانه حفظ می‌گردد (شکل ۳-B). سپس با ادامه رشد رویان و رسیدن به مرحله اژدری شکل، دانه‌های نشاسته در سلول‌های اندوسپرم در حاشیه کیسه جنینی اندازه کوچک‌تری نسبت به دانه‌های نشاسته سلول‌های سایر بخش‌های بافت اندوسپرم دارند (شکل ۳-C). در ادامه نمو رویان، با تشکیل لپه‌های کشیده، محور جنینی کامل می‌شود. سلول-های درشت مرکزی بافت اندوسپرم توسط لپه‌های رشد یافته جنین جایگزین شده و بافت اندوسپرم به‌طور یکنواخت، به صورت ۵-۶ لایه فشرده اطراف جنین را احاطه می‌کنند. بنابراین رویان بخش اعظم فضای کیسه جنینی را اشغال می‌کند اما اندوسپرم به مقدار کمی تحلیل می‌رود و تا انتهای تکوین دانه باقی می‌ماند (شکل ۳-C,D).



شکل ۳- رویان گیاه قیچ. A: رویان کروی شکل. B: رویان قلبی شکل. C: رویان اژدری. D: رشد و گسترش لپه‌ها. E: آغاز ضخیم شدن دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم و وجود دانه‌های نشاسته بزرگتر (فلش زرد) در مرکز و دانه نشاسته کوچکتر در حاشیه بافت اندوسپرم (فلش مشکی). F: افزایش هیدرولیز دانه‌های نشاسته و ضخیم شدن دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم همراه با نمو رویان. S: دانه نشاسته.

تمامی سلول‌ها هنوز مملو از دانه‌های نشاسته می‌باشند و اندازه این دانه‌ها نیز نسبت به مرحله جنین اژدری شکل درشت‌تر شده است. رویان بالغ در این گیاه دارای هیپوکوتیل نسبتاً طویل بوده و لپه‌ها اندازه بزرگی دارند (شکل ۴-A).

شکل ۴ رویان بالغ را درگیاه قیچ نشان می دهد که تمام بخش‌های آن شامل مریستم انتهای ریشه، هیپوکوتیل، مریستم انتهای ساقه و لپه‌ها مشخص می باشد. مریستم راسی ریشه در قطب میکروپیلی رویان قرار گرفته و مریستم راسی ساقه درست در مقابل مریستم ریشه واقع شده است. مریستم راسی ریشه در این گیاه مریستمی فعال می‌باشد که چندین لایه سلول کلاهک ریشه تولید کرده است. این سلول‌ها در نتیجه تقسیمات مماسی مریستم ریشه حاصل شده اند. سلول‌های کلاهک در اندازه کوچک و بسیار منظم در زیر مریستم راسی ریشه دیده می‌شوند (شکل ۴-B). همچنین سلول‌های پروکامبیومی در بخش محوری میانی قابل مشاهده می‌باشند. این سلول‌ها درست از محل مریستم راسی ریشه شروع شده و تا انتهای لپه‌ها امتداد می‌یابند. مریستم راسی ساقه در این گیاه گنبدی شکل، فاقد ساختار لایه لایه (تونیکا) و منطقه بندی شده است. مریستم انتهایی ساقه در این گیاه فعالیت نکرده زیرا آغازه‌های برگی مشاهده نمی‌شوند (شکل ۴-c). همچنین سطوح خارجی پروتودرم را در تمام قسمت‌های رویان، لایه کوتیکول پوشانده است که بعد از رنگ آمیزی با معرف سودان سیاه قابل تشخیص است (شکل ۴-E). به طور کلی در هیپوکوتیل و لپه ها سه دسته سلول قابل تشخیص است که عبارتند از:

۱- سلول‌های پروتودرمی که این سلول‌ها اندازه کوچک داشته، در یک ردیف قرار گرفته اند.

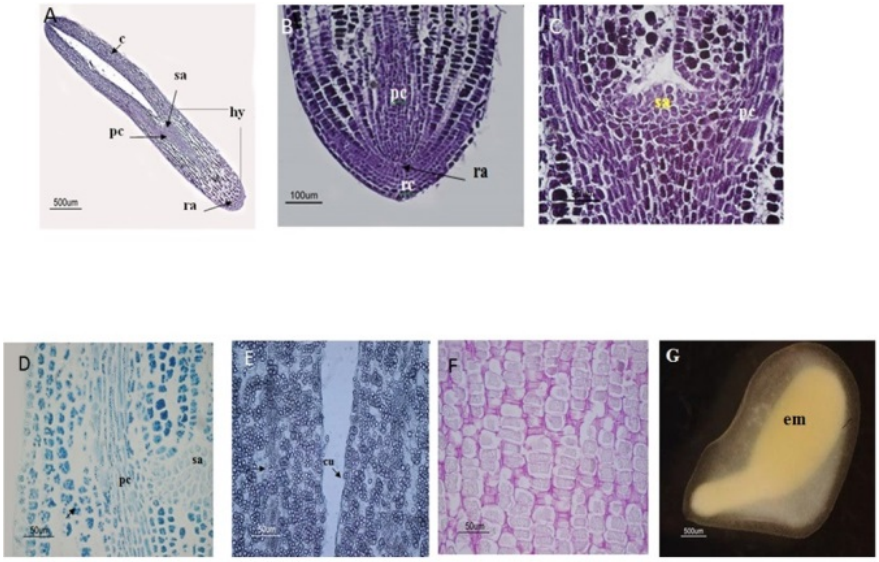
۲- سلول‌های پارانشیمی که در زیر سلول‌های پروتودرمی قرار گرفته، اندازه درشتری نسبت به سلول‌های پروتودرمی داشته و بیشترین ذخایر را دارا می باشند.

۳- دسته سوم سلول‌های پروکامبیومی می باشند که سلول-هایی کشیده و باریک می باشند. مجموعه سلول‌های پروکامبیومی در برش‌های طولی به صورت استوانه ای یا در حقیقت محوری در هیپوکوتیل و در هر کدام از لپه ها دیده می شوند، که تا راس لپه کشیده می‌شوند.

شکل ۴-D رویان گیاه قیچ را که با روش کوماسی برلیانت بلو رنگ آمیزی شده اند نشان می دهد. دانه های پروتئینی به رنگ آبی در شکل دیده می شوند. سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی با تراکم بیشتر می باشند، در حالیکه در سلول‌های پروتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر دیده می شوند. سلول‌های مریستم انتهای ساقه نیز فاقد اجسام پروتئینی می‌باشند (شکل ۴-D). شکل ۴-E مربوط به رویان بالغ است که با معرف سودان سیاه رنگ آمیزی شده است. این معرف علاوه بر لیپیدهای ذخیره ای، غشاها و لایه کوتیکول را نیز مشخص می‌نماید. با توجه به شکل مشخص می‌شود رویان بالغ در گیاه مورد مطالعه فاقد ذخایر لیپیدی می‌باشد. در بررسی مقاطع طولی رنگ آمیزی شده با روش PAS، هیچ نوع انباشتگی از دانه-های نشاسته در بافت‌های ساختاری جنین اعم از پروتودرم، پارانشیم و پروکامبیوم مشاهده نشد (شکل ۴-F). یکی از ویژگی‌های دانه موقعیت رویان در داخل آن است. مطالعه دانه های روشن سازی شده نشان داد که در این گیاه دانه از نوع قاشقکی بوده و رویان با اندازه ۴ میلی متری، حدود ۳:۴ دانه را اشغال می کند که از این جهت جزء دانه های غالب تقسیم بندی می شوند (شکل ۴-G).

بحث و نتیجه گیری

با مشخص شدن ویژگی‌های دانه، بسیاری از جنس‌های گیاهی در خانواده‌ی جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند (۲۲).



شکل ۴- مرحله رویان لپه‌ای و ذخایر آن. A: رویان لپه ای. B: مریستم راس ریشه. C: مریستم راس ساقه. D: اجسام پروتئینی در بافت رویان، رنگ آمیزی شده با روش کوماسی برلیانت بلو، فلش‌ها اجسام پروتئینی را نشان می‌دهند. E: فلش‌ها اجسام پروتئینی را نشان می‌دهند که دارای غشای لیپیدی می باشند. لایه کوتیکول سطح رویان را پوشانده است. F: بافت رویان رنگ آمیزی شده با روش PAS، دانه‌های شفاف اجسام پروتئینی هستند که با معرف پلی ساکاریدها رنگ آمیزی نشده اند. G: موقعیت رویان در دانه شفاف شده قیچ و حجم اشغال شده توسط آن. Em: رویان، sa: مریستم راسی ساقه، pc: پروکامبیوم، ra : مریستم ریشه، rc: کلاهک ریشه،c : لپه، hy: هیپوکوتیل، cu : لایه کوتیکول.

همچنین روشن شدن این اطلاعات در مقایسه‌ی فیلوژنی گیاهان نیز مؤثر است (۲۰). دانه قیچ با شکل بیضی- لوزی مانند و برآمدگی‌هایی که تزئینات پوسته دانه را ایجاد می‌کنند، شناخته می‌شود (۱۷). شروع شکل‌گیری پوسته دانه به لقاح بستگی دارد، زیرا سیگنال‌هایی از محصول لقاح ارسال می شوند که برای تکوین پوسته دانه موردنیاز هستند(۵). همچنین تکوین اندوسپرم نیز با تکوین پوسته دانه مرتبط است، به طوری که سیگنال‌های آغازه کننده‌ی تکوین پوسته دانه توسط سلول‌های مرکزی لقاح یافته/ اندوسپرم ایجاد می‌شود (۲۴). نقش تنظیم کنده‌های رشد نیز در شکل‌گیری پوسته تخمک و درنهایت پوسته دانه مؤثر بوده و موجب رشد و گسترش سلول‌ها می‌گردند، علاوه بر این با تنظیم مولکولی منجر به کنترل سیگنال‌های تکوین پوسته‌ی دانه می‌شوند (۱۲). مطالعات نشان داد که پوسته‌ی تخمک سیگنال‌هایی (ازجمله اکسین) را از اندوسپرم دریافت می‌کند که بر ضخیم شدن دیواره سلولی آن تأثیر می‌گذارند، احتمالاً ضخیم شدگی دیواره پوسته دانه قیچ با این امر قابل توجیه می‌باشد (۳).

چگونگی نمو آندوسپرم هسته ای به طور گسترده ای در گیاهان مختلف بررسی شده است. در غلات نمو آندوسپرم هسته ای به ۴ مرحله شامل مرحله سنوسیتی، مرحله سلولی شدن، مرحله تمایز یابی و بلوغ، و مرحله مرگ سلولی برنامه ریزی شده تقسیم می‌شود. در آرابیدوپسیس نمو آندوسپرم به گونه دیگری است. کمی بعد از سلولی شدن، آندوسپرم از بین می‌رود و تنها یک لایه آندوسپرم اطراف جنین بالغ باقی می‌ماند (۱۸).

بر اساس مطالعه حاضر نمو اندوسپرم در قیچ ابتدا از نوع هسته‌ای می‌باشد و سپس به نوع سلولی تبدیل می‌گردد. در واقع در گیاه قیچ سلولی‌شدن از بخش میکروپیلی و حاشیه‌های کیسه رویانی شروع شده و به‌تدریج پر شدن سلول‌ها به طرف مرکز کیسه رویانی ادامه می‌یابد.زمانی که سلول تخم در مرحله استراحت قرار گرفته است، سلول مادر اندوسپرم تقسیمات میتوزی سریعی را انجام می‌دهد و تعدادی هسته آزاد در سیتوپلاسم سلول مرکزی تولید می‌شود(۱۱).

بررسی‌های بافت‌شناسی در رابطه با نمو آندوسپرم قیچ نیز نشان داد که اولین هسته‌های آزاد در بخش مرکزی کیسه جنینی تشکیل می‌گردد. پس از انتقال این هسته‌ها به حاشیه کیسه جنینی، اولین دیواره‌ها در بین هسته‌های بخش میکروپیلی تشکیل می‌شود. تشکیل اولین دیواره‌ها در این گیاه قابل مقایسه با سلولی‌شدن می‌باشد. مطالعات نشان داده که آندوسپرم هسته‌ای بعدها با تشکیل دیواره بین هسته‌های آزاد سلولی می‌گردد، که این امر حالت خاصی از تکوین آندوسپرم است و می‌تواند به‌عنوان نوعی سازش دو مرحله‌ای و مناسب با توجه به نقش تغذیه‌ای آن در جهت نمو رویان، محسوب گردد(۱۶). در واقع زمانی که آندوسپرم در فاز هسته‌ای می‌باشد، مواد مغذی که از طریق بافت‌های مادری کسب می‌گردد، بدون گذر از دیواره‌های سلولی به سرعت به داخل بافت آندوسپرم وارد می‌شود و در اختیار رویان جوان و درحال رشد قرار می‌گیرد. در مراحل بعد که رویان رشدیافته، تخریب فیزیکی و آنزیمی آندوسپرم به‌وسیله رویان می‌تواند اتفاق بیافتد و بنابراین در هنگام رشد رویان بین هسته‌های آزاد دیواره تشکیل می-گردد و آندوسپرم به سلول‌هایی انفرادی تبدیل می‌شود تا از تجزیه و تخریب بی‌رویه توسط رویان درامان بماند (۱۱). وجود آندوسپرم هسته‌ای یا حداقل ایجاد این مرحله قبل از سلولی‌شدن آندوسپرم، در مواردی که سلولی شدن پس از تکمیل مراحلی از نمو رویان (که نیاز به مواد غذایی بسیار بالاست)، احتمالا به این دلیل است که انتقال مواد مغذی به رویان در این مراحل بسیار سریع می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد هسته‌های آزاد آندوسپرم در این مراحل به‌عنوان یک واسطه برای انتقال مواد غذایی به جنین عمل می‌کنند (۱۸).

دانه ها بر اساس وجود و یا عدم وجود آندوسپرم به دو دسته دانه های دارای آندوسپرم و دانه های فاقد آندوسپرم تقسیم می شوند(۲۱). با توجه به نتایج مشخص شده که آندوسپرم در این گیاه از سلول‌هایی با دیواره ضخیم تشکیل شده است. ضخیم شدگی دیواره موجب کاهش شدید فضای درون سلولی می شود. همچنین دانه از نوع اندوسپرم دار معرفی می‌گردد و بافت اندوسپرم تا مراحل پایانی تکوین دانه باقی می‌ماند.

مطالعات سیتوشیمیایی بافت اندوسپرم نشان داده که پروتئین ماده مهم ذخیره‌ای به شمار می‌رود که در اندوسپرم یافت می‌شود (۲۶و ۲۴). از دیگر مواد ذخیره‌ای در اندوسپرم لیپیدها می‌باشند که غالب مواد ذخیره ای دانه‌های روغنی را به خود اختصاص داده‌اند (۱۸). این اجسام به وسیله نیم غشای فسفولیپیدی احاطه شده اند. علاوه بر این ترکیبات که جزو مواد مهم ذخیره‌ای به شمار می‌روند، مواد معدنی و کاروتنوئیدها هم در اندوسپرم انباشته می شوند (۱۱). این بافت همانند سوسپانسور رویان دارای زندگی کوتاهی است(۲۱) و می‌تواند تغیراتی را متحمل شده و نقش های متعددی از جمله تغذیه جنین درحال رشد، مشارکت فعال در جوانه زنی و تحمیل خفتگی بر رویان از طریق عوامل فیزیکی و شیمیایی ایفا کند (۱۸). در واقع اجسام پروتئینی از متداولترین مواد ذخیره ای دانه ها محسوب می شود که هم در رویان و هم در آندوسپرم بسیاری از تیره های گیاهی مشاهده می شود. از نظر ساختاری اجسام پروتئینی از بخشی تحت عنوان ماتریکس پروتئینی و بخش دیگری به نام گلوبوئید و یا کریستالوئید تشکیل شده اند که بخش ماتریکس منبع ذخیره کننده نیتروژن برای گیاه محسوب شده و بخش گلوبوئیدی منبع ذخیره کننده عناصر می باشد. این اجسام بوسیله غشایی فسفولیپیدی احاطه شده اند و در برخی از گیاهان به وسیله دانه های لیپیدی محصور می شوند(۲۱). با توجه به نتایج این تحقیق، در رویان بالغ سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی با تراکم بیشتر می باشند، در حالیکه در سلول‌های پروتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر دیده می شوند. سلول‌های مریستم انتهای ساقه نیز فاقد اجسام پروتئینی می‌باشند. در حالیکه مشخص شد رویان در گیاه مورد مطالعه فاقد ذخایر لیپیدی می باشد.

در مورد دانه قیچ نیز این فرضیه که دانه‌های نشاسته پیش ساز پلی‌ساکاریدهای دیواره هستند می‌تواند صحیح باشد زیرا انطباق زمانی نزدیکی بین تخریب دانه‌های نشاسته و تشکیل دیواره‌های اولیه توسعه‌یافته در سلول‌های اپیدرم خارجی وجود دارد. فرضیه دیگری که مطرح می‌شود جذب ترکیبات حاصل از هیدرولیز دانه‌های نشاسته توسط جنین و اندوسپرم درحال نمو می‌باشد، زیرا متابولیسم مواد قندی یکی از مکانیسم‌های کنترل نمو جنین می‌باشد. نقش این ذخایر پلی‌ساکاریدی به عنوان تأمین‌کننده مواد غذایی جنین در حال نمو پیشنهاد شده است (۲۳). در این گیاه با توجه به ویژگی‌های نموی جنین و اندوسپرم به نظر می‌رسد دانه‌های نشاسته پوسته نقشی در کنترل نمو جنین ایفا نمی‌کنند.

در بافت اندوسپرم مواد ذخیره‌ای به شیوه‌های مختلفی به‌عنوان مثال از بخش حاشیه‌ای به سمت مرکز (مانندگیاه *Z. fabago*) و از قسمت میکروپیل به سمت شالاز شروع به انباشته شدن می‌کند. در گندم سنتز نشاسته ابتدا در سلول‌های بخش مرکزی اتفاق می‌افتد و درنهایت نیز تجمع نشاسته در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های حاشیه‌ای بیشتر است (۲۷). در اندوسپرم قیچ ازآنجایی‌که در طول نمو جنین، کاهش دانه‌های نشاسته دیده نمی‌شود، به نظر می‌رسد در گیاه قیچ دانه‌های نشاسته در تغذیه جنین نقش کمتری دارند. از طرف دیگر با کاهش تدریجی آنها هم‌زمان با ضخیم شدن دیواره‌های نازک سلول‌های اندوسپرم، به نظر می‌رسد که این دانه‌ها درجهت ضخیم‌شدن دیواره‌ها به مصرف می‌رسند. دیواره‌های ضخیم اندوسپرم، حتی پس از بلوغ نیز باقی می‌مانند، بنابراین به نظر می‌رسد این دیواره‌ها پس از جوانه زنی دانه هیدرولیز شده و به مصرف دانه‌رست جوان می‌رسند، نتایج فوق با Figueiredo and Kohler (۲۰۱۶) مطابقت دارد.

به طور کلی مطالعه دانه‌ی قیچ مشخص کرده است که تخمک از نوع واژگون و دو پوسته‌ای است. مقایسه تکوین اندوسپرم با تکوین رویان قیچ نشان داد که مراحل اولیه نمو بافت‌های همراه رویان، بسیار سریع‌تر اتفاق می‌افتد و رشد رویان به سرعت کامل می‌شود. درحالی‌که نمو اندوسپرم از مرحله گل‌های گرده‌افشانی شده آغاز می‌شود اما به کندی ادامه می‌یابد. آندوسپرم سلولی شده در این گیاه به‌تدریج در کیسه جنینی توسعه پیدا می‌کند و کل فضای کیسه جنینی را اشغال می‌نماید. درواقع دانه از نوع اندوسپرم دار بوده و بافت اندوسپرم تا مرحله رویان بالغ باقی مانده و تحلیل نمی‌رود. درواقع از مرحله رویان کروی که اندوسپرم شروع به سلولی شدن می‌کند، تا پایان رشد لپه‌ها و بلوغ جنین، تنها رویداد مهمی که در اندوسپرم اتفاق می‌افتد، تشکیل دانه‌های نشاسته و تا حدودی افزایش حجم این دانه‌ها می‌باشد که به نظر می‌رسد توسط جنین درحال رشد مصرف می‌گردند. درعین‌حال در سلول‌های اپیدرم خارجی نیز تنها افزایش حجم این سلول‌ها و تحلیل رفتن دانه‌های نشاسته در این سلول‌ها اتفاق می‌افتد. در پایان رشد رویان، که درواقع اساسی‌ترین مراحل تکوین بافت‌های همراه رویان می‌باشد، رویان متحمل تغییر چشمگیری نمی‌گردد. در این مراحل در سلول‌های اندوسپرم، ضخیم شدگی دیواره‌ها و ذخیره شدن مواد لیپیدی و پروتئینی اتفاق می‌افتد. در رویان بالغ گیاه قیچ تمام بخش‌ها شامل مریستم انتهای ریشه، هیپوکوتیل، مریستم انتهای ساقه و لپه‌ها قابل تشخیص می باشد. رویان بالغ در این گیاه دارای هیپوکوتیل نسبتاً طویل بوده و لپه‌ها اندازه بزرگی دارند. همچنین بررسی سیتوشیمی رویان بالغ نشان داد که تمامی سلول‌ها مملو از دانه‌های نشاسته می‌باشند، سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی با تراکم بیشترند در حالیکه در سلول‌های پروتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر دیده می شوند. بر خلاف اندوسپرم، در بافت رویان بالغ مواد کربوهیدراتی تشخیص داده نشد.

در انتها بررسی تزئینات سطحی و تغییرات مورفولوژیکی

سلول‌های اپیدرم خارجی پوسته دانه با جریان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در مراحل مختلف نموی به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره جهت تکمیل مطالعات تکوینی و روشن شدن ویژگی‌های سیتولوژیکی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مسئولان آزمایشگاه سلولی تکوین گیاهی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1- Behnke, H.D., Hummel, E., Hillmer, S., Sauer-Gurth, H., Gonzalez, J., Wink, M. 2013. A revision of African Velloziaceae based on leaf anatomy characters and rbcL nucleotide sequences. Botanical Journal of the Linnean Society 172, 22–94.

2- Bellstedt, D.U., Van-Zyl, L., Marais, E.M., Bytebier, B., De-Villiers, C.A., Makwarela, A.M., Dreyer, L.L. 2008. Phylogenetic relationships, character evolution and biogeography of southern African members of Zygophyllum (Zygophyllaceae) based on three plastid regions. Molecular Phylogenetics and Evolution 47, 932-949.

3- Creff, A., Brocard, L., Ingram, G. 2015. A mechanically sensitive cell layer regulates the physical properties of the Arabidopsis seed coat. Nature Communications 6, 63-82.

4- Erdemoglum N, Kusmenoglu S. 2003. Fatty Acid composition of Zygphyllum fabago seeds. Chemistry of Natural compounds 39, 595-596.

5- Figueiredo, DD., Batista, RA., Roszak, P.J., Kohler, C. 2015. Auxin production couples endosperm development to fertilization. Nature Plants 1, 15184.

6- Figueiredo, DD., Kohler, C. 2016. Bridging the generation gap: communication between maternal sporophyte, female gametophyte and fertilization products. Current Opinion in Plant Biology 29, 16–20.

7- Gahan, P.B. 1984. Plant histochemisry and cytochemistry Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction. Academic Press, London.

8- Galek, R., Kozak, B., Biela, A., Zalewskid, D., Sawickasienkiewize, E., Spychala, K., Stawinski, S. 2016. Seed Coat Thickness Differentiation and Geneticpolymorphism for Lupinus mutabilis Sweet breeding. Turkish Journal of Field Crops 21, 305-312.

9- Ghazanfar, Sh., Osborne, J. 2015. Typification of Zygophyllum propinquum Decne. and Z. coccineum. (Zygophyllaceae) and a key to Tetraena in SW Asia. Kew bulletin 70, 1-9.

10- Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry. Freeman, W.H. and Company.

11- Lersten, N. R. 2004. Flowering Plant embryology. Blackwell publishing, New Jersey.

12- Liao, CY., Smet, W., Brunoud, G., Yoshida, S., Vernoux, T., Weijers, D. 2015. Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. Nature Methods 12, 207–210.

13- Patil, P., Malik, S.K., Sutar, S.,Yadav, S.R., John, J., Bhat, K.V. 2015. Taxonomic Importance of Seed Macro- and Micro-Morphology in Abelmoschus (Malvaceae). Nordic Journal Botany 33, 696–707.

14- Queiroz, R.T., De, A.M., Tozzi, G.A., Lewis, G. P. 2013. Seed morphology: An addition to the taxonomy of Tephrosia (Leguminosae Papilionoideae, Millettieae) from South America. Plant Systematics and Evolution 299,459 – 470.

15- Schenk, J.J., Hodgson, W., Hufford, L. 2013. Mentzelia canyonensis sp. nov.: a new species endemic to the Grand Canyon, Arizona, U.S.A. Brittonia 65, 408–416.

16- Schenk, J.J., Sullivan, M., Washburn, G., Franta, R., Chambers, M. 2016. Allometric Relationships Better Explain Seed Coat Microsculpture Traits In Mentzella Section Bartonia (loasaceae) Than Ecology Or Dispersal. International journal of plant science 177, 263–276.

17- Semerdjieva, IB., Yankova-Tsvetkova, E. 2017. Pollen and seed morphology of Zygophylum fabago and Peganum harmala (Zygophyllaceae) from Bulgaria. Phyton 86, 318-324.

18- Sousa-Baena, M., De Meneze, N. 2014. Seed Coat Development In Velloziaceae: Primary Homology assessment and Insight On Seed Coat evolution. American Journal of Botany 101 (9): 1409 – 1422.

19- Szkudlarz, P., Celka, z. 2016. Morphological Characters Of The Seed Coat In Selected Species Of The Genus Hypericum L. And Their Taxonomic Value. Biodiversity Research and Conservation 44, 1-9.

20- Takahashi, Y., Somta, P., Muto, C., Iseki, K., Naito, K., Pandiyan, M., Natesan, S., Tomooka N. 2016. Novel Genetic Resources in the Genus Vigna Unveiled from Gene Bank Accessions. PLoS ONE 11, e0147568.

21- Terziyski, D. 1981. SEM microscopy-problems, application, prospects for development in the biological sciences in the country. Scientific Works Agricultural Institute, Plovdiv 26, 115-121.

22- Umdale, S.D., Aitawade, M.M., Gaikwad, N.B., Madhavan, L., Yadav, S.R., Rao, S.R., Bhat, K.V. 2017. Pollen Morphology of Asian Vigna Species (Genus Vigna; Subgenus Ceratotropis) from India and Its Taxonomic Implications. Turkish Journal of Botany 41, 75–81.

23- Voiniciuc, c., Yang, B., Heinrich-Wilhelm Schmidt, M., Günl, M., Usadel, B. 2015. Starting to Gel: How Arabidopsis Seed Coat Epidermal Cells Produce Specialized Secondary Cell Walls. International Journal of Molecular Sciences16, 3452-3473.

24- Weijers, D., Wagner, D. 2016. Transcriptional responses to the auxin hormone. Annual Review of Plant Biology 67, 539–574.

25- Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J., Lyoid, A.L. 2000. Arabidopsis seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. The plant journal 22, 483-493.

26- Wu, Sh., Lin, L., Li, H., Yu, Sh., Zhang, L., Wang, W. 2015. Evolution of Asian Interior Arid-Zone Biota: Evidence from the Diversification of Asian Zygophyllum (Zygophyllaceae). PLoS ONE 10, 1-17.

27- Xu, X.Y., Fan, R., Zheng, R., Li, C.M., Yu, D.Y. 2011. Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans. Journal of Zhejiang University Science 12, 507–517.

28- Zeng, C.L., Wu, X.M., Wang, J.B. 2006. Seed Coat Development And Its Evolutionary Implication in Diploid And Amphidiploid Brassica Species. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 48, 15-22.

29- Zhang, F., Fu, P.Ch., Gao, C.B., Chen, Sh.L. 2013. Comparative study on plant seed morphological characteristics of Zygophyl Zygophyllaceae and two new families separated from it. Plant Diversity and Resources 35, 280-284.

Histological and Cytochemical Study of Embryogenesis stages in *Zygophyllum fabago*

Mohajel Kazemi E., Kazemian M., Majidzadeh F. and Aliasgharpour M.

Dept. of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

The formation of the seed is part of the process of reproduction in seed plants. The study of the ontogeny of endosperm and embryogenesis was considered in current research using microscopic techniques. The samples were collected from different developmental stages. Then, the fixed samples were studied by different histochemical methods. The observations indicated that the ovule was of the anatropous and bitegmic type. The outer layers were removed in the early stages. Thus, the seeds of *Z. fabago* were categorized of testal type. During the early developmental stages, the endosperm was of nuclear type and then changed into the cellular type. This makes it easier for the embryo to connect with endosperm tissue in early stages. The endosperm develops gradually toward the central spaces and occupies the entire space of the embryo sac. In fact, the endosperm tissue remains until mature embryo stage and was not degenerated. Also globular, heart-shaped, torpedo-shaped and mature embryo stages along with the RAM, hypocotyl, and SAM were observed. Cytochemical tests indicated that in the later stage of seed development, the formation of starch grains and the strongly thickening of cell walls were occurred, causing considerable reduction of cell cavities as well as hardening of this tissue. In the other hand, the cell storage in the endosperm tissue was more lipid-based than proteinaceous compounds. But in mature embryo no carbohydrate was detected.

Key words: bitegmic, embryo, histological techniques, nuclear endosperm.