بررسی اندام‌های زایشی در گل یخ (*Chimonanthus praecox* L.)

کبری قربانی آسیابر[۱]، پریسا جنوبی[۱]، احمد مجد[۱] و مینا کاظمیان روحی[۲*]

[۱] **ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست گیاهی**

[۲] **ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست گیاهی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۷

چکیده

مطالعات مقایسه‌ای تکوین گل، صفات جدیدی را برای بررسی‌های سیستماتیکی فراهم می‌آورد. گل یخ (*Chimonanthus praecox* L.) به عنوان یک گیاه معطر، دارویی و زینتی به شمار می‌رود. در این پژوهش گل‌ها در اندازه‌های مختلف جمع‌آوری شدند و با استفاده از روش‌های متداول بافت‌شناسی مورد بررسی قرارگرفتند. جهت مطالعه نمونه‌ها، رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت. نتایج مطالعات میکروسکوپی نشان داد که بساک‌ها دارای چهار کیسه گرده بودند و دیواره بساک ۶-۵ لایه‌ای است. سلول‌های لایه تپتوم چندهسته‌ای می‌باشد که نشان‌دهنده فعالیت متابولیسمی بالای آن‌هاست. در گل یخ تپتوم از نوع ترشحی، تترادها از نوع چهاروجهی و میکروسپورزایی از نوع هم‌زمان می‌باشد. همچنین در بررسی میکروسکوپی مشخص شد که شکوفایی بساک‌ها با ایجاد شکاف طولی صورت گرفته است. بررسی‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نشان دادند که طول متوسط محور قطبی دانه گرده ۳۸/۴ میکرومتر است و تزئینات اگزین دانه گرده از نوع مشبک منفذ-دار تشخیص داده شد. با بررسی بخش مادگی مشخص گردید که تخمدان گل یخ ۱۲-۹ برچه‌ای و حاوی تخمک خمیده و دوپوسته‌ای است که تترادها در آن به شکل خطی مرتب شده‌اند. تکوین کیسه رویانی از نوع علف هفت‌بند است. مطالعه ویژگی-های گل مانند الگوی شکل‌گیری اندام‌ها در این گیاه می‌تواند در تشخیص گونه‌های هم‌خانواده موثر باشد.

واژه های کلیدی: تپتوم ترشحی، تخمک خمیده، دیواره‌های بساک، کیسه رویانی، مطالعات میکروسکوپی، *Chimonanthus praecox*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۲۳۳۹۲۶۳، پست الکترونیکی: mina.kazemian69@gmail.com

مقدمه

گل یخ با نام علمی *Chimonanthus praecox* L. متعلق به خانواده Calycanthaceae می‌باشد گیاه گل یخ درختچه‌ای، دارای برگ‌های ساده و متقابل، بدون گوشوارک، دارای گل‌ها معطر منفرد، دوجنسی و منظم است و پرچم‌ها در این گیاه بر روی نهنجی پیاله‌ای شکل قرارگرفته‌اند (۶). بلندی ساقه‌های گل یخ به ۳/۵-۲/۵ متر می‌رسد و برگ‌های آن در فصل زمستان می‌ریزند (۱۸). گیاه *C. praecox* به خاطر زمان گلدهی، رایحه معطر و شکوفه-های زیبایش بیش از ۱۰۰۰سال است که به‌عنوان یک گیاه زینتی کاشته می‌شود (۸و ۱۲). اگرچه این گیاه بومی کشور چین می‌باشد و در نواحی زیر استوایی پراکنده شده است، با وجود این کشت گل یخ در ایران و دیگر کشورها نیز رایج است (۶). گل یخ در میان مردمان چین به‌عنوان یک گیاه دارویی شناخته‌شده است و از گل‌های آن برای درمان تورم مفاصل، سرماخوردگی، سرفه، فشارخون، تهوع و تب استفاده می‌شود (۲۰). گل یخ غنی از ترکیبات فرار معطر است (۶). مطالعات فیتوشیمیایی نشان داد که گل‌های *Chimonanthus* سرشار از اسانس هستند درحالی که ریشه و دانه‌های آن غنی از آلکالوئیدها با فعالیت ضدقارچی هستند (۱۸).

از قرن نوزدهم علم مطالعات تکوین گیاهی مکمل مطالعات تشریحی گیاهان شد. تکوین گیاهی منجر به فهم بهتر ساختار و عملکرد سلول‌ها می‌شود (۲۲). باتوجه به تنوع گونه‌های گیاهی اطلاعات تشریحی و تکوینی می‌توانند در طبقه‌بندی گیاهان نیز بسیار ارزشمند باشند (۲۱). طبق مطالعات در تیره Calycanthaceae در مراحل اولیه نمو بساک در هر کیسه گرده یک گروه از سلول‌های زیر اپیدرمی تمایز یافته و با تقسیمات مماسی بافت هاگزا را به سمت درون و لایه‌های جداری را به سمت بیرون تولید می‌کنند (۳۵). به دنبال تقسیمات میتوزی در توده سلول‌های هاگزایی که مرکز کیسه گرده را پر کرده است، سلول‌های مادر گرده ایجاد می‌شوند. طی فرایند میکروسپورزایی، به دنبال تقسیم میوز سلول مادر گرده، میکروسپورها درون اندام نر تشکیل می‌شوند (۳۵). در تکوین مادگی در ابتدا تخمک‌ها به شکل برجستگی کوچک در جدار تخمدان پدیدار می‌شوند. پس از شکل‌گیری تخمک‌ها به دنبال رشد سریع یکی از سلول‌های خورش، سلول مادر مگاسپور تمایز می‌یابد و با اولین تقسیم میوزی دو سلول (دیاد) و با دومین تقسیم میوزی آن تتراد تشکیل می‌شود (۳۳). معمولاً سلول پایینی تتراد، به تقسیمات میتوزی ادامه می‌دهد و کیسه رویانی را می‌سازد. پس از تندش دانه گرده، لوله گرده روی کلاله نفوذ کرده و دو آنتروزوئید از خامه می‌گذرد و به تخمدان می‌رسد. در نهایت یکی از آنتروزوئیدها با تخمزا ترکیب می‌شود و سلول تخم را تشکیل می‌دهند (۲۷).

باتوجه به اظهارات ژائو (۲۰۰۲) در خانواده Calycanthaceae سلول تخم با یک تقسیم عرضی دو سلول را تشکیل می‌دهد که سلول انتهایی و یک سلول قاعده‌ای ایجاد می‌شوند (۳۳). در نهایت 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 می‌کند و پس از تمایزات سلولی رویان اژدری و در انتها رویان لپه‌ای پدیدار می‌گردند (۳۳).

تخمک در گیاه گل یخ از نوع خمیده معرفی شده است. لو و ژیانگ (۲۰۱۰) آرایش تتراد را در گیاه گل یخ از نوع چهاروجهی (تتراهدرال) گزارش کرده‌اند. باتوجه به اظهارات استدلر و همکاران (۲۰۰۷) ده برچه در گل یخ مشاهده شد.

شاخص‌های مربوط به گل مانند ریخت‌شناسی، رنگ، ساختار و مراحل رویان‌زایی دارای ارزش تاکسونومیکی به ویژه در سطح جنس می‌باشند (۱۰). باتوجه به بررسی‌های مرجع‌شناسی انجام‌شده اطلاعات کافی در مورد مراحل تکوینی اندام‌های زایشی گل یخ در دسترس نیست لذا هدف از این پژوهش بررسی مراحل تکوینی دانه گرده با تأکید بر نمو دیواره بساک و نمو گامتوفیت ماده در گل یخ می‌باشد.

مواد و روشها

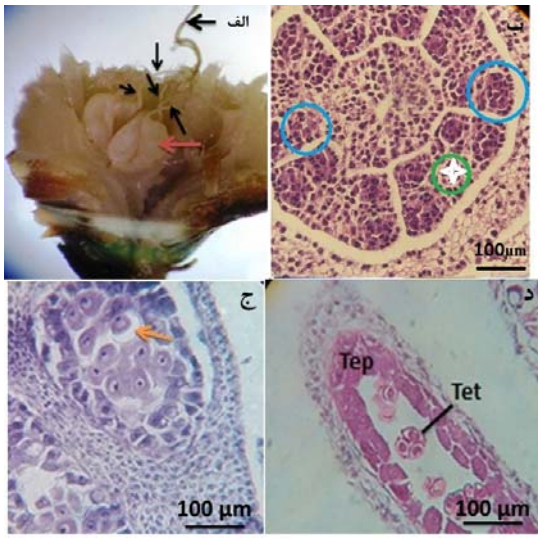
جمع‌آوری نمونه: نمونه‌های گل مورد استفاده در این پژوهش از باغ گیاه‌شناسی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهران در اندازه‌های متفاوت جمع‌آوری شدند و پس از تثبیت به مدت ۱۸-۱۴ ساعت در فیکساتور FAA، گذراندن مراحل آب‌گیری با درجات رو به افزایش الکل، شفاف‌سازی با تولوئن و سپس قالب‌گیری در پارافین، از نمونه‌ها برش‌هایی عرضی (ضخامت ۱۰ میکرومتر) و طولی (۸ میکرومتر) با دستگاه میکروتوم تهیّه گردید. در نهایت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با هماتوکسیلین-ائوزین برای مطالعه با میکروسکوپ نوری Olympus BX41 ساخت کشور آلمان انجام شد (۲۳). برای هر مرحله حداقل ۲۵ گل برش‌گیری شد تا مناسب‌ترین نمونه‌ها انتخاب شوند.

مطالعه ساختار و فراساختار دانه گرده: به‌منظور مطالعه فراساختار اگزین دانه گرده، پس از آب‌گیری از گرده‌ها به‌وسیله دستگاه خشک‌کننده و چسبانیدن گرده‌ها بر روی پایه‌های آلومینیوم، به‌وسیله واحد پوشش‌دهنده طلا، پوشش دهی انجام شد. سپس با میکروسکوپ الکترونی نگاره مطالعه و عکس‌برداری صورت گرفت. روش نشاندن طلا

physical vapor deposition، با دستگاه لایه‌نشان sputter coater از نوع KYKY و مدل EM-3200 بود (۲۳).

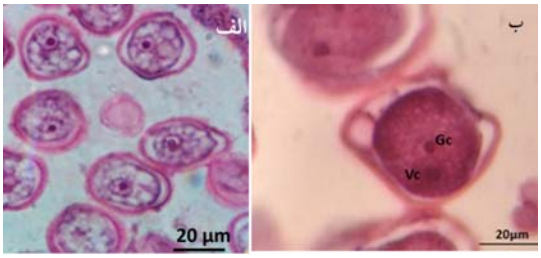
نتایج

میکروسپورزایی و بلوغ دانه‌های گرده: نمای کلی گل نشان داد که پرچم‌های گل یخ ۶ عدد هستند (شکل ۱–الف).



شکل ۱– میکروسپورزایی و تشکیل گامتوفیت نر. (الف): نمایی از مادگی گل یخ با استرئو میکروسکوپ. (ب): برش عرضی غنچه گل، دایره آبی حجره بساک و دایره سبز بخش رابط را نشان می‌دهد که با ستاره سفید مشخص شده است. و فلش قرمز یکی از تخمدان‌ها را نشان می دهد. (ج): برش طولی از بساک گل یخ. فلش نشان‌دهنده سلول‌های مادر گرده با دیواره کالوزی است. (د): مرحله تتراد میکروسپور را نشان می‌دهد و همچنین لایه تپتوم نیز مشخص است، Tep: تپتوم، Tet: تتراد.

در برشی که از پرچم غنچه گل با اندازه ۲/۵ میلی‌متری گرفته شد، در درونی‌ترین قسمت بساک سلول‌های مادر میکروسپور با سیتوپلاسم متراکم و هسته واضح در کنار هم قرارگرفته بودند. همچنین دیواره کالوزی در پیرامون سلول مادر میکروسپور قابل‌مشاهده است (شکل۱–ج). باتوجه به شکل ۱–د، تتراد حاصل از تقسیم میوز سلول مادر میکروسپور و دیواره کالوزی در اطراف آن‌ها و آرایش چهاروجهی به‌وضوح قابل‌تشخیص هستند. درنهایت با ازبین رفتن دیواره کالوزی، میکروسپورهای آزاد و جدا از هم با هسته مشخص در حفره کیسه گرده پراکنده شدند. واکوئله شدن میکروسپورها و افزایش اندازه آن‌ها نیز با توجه به شکل ۲–الف قابل‌ملاحظه است، به‌طوری‌که واکوئله شدن در برخی از میکروسپورها، هسته را به موقعیت کناری جابه‌جا کرده است (شکل ۲–الف). پس از این مرحله، نمو میکروسپور با انجام تقسیم میتوزی هسته کامل شده است که منجر به تشکیل دانه گرده بالغ با یک هسته رویشی (اندازه بزرگ‌تر) و یک هسته زایشی کوچک گردید (شکل ۲–ب).

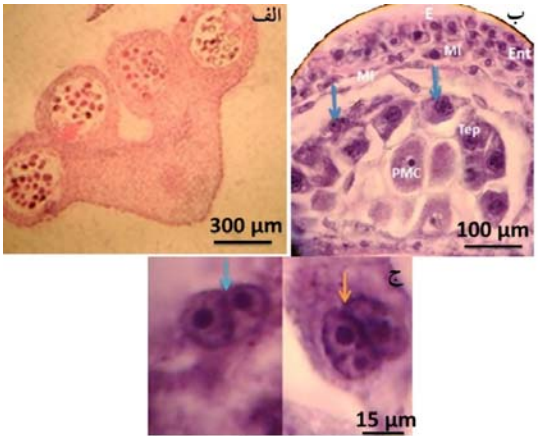


شکل ۲– تشکیل دانه گرده بالغ. (الف) واکوئله و کم تراکم شدن سیتوپلاسم میکروسپور های رهاشده که هسته‌ی میکروسپورها موقعیت کناری پیدا می‌کند، (ب) دانه گرده با دو هسته رویشی بزرگ و زایشی کوچک، Vc: هسته رویشی، Gc: هسته زایشی.

نمو دیواره‌ها و شکوفایی بساک: باتوجه به شکل ۳–الف، بساک‌ها در گل یخ دارای چهار کیسه گرده هستند و همچنین شکل ۳–ب نشانگر لایه‌های دیواره بساک در مرحله مادر میکروسپور از سمت بیرون به درون به‌ترتیب زیر می‌باشد:

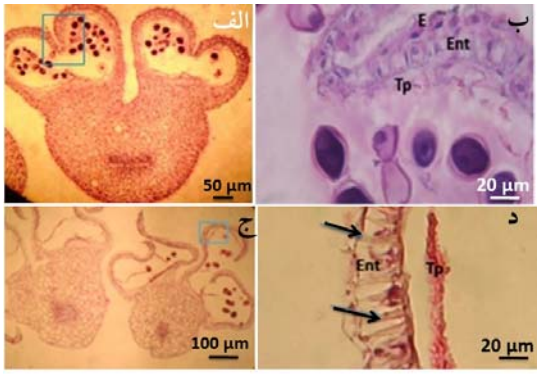
اپیدرم که بیرونی‌ترین لایه بساک گل یخ را تشکیل می‌دهد و از سلول‌های چندوجهی و پهن ساخته شده است. در زیر اپیدرم، سلول‌های لایه مکانیکی قرارگرفته‌اند و پس از آن دو ردیف سلول‌های لایه میانی با اندازه کوچک‌تر قرار دارند. درست در زیر لایه میانی، سلول‌های بزرگ لایه مغذی یا تپتوم با سیتوپلاسم متراکم و رنگ‌پذیری بیشتر قرارگرفته‌اند که از دیواره کمی فاصله دارند (شکل ۳–ب).

برخی از سلول‌های تپتوم دو هسته‌ای و برخی هم سه هسته‌ای مشاهده شدند (شکل۳-ج).



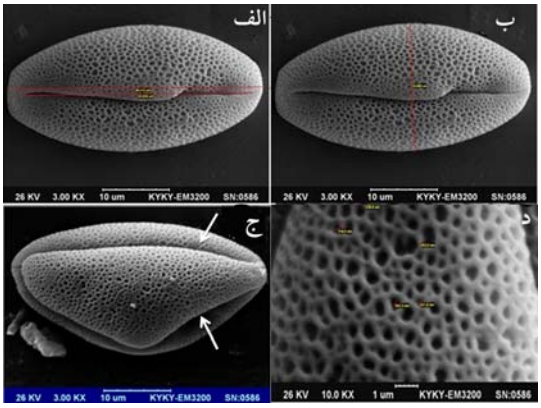
شکل ۳- نمو دیواره بساک، (الف): بساک با چهار کیسه گرده، (ب): لایه‌های دیواره بساک شامل اپیدرم، لایه مکانیکی دو لایه میانی و لایه تپتوم، (ج): سلول‌های دو هسته‌ای و سه هسته‌ای لایه تپتوم، فلش‌ها نشانگر چند هسته‌ای بودن لایه تپتوم است، E : اپیدرم، Ent: لایه مکانیکی، MI: لایه میانی، Tep: تپتوم، PMC: سلول مادر گرده.

به‌تدریج دیواره جداکننده بین کیسه‌های گرده تجزیه‌شده و ادغام دو کیسه گرده صورت گرفت (شکل۴-الف). سلول-های لایه مکانیکی در این مرحله شروع به کشیده شدن کردند، در برخی نقاط لایه میانی پابرجا و در برخی نقاط بقایایی از آن یافت می‌شود و اثراتی از تپتوم نیز مشاهده گردید (شکل۴-ب). درنهایت طی بلوغ دانه‌های گرده در کنار تجزیه بیشتر لایه‌های میانی، تپتوم و دیواره جداکننده بین کیسه‌های گرده، همچنین دخالت عوامل بیرونی، دیواره بساک به روش طولی شکافته شده و دانه‌های گرده بالغ رها شدند (شکل۴-ج). در این مرحله لایه اپیدرمی اندکی تحلیل رفته، ترکیبات دیواره‌ای به شکل U در لایه مکانیکی به‌خوبی قابل‌تشخیص می‌باشد. همچنین هسته‌ها هنوز در برخی از سلول‌های لایه مکانیکی دیده می‌شوند (شکل۴-د).



شکل ۴- شکوفایی بساک گل یخ. (الف): مربع آبی تجزیه شدن لایه جداکننده بین کیسه‌های گرده را نشان می‌دهد. (ب): یکی شدن کیسه‌های گرده و تحلیل رفتن لایه میانی و بقایای تپتوم. (ج): شکوفایی طولی بساک. مربع آبی نشانگر بزرگ‌تر کردن این ناحیه در تصویر (د) است. (د): لایه مکانیکی بساک در مرحله شکوفایی. ترکیبات دیواره‌ای به شکل U در لایه مکانیکی دیده می‌شود و با فلش نشان داده‌شده است. E: اپیدرم، Ent: لایه مکانیکی، Tep: تپتوم.

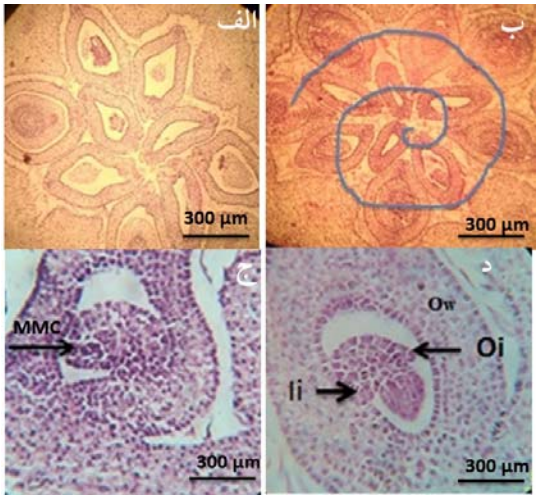
بررسی فراساختار دانه گرده: با بررسی‌های دانه گرده بالغ با میکروسکوپ الکترونی نگاره، آراستار سطح اگزین به‌صورت مشبک منفذدار تشخیص داده شد. دانه گرده سه شیار در محور استوایی دارد (شکل۵-ج). طول متوسط محور قطبی دانه گرده ۳۸/۴ میکرومتر و طول متوسط شیار ۳۴/۶ میکرومتر (شکل ۵-الف) و طول متوسط محور استوایی ۱۹ میکرومتر(شکل ۵-ب)، و متوسط قطر منافذ اگزین بین ۲۲۱ تا ۳۸۴ نانومتر تعیین گردید (شکل۵-د).



شکل۵- نمایی از دانه گرده با میکروسکوپ الکترونی نگاره. (الف وب) نمای استوایی از دانه گرده و اندازه طول و عرض آن را نشان می‌دهد. (ج): سه شیاری بودن دانه گرده دو شیار در تصویر با فلش

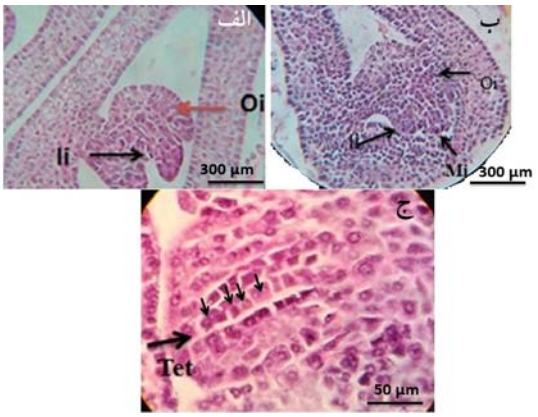
مشخص است و شیار سوم در موقعیت پشتی قرار گرفته است. (د): این تصویر آراستار مشبک و اندازه‌های قطر چاله‌های آن را نشان می‌دهد.

تکوین اندام زایشی ماده: مادگی در گل یخ فوقانی و جدا برچه‌ای است (شکل۶-الف). برش عرضی نشان داد که برچه‌ها به تعداد زیاد (۹ تا ۱۲عدد) با نظم مارپیچی در تخمدان قرار داشتند (شکل ۶-ب). پریموردیوم تخمک به‌صورت برآمدگی کوچکی در جفت ایجاد شد و به‌تدریج طرح اولیه تخمکی شکل گرفت. طرح اولیه تخمکی، خمیدگی را از همان مراحل ابتدایی نمو مادگی نشان می-دهد. سلول مادر مگاسپور با اندازه بزرگ و سیتوپلاسم متراکم به‌خوبی از سایر سلول‌های خورش قابل‌تشخیص است (شکل ۶-ج). با انجام تمایز سلولی، پریموردیوم پوسته تخمکی تخمک جوان شکل گرفت (شکل ۶-د) گسترش پوسته تخمکی نیز در مادگی گل یخ قابل‌ملاحظه است (شکل ۷-الف).



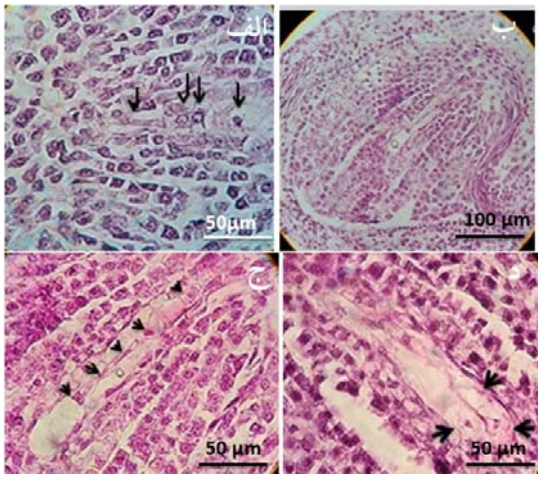
شکل ۶- شکل‌گیری طرح اولیه تخمک. (الف): برش عرضی از مادگی که ۹ برچه را نشان می‌دهد. (ب): برش عرضی از مادگی که ۱۲ برچه دارد و نظم مارپیچی برچه‌ها با خط آبی نشان داده شده است. (ج): طرح اولیه تخمکی. (د) تشکیل پوسته تخمک بر روی طرح اولیه تخمکی، فلش‌ها شکل‌گیری پوسته را نشان می‌دهند.Ii : پوسته داخلی، Mmc: سلول مادر مگاسپور، Oi: پوسته خارجی، Ow: دیواره تخمدان.

شکل۷-ب نشان می‌دهد که پوسته‌ها، سفت (میکروپیل) و بند ایجاد شده‌اند و همچنین مشخص است که تخمک از نوع خمیده بوده و تخمک‌ها با تمکن کناری درون تخمدان قرار گرفته‌اند (شکل ۷-ب). باتوجه به شکل ۷-ج، چهار سلول تتراد از مادر مگاسپور ایجاد شدند. بررسی تعداد زیادی از برش‌ها مشخص کرد که تترادها در گیاه گل یخ از نوع خطی هستند (شکل ۷-ج).



شکل۷- تمایز تخمک. (الف): گسترش پوسته تخمکی بیرونی را نشان می‌دهد. (ب): تخمک تمایزیافته (ج): فلش تتراد خطی را نشان می‌دهد. Ii: پوسته داخلی،Mi: سفت، Oi: پوسته خارجی، Tet: تتراد.

از چهار مگاسپور تشکیل شده طی تقسیم میوزی مادر مگاسپور (شکل ۸-الف)، سلول باقی‌مانده یا مگاسپور عملکردی نهایتاً به کیسه رویانی تحول می‌یابد (شکل ۸-ب). هسته سلول بنیادی کیسه رویانی طی گذراندن چند تقسیم میتوزی ۸ هسته هاپلوئید و کیسه رویانی هشت هسته‌ای را تشکیل می‌دهد که فقط تعدادی از هسته‌های آن مشخص است (شکل ۸-ج). با رشد طولی کیسه رویانی و جابه‌جایی هسته‌ها، سلولی شدن در کیسه رویانی رخ می‌دهد و کیسه رویانی بالغ تشکیل می‌گردد. فقط سلول‌های متقاطر یا آنتی پودها که اندازه بزرگی دارند و در قطب بنی قرارگرفتند قابل‌رؤیت هستند (شکل ۸-د).



شکل ۸- مراحل تکوین کیسه رویانی. (الف) چهار سلول مگاسپور با فلش نشان داده شده است. (ب) کیسه رویانی. ج) فلش‌ها تعدادی از هسته‌های کیسه رویانی را نشان می‌دهند. د) سلولی شدن کیسه رویانی. سلول‌های متقاطر در شکل د با فلش نشان داده شده‌اند.

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که بساک‌های گل یخ دارای چهار کیسه گرده بودند و دیواره بساک ۶-۵ لایه‌ای بوده است. سلول‌های لایه تپتوم چندهسته‌ای می‌باشد. در گل یخ تپتوم از نوع ترشحی، تترادها از نوع چهاروجهی و میکروسپورزایی از نوع هم‌زمان می‌باشد. همچنین در بررسی میکروسکوپی مشخص شد که شکوفایی بساک‌ها با ایجاد شکاف طولی صورت گرفته است. طول متوسط محور قطبی دانه گرده ۳۸/۴ میکرومتر است و تزئینات اگزین دانه گرده از نوع مشبک منفذدار تشخیص داده شد. در میکروسپورزایی طی مراحل نموی سلول‌های هاگزا به سلول‌های مادر گرده تمایز پیدا می‌کنند. در نتیجه میوز، سلول‌های تتراد به وجود می‌آیند و با دیواره ویژه کالوزی پوشیده می‌شوند (۱۷). این دیواره تترادها را عملاً از هم جدا نگه می‌دارد با این کار سلول‌های در حال تقسیم از بر هم کنش‌های احتمالی با سلول‌های مجاور مصون می‌مانند (۱۹). تشکیل و پایداری این دیواره، همچنین نقش آن با یافته‌های دانگ و همکاران (۲۰۰۵) هم سویی دارد. تصور می‌شود دیواره کالوزی نقش مهمی را در تعیین ساختار و طرح سطحی پیش اگزین ایفا می‌کند (۱۱). مطالعات چنارف (۱۹۳۱) در مورد تقسیم هم‌زمان تیره‌های هم راسته گل یخ در شکل‌گیری تتراد حاصل از مادر گرده تأییدی بر مشاهدات این تحقیق می‌باشد. بر اساس جهت‌گیری دیواره کالوزی میکروسپور در تتراد، انواع مختلف تتراد در گیاهان مشاهده می‌شود. تتراد در گیاه گل یخ از نوع چهاروجهی (تتراهدرال) است (۱۹). مطالعات در خانواده Lauraceae (همراسته گل یخ) آرایش چهاروجهی تتراد را برای جنس‌های *Cassytha*، *Cryptocarya* و *Beilschmiedia* گزارش کرده است (۱۵). تتراسپورها در زمان نزدیک به رهایی دارای سیتوپلاسم غیر واکوئله متراکم با یک هسته واضح در مرکز هستند. در این پژوهش افزایش حجم میکروسپورها پس از رهایی قابل‌مشاهده است که به دنبال آبگیری و واکوئله شدن سیتوپلاسم رخ می‌دهد (۳۲). گسترش سیستم واکوئلی باعث تغییر موقعیت هسته از بخش مرکزی به بخش کناری می‌شود (۳۲). مشاهدات این پژوهش در میکروسپورزایی گل یخ با گزارش‌های یانگ و ویلسون (۲۰۰۴) در راسته Laurales نیز هم سویی دارد. بررسی‌ها بر روی بساک گل یخ نشان داد که بساک دارای چهار کیسه گرده با تقارن دو طرفی می‌باشد (۴). دیواره بساک قبل از بلوغ دارای پنج تا شش لایه شامل یک لایه اپیدرمی، یک لایه مکانیکی، دو لایه میانی و یک تا دو لایه تپتوم است که به‌عنوان یک مخزن انرژی در مجاورت بافت سلول‌های مادر گرده و سرانجام در تمایز گامتوفیت عمل می‌کند (۱۳). هئو و همکاران (۲۰۰۴) نیز چنین ساختمانی را در دیواره بساک در خانواده Gomortegaceae متعلق به راسته‌ی Laurales مشاهده نمودند (۸).

سلول‌های لایه تپتوم ممکن است چندهسته‌ای شوند (۱). افزایش تعداد لایه‌های تپتوم در بساک اعضای برخی تیره‌ها احتمالاً پس از ویژه شدن تپتوم به‌عنوان یک بافت رخ می‌دهد (۱۷). دولایه‌ای شدن تپتوم در گیاهان موجود در راسته Laurales گزارش شده است و با نتایج این تحقیق

هم سویی دارد (۲۹). ازآنجایی‌که سلول‌های لایه تپتوم در مراحل ابتدایی نمو بساک و دانه‌های گرده در جای خود ثابت باقی مانده اند، می‌توان اظهار داشت که در گل یخ تپتوم از نوع ترشحی است که مشاهدات مشابه هئو و همکاران در سال ۲۰۰۴ می‌تواند تأییدی بر نتایج حاصل باشد. اولین تقسیم میکروسپور یک میتوز نابرابر است که موجب تشکیل دو سلول متفاوت (زایشی و رویشی) ازنظر ریختی و عملکردی می‌شود (۱). ویژگی مشخص اولین تقسیم، موقعیت و جهت‌یابی دوک تقسیم است که به‌وسیله موقعیت مشخص و ثابت میکروسپورها نسبت به لایه‌های جانبی دیواره تعیین می‌شود (۱۶). سلول زایشی و رویشی حاصل به‌وسیله غشا از یکدیگر جدا می‌شوند (۷). شکوفایی بساک با تکوین دانه گرده هماهنگ است (۲). لایه مکانیکی به فرایند شکوفایی در این مرحله کمک می‌کند. در ابتدا دیواره بین دو کیسه گرده تحلیل می‌رود و دو کیسه گرده، یکی می‌شوند (۳۰). خشکی لایه مکانیکی، چروکیدگی متمایزی را در بخش‌های ضخیم و غیرضخیم دیواره‌ی سلول سبب می‌شود و یک فشار خارجی را به وجود می‌آورد که منجر به انقباض دیواره‌ی بساک و باز شدن کامل استومیوم می‌گردد تا به رهایی گرده کمک کند (۳۰). همچنین ضخیم‌شدگی‌های فیبری در شکفتگی بساک نقش کمکی ایفا می‌کند (۳۰). گزارش‌های کاملینا (۱۹۹۸) ضخیم شدگی‌های فیبری را در خانواده Calycanthaceae تائید می‌کنند. با بررسی بخش مادگی مشخص گردید که تخمدان حاوی تخمک خمیده و دوپوسته‌ای است که تترادها در آن به شکل خطی مرتب‌شده‌اند. مادگی در *C. praecox* جدا برچه و با برچه‌هایی به تعداد ۱۲-۹ است. باتوجه به اظهارات استدلر و همکاران (۲۰۰۷)، هشت تا ده برچه در گل یخ مشاهده شد. مطالعات میکروسکوپی پژوهش حاضر نشان داد که برچه‌ها به‌طور مجزا و با نظم مارپیچی بر روی نهنج مخروطی قرار گرفته-اند که این مشاهدات با نتایج استدلر و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد. تخمک در گیاه گل یخ از نوع خمیده است که با گزارش‌های ژائو در سال ۲۰۰۲ بر روی *C. praecox* هم سویی دارد. با رشد پریموردیوم تخمک طرح اولیه تخمکی ایجاد می‌شود. در طرح اولیه تخمکی یکی از سلول‌ها با رشد و افزایش حجم خود از سایر سلول‌ها تمایزیافته و سلول آرکئوسپوری را ایجاد می‌کند (۱). سلول‌های اطراف آن پوسته‌های تخمک و بافت خورش را می‌سازند (۵). تکوین پوسته‌های تخمک از قاعده پریموردیوم آغاز می‌شود و سپس رأس آن را در بر می گیرد و میکروپیل (سفت) را به وجود می‌آورد (۳). مشاهدات این تحقیق با گزارش‌های ویارت در سال ۲۰۱۲ در مورد تیره Calycanthaceae هم‌خوانی دارد. نتایج این پژوهش نشان داد در گونه مورد مطالعه تتراد مگاسپورها از نوع خطی است. ژائو سال ۲۰۰۲ در *C. praecox* تتراد خطی را گزارش کرده است. مطالعات شائو و یوآن (۲۰۰۶) نشان می دهد که معمولاً یکی از سلول‌های تترادی باقی می‌ماند و سلول مادر کیسه رویانی را به وجود می‌آورد. این سلول به‌سرعت رشد کرده و پس از سه تقسیم میتوزی متوالی تشکیل کیسه رویانی هشت هسته‌ای را می‌دهد. سپس هسته‌ها مکان‌یابی می‌کنند و پس از آن جداربندی هر هسته به همراه مقداری سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. ژو و همکاران (۲۰۰۷) نوع کیسه رویانی را در گل یخ از نوع علف هفت‌بند گزارش کرده‌اند. طبق مطالعات دروس و کولتونو (۲۰۱۱) در تکوین گامتوفیت ماده خانواده Calycanthaceae، هنگام لقاح یکی از هسته‌های آنتروزوئید با هسته ثانویه ترکیب می‌شود و آندوسپرم را ایجاد می‌کند (۲۶). آندوسپرم رویان را احاطه کرده و طی نمو رویان مواد غذایی موردنیاز آن را تأمین می‌کند. هسته دیگر آنتروزوئید با هسته تخمزا ترکیب می‌شود و سلول تخم را به وجود می‌آورد (۱).

به‌طورکلی نتایج نشان داد که آرایش گل در این گیاه چرخه‌ای بوده و مادگی دارای برچه‌های مجزا و متعدد است و تمکن در آن به‌صورت کناری دیده می‌شود. همچنین نوع کیسه رویانی در گل یخ از نوع تک‌اسپوری

می‌باشد. ازآنجایی‌که گل یخ یکی از گیاهان دارویی و زینتی به شمار می‌رود و از طرفی این گیاه سال‌ها در ایران نیز کاشته می‌شود، به‌منظور درک بهتر سلول‌شناسی در بخش اندام‌های زایشی، مطالعات گسترده‌تر در زمینه مولکولی در تکوین دانه گرده و گامتوفیت ماده در گیاه گل یخ پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱-چهرگانی راد، ع.، زارع، ش.، و حاجی صادقیان، س.، ۱۳۸۸. رویان‌زایی در *Tripleurospermum disciforme*: تیپ جدید و نادر از رویان‌زایی، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۳، شماره ۱، صفحات ۳۲۰-۳۲۹.

۲-چهرگانی راد، ع.، محسن زاده، ف.، و صالحی، ه.،۱۳۹۰. مطالعه تکوین اندام‌های زایشی (پرچم و تخمک) *Achilleabieberestinii afan* ، زیست‌شناسی تکوینی، سال سوم، شماره ۱۰، صفحات ۷۴-۶۳،

۳- رودال، پ. ج.،۱۳۹۰. تشریح گیاهان گل‌دار (مقدمه‌ای بر ساختار و تکوین)، ترجمه آقاخانی، ح.، و قاسم‌خانی، م.، مرکز نشر دانشگاهی، جلد ۱، صفحه ۵۶-۶۵.

۴- سیمپسون، م. ج.، ۱۳۹۲. سیستماتیک گیاهی، ترجمه قهرمانی نژاد، ف.، پویان، پ.، حسینی، ا.، صادقی، ن.، فریدون فر، س.، طهماسبی، ا.، خلیلی، ز.، سیاه رضایی، ف.، و پژوهان مهر، م.، انتشارات خانه زیست‌شناسی، جلد ۱، صفحه ۲۴-۵۴.

۵- محجل کاظمی، ا.، کاظمیان روحی، م.، مجیدزاده، ف.، و علی-اصغرپور، م.، ۱۳۹۸. بررسی بافت شناختی و سیتوشیمیایی مراحل مختلف رویانزایی گیاه قیچ. پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست-شناسی ایران)، دوره ۳۲، شماره ۲، صفحات ۲۹۶-۳۰۷.

۶- مظفریان، و.، ۱۳۹۰. رده‌بندی گیاهی، کتاب دوم، دولپه‌ای‌ها، انتشارات امیرکبیر تهران، صفحه ۸۶-۹۵،

۷- کلیج، ص.، و کاظمیان روحی.، م. ۱۳۹۶. جوانه‌زنی دانه و تغییرات آناتومی گیاه کنجد تحت تاثیر نانوذرات نقره، پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، دوره ۳۰، شماره ۴، صفحات ۸۹۹-۹۰۹.

8- Azuma, H., Toyota, M., and Asakawa, Y., 2005. Floral scent chemistry and stamen movement of *Chimonanthu preacox* (L.) Link (Calycanthaceae), Acta Phytotaxonomica et Geobotanica, 41,pp:35-42.

9- Drews, G., and Nand Koltunow, A. M., 2011. The Female Gametophyte, American Society of Plant Biologists, PP: 6-24.

10- Dong, X., Hong, Z., Siraramakishnan, M., Mahfouz, M., Werma, D. P. S., 2005. Callose synthase (cals5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis, JournalThe plant , 42, PP: 315-328.

11- Elsa, C., Beatriz, G., and Galatib, M., 2012. Ultra structural study of pollen and anther development in Luehea divaricate (Malvaceae, Grewioideae) and its systematic implications: Role of tapetal transfer cells, orbicules and male germ unit. Flora, 207, PP: 888– 894.

12- Farsam, H., Amanlou, M., Taghi Cheetazo, N., Amin, G. R., and Salehi Sormaghi, M. H., 2007. Essential oil constituents of *Chimonanthus fragrans* flowers population of Tehran, Daru, 15(3), PP: 129 – 131.

13- Galati, B. G., Zarlavsky, G., Rosenfeldt, and Gotelli, M., 2012. Pollen ontogeny in Magnolia liliflora desr, Plant systematics evolution, 298, PP: 527-534.

14- Heo, K., Kimoto, Y., Riverosom, M., and Tobe, H., 2004. Embryology of Gomortegaceae (Laurales): characteristiscs and chacter evolution. J Plant Ras. 117, PP: 221-228.

15- Heo, K., Werff, H, V., and Tobe, H., 1998. Embryology and relationships of Lauraceae (Laurales), Bot Journal Linn Soc, 126, PP: 295–322.

16- Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radiv, A., and Ulrich, S., 2008. Pollen terminology an illustrated handbook, Springer wien newyork.

17- Kamelina, O. P., 1981. Family calycanthaceae. PP: 69-74. In T, B, Batygina and M. S., Yakovlev(eds), Comparative Embryology of

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مسئولان آزمایشگاه تکوین گیاهی گروه گیاهی دانشگاه خوارزمی سپاسگزاری می‌شود.

Flowering plant, Witeraceae-Juglandaceae, Nauka, Leningard, Russia.

18- Kozomara, B., Vinterhalter, B., and Radojevi, L. j., 2008. In vitro propagation of *Chimonanthus praecox* (L.), a winter flowering ornamental shrub. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 44, PP: 142- 147.

19- Lu, J. G., and Xiong, G., 2010. Pollen grain characteristics under SEM for classification of *Chimonanthus praecox* cultivars, Journal of nahjing forestry university, 26, pp:136-145.

20- Lu, J., Zhang, S. H., Chu, L., Zhou, F. J., 2012. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts of the flowers of the Chinese plant *Chimonanthus praecox*, Natural Product Research, 26, PP: 1363–1367.

21- Maiti, R., Satya, P., Rajkumar, D., and Ramaswamy, A., 2012. Crop Plant Anatomy, PP: 1-3.

22- Ray F., Evert, 2006. Esau's plant anatomy, Wiley, PP: 1-3.

23- Sanderson, J. B., 1994. Biological Microtechniques, Londan, Oxford press.

24- Schnarf, K., 1931. Vergleichende Embryologie der Angiospermen, Berlin: Borntrager, 354 p.

25- Staedler, Y. M., Weston, P. H., and Endress, P. K., 2007. Floral Phyllotaxis and Floral Architecture in Calycanthaceae (Laurales), International Journal of Plant Sciences, 168(3), PP: 285–306.

26- Teryokhin, F, S., Yakorler, M, S., and Nikitichera, Z, T., 1975. The development of microsporangium, pollen grains, ovule and embryo sac in *Cynomorium songaricum* Rupr. (cynomoriaceae), Bot, Journal. 60(2), PP: 153-162.

27- Ueyama, Y., Hashimoto, S., Nii, H., and Furukawa, K., 1990. The volatile constituents of the flower concrete of *chimonanthus praecox* Link, from china, Journal Flavour and fragrance, 5, PP: 85 - 88.

28-Wiart, C. H., 2012. Medicinal plant of China, Korea and Japan, Pharmaceutical products china publication, v2, pp; 55-59.

29- Wilson, Z., yang, A., 2004. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development, 128, PP: 483-492.

30- Wilson, Z., Song, J., Taylor, B., and Yang, C., 2011. The final split: the regulation of anther dehiscence. Journal of Experimental Botany, 62(5), PP: 1633–1649.

31- Xiao, D. X., and Yuan, Z., 2006. Embryogenesis and seed development in *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae), Journal of Plant Research, 119, PP: 163-166.

32- Yang, X., Zhang, H., Guo, W. Z., Zheng, Y., Miao, H., Wei, L., and Zhang, T., 2008. Ultrastructure in Microspore Abortion of Genic Male Sterile Line in Sesame (Sesamum indicum L.), Acta Agronomica Sinica, 34, PP: 1894–1900.

33- Zhao, W. J., 2002. Study on the sporogenesis and formation on of gametophytesin *Chimonanthus praecox* Link, Master thesis Huazhong Agricultural University, chapter 4, pp:52-59.

34- Zhou, M. Q., Zhao, K. G., and Chen, L. Q., 2007. Genetic diversity of Calycanthaceae accessions estimated using AFLP markers. Scientia Horticulturae, 112, PP: 331–338.

35- Zhou, S., Renne, S., and Wen, J., 2006. Molecular phylogeny and intra- and intercontinental biogeography of Calycanthaceae, Mol Phylogenet Evol, 39, PP: 1–15.

Ontogeny of generative organs in *Chimonanthus praecox* L.

Ghorbani Asiabar K.,[1] Jonoubi P.,[1] Majd A.[1] and Kazemian Ruhi M.[2]

[1] Dept. of plant science, Faculty of Biology science, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of plant science, Faculty of Natural science, Tabriz University, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

Comparative floral ontogeny provides new characters for systematics studies. Winter sweet (*Chimonanthus praecox* L.) is an aromatic, medicinal and ornamental plant. In the present study, the flowers were collected during different development stages and then, subjected to investigations through conventional histological methods. Samples were stained with Hematoxylin and Eosin. Results of microscopic studies have shown that anthers are tetrasporangiate. The anther wall composes 5-6 layers. The tapetum layer cells were multinuclear, indicating their high level of metabolic activity. Tapetum, tetrads and microsporogenesis are respectively secretory, tetrahedral and simultaneous types in Wintersweet. Anther dehiscence was completed through longitudinal splits. Through the inspection of pollen grains via SEM, it was revealed that the average length of polar axis of the pollen grains was 38.4 µm while the exine sculpture of pollen grains was identified as reticuloporait type. Through the investigation of the gynoecium it was revealed that winter sweet has 9-12 carpels that contain anatropous bitegmic ovules in which the tetrads are arranged in a linear form. The development of the embryo sac was of polygonum type. Studying flower characteristics such as organ formation can be useful in recognition of co-family species in this plant.

Key words: anther layers, anatropous ovule, *Chimonanthus praecox*, embryo sac, Microscopic analysis, Secretory tepetum.