

## اثر نانوذرات اکسید آلومینیوم بر اسپورزایی و تکوین گامتوفیت در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)

عبدالکریم چهرگانی راد\*، سمانه معتبرنیا و مهسا جعفری انواری

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۲۲

### چکیده

پژوهش حاضر با هدف شناخت مراحل تکوین اندام‌های تولیدمثلی و بررسی اثر نانو ذره اکسید آلومینیوم بر مراحل تکوین تخمک، کیسه رویانی، پرچم و دانه‌های گرده در گیاه لوبیا به عنوان یکی از عمده منابع غذایی انسان، طراحی شد. بذرها لوبیا در شرایط گلخانه‌ای کشت شده و با غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (۰، ۰۱/۰، ۰۱/۰ و ۱/۰ گرم بر لیتر) تیمار شدند. گل‌ها در ابعاد مختلف جمع‌آوری شده و پس از تثبیت، آبیگری و قالب‌گیری با میکروتوم برشگیری شدند. رنگ آمیزی برش‌ها از طریق هماتوکسیلین - ائوزین انجام شد. مراحل تکوین تخمک و دانه‌های گرده در نمونه‌های گیاهان شاهد و تحت تیمار با میکروسکوپ نوری مطالعه و عکسبرداری شد. نتایج نشان داد الگوی تکوینی در گیاهان شاهد همسو با گزارش‌های پیشین بود. تخمک از نوع واژگون، کیسه رویانی از تیپ علف هفت بند (پلی گونوم)، آرایش تتراد مگاسپور اغلب خطی و به ندرت T شکل بود. تعداد پرچمها ۱۰ عدد، بساک از نوع چهار کیسه گرده ای، لایه تاپی در ابتدا از نوع ترش‌حی و در مراحل پایانی تکوین پرچم از نوع پلاسمودیال، آرایش تترادها از نوع تتراهدردال بود. دانه های گرده گرد تا بیضی مشاهده شد. نتایج نشان داد که در گروه‌های تیماری تکوین تخمک و کیسه رویانی تحت تاثیر قرار نگرفته است، اما در پرچمها کاهش زیست پذیری دانه های گرده، افزایش ضخامت لایه انتین، بی نظمی در آرایش تترادها و بی نظمی ساختاری دانه‌های گرده، برخی از اثرات تیمار با نانوذره اکسید آلومینیوم بودند.

واژه های کلیدی: نانوذرات، اکسید آلومینیوم، تکوین، تخمک، دانه‌های گرده

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۲۷۱۵۴۱، پست الکترونیکی: Chehregani@basu.ac.ir

### مقدمه

کشاورزی کاربرد گسترده‌ای دارند (۲). در عرصه کشاورزی، عرضه کودهای شیمیایی به صورت نانو ذرات به تازگی مورد توجه قرار گرفته است. البته نتایج تحقیقات نشان‌دهنده واکنش‌های مختلفی در گیاهان نسبت به نانو ذرات بوده است (۳، ۴).

از طرفی، با توجه به کاربرد روز افزون این ذرات در علوم و صنایع مختلف، آن‌ها به صورت آزاد در طبیعت و در تماس با انسان می‌باشند و دارای پتانسیل به‌خطر اندازی سلامتی و زندگی انسان هستند. گیاهان در معرض محیط‌های آبی و

نانو ذرات اتم‌ها یا ملکول‌هایی با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوتی نسبت به درشت ملکول‌ها از خود بروز می‌دهند. فناوری نانو بهره‌برداری از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی موادی با ابعاد نانو در علوم و صنایع مختلف می‌باشد (۱). امروزه نانوفناوری با سرعت زیادی در حال رشد است و عرصه‌های مختلف علوم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به عنوان مثال، نانوذرات در صنایع الکتریکی، بیوسنسورها، صنایع غذایی، رنگرزی، گرم‌های ضدآفتاب و به ویژه در

زیست محیطی شرکت کرده و اثرات متفاوتی بر محیط-زیست، گیاهان و انسان دارند. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرنانوذره اکسیدآلومینیوم بر مراحل مختلف تکوین تخمک و دانه‌های گرده در گیاه لوبیا که دارای ارزش غذایی بالایی است، طراحی و اجرا شد.

### مواد و روشها

**مواد گیاهی و تیمارها:** گونه گیاهی *Phaseolus vulgaris* از تیره Fabaceae به عنوان یک مدل گیاهی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. بذره‌های گیاه لوبیا رقم شکوفه، از مرکز تحقیقات کشاورزی همدان تهیه و در گلخانه پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا همدان، به صورت کشت گلدانی در چهار گروه دوازده‌تایی کاشته شدند. گیاهان در سه گروه تیماری (شامل ۵ گلدان و هر گلدان دارای ۳ دانه رست همانند) با سه غلظت ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۱/۰ گرم بر لیتر از نانوذره اکسیدآلومینیوم در آب مقطر به صورت اسپری برگ‌ی تیمار شد و یک گروه هم به عنوان شاهد انتخاب شد. بعد از گذشت یک ماه از رشد دانه رسته‌ها، محلول پاشی شروع و هفته‌ای یکبار انجام و تا بعد از گلدهی ادامه پیدا کرد. در هر بار اسپری هر گیاه به طور تقریبی ۵ میلی لیتر از محلولهای تیماری را دریافت می‌کرد. نانوذرات مورد استفاده، از شرکت پیشگامان مشهد تهیه شد. نانوذره اکسید آلومینیوم مورد استفاده، از نوع گاما با درجه خلوص ۹۹/۹٪ و ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر بود (شکل ۱).

**مطالعات میکروسکوپی:** جهت مطالعات تکوینی گیاه *P. vulgaris* تحت تیمار با نانو ذرات آلومینیوم، از گیاهان گروه‌های مختلف تیماری و شاهد، به طور جداگانه غنچه‌ها و گل‌ها در ابعاد متفاوت و در زمانهای مختلف از گلدهی تا کامل شدن میوه‌ها جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در محلول FAA تثبیت شده و در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند. نمونه‌ها با عبور از محلول‌های الکلی با درجات افزایشی آبیگری شده و در پارافین قالب‌گیری شدند (۱۶).

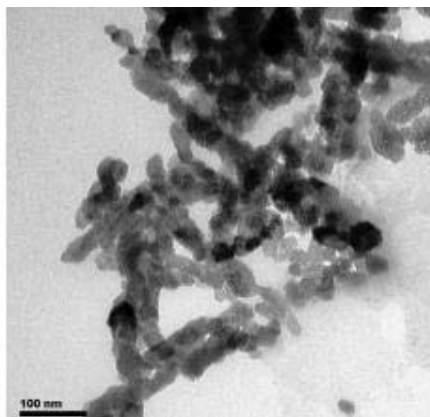
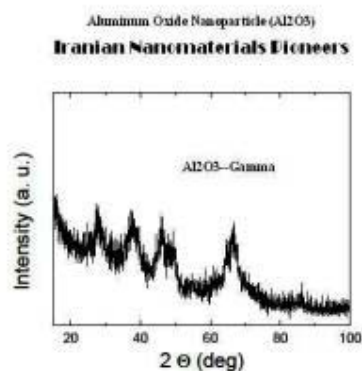
خاکی و حتی اتمسفر می‌باشند، بنابراین ذرات نانو به درون گیاهان نفوذ کرده، در آن‌ها باقی می‌مانند و از طریق گیاهان وارد چرخه غذایی انسان می‌شوند (۵).

از جمله مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته‌است، می‌توان به مطالعه Yu و همکاران در سال ۲۰۱۱ اشاره کرد که تاثیر نانوذره آلومینیوم بر *Caenorhabditis elegans* را مطالعه و نشان دادند که القای شدید پاسخ‌های تنشی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آسیب‌های اکسیداتیو در اثر تیمار نانوذره آلومینیوم ایجاد شده است (۶). در جلبک‌ها مکانیسم‌های مختلفی برای القای سمیت، توسط نانوذرات گزارش شده‌است. از جمله، برهم‌کنش شیمیایی بین ذرات (۸،۷)، تنش‌های اکسیداتیو که منجر به مرگ سلول می‌شود (۱۰،۹) و سمیت یونی (۱۱).

برخی مطالعات نشان داده که نانوذره اکسیدآلومینیوم مانع رشد ریشه در ذرت، خیار و کلم شد؛ اما باعث افزایش رشد ریشه در تربچه گردید (۱۳،۱۲). گزارش شده که نانوذره‌ی اکسید آهن باعث افزایش دانه‌های گرده ناموفق در تشکیل لوله گرده و کاهش در زیست پذیری دانه‌های گرده در گیاه *Arabidopsis thaliana* گردید (۱۴).

در سال‌های اخیر، بررسی مراحل مختلف تکوین گل شامل تکوین مادگی، تخمک، گامتوفیت ماده، پرچم و دانه گرده به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). مطالعه‌ی مراحل تکوین اندام‌های تولید مثلی برای درک چگونگی حفظ بقای گیاهان نادر، گیاهان درحال انقراض و همچنین گیاهان حائز اهمیت در کشاورزی و باغبانی ضروری است (۱۵).

باتوجه به کاربرد روزافزون نانوذرات، به ویژه نانوذره اکسید آلومینیوم در شاخه‌های مختلف علوم و صنایع احتمال بروز آلودگی‌های زیست محیطی وجود دارد. همچنین این ذرات دارای ابعاد ریز و سطح فعالیت بالایی هستند و در عبور از سدهای بیولوژیک بدن با مشکل چندانی مواجه نمی‌شوند؛ به طورگسترده در واکنش‌های



شکل ۱- تصویر نانوذرات اکسید آلومینیوم (سمت راست) توسط میکروسکوپ SEM و طیف اشعه X نانوذرات اکسید آلومینیوم (سمت چپ)

دانکن توسط نرم افزار SAS انجام و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel 2007 رسم شد.

### نتایج

اسپورزایی و تکوین گامتوفیت در نمونه‌های شاهد: پس از طی مرحله رویشی، در شرایط مناسب گلدھی، گل‌ها از تحولات عده‌ای از جوانه‌های جانبی شروع به تشکیل می‌کنند. از فعالیت سلول‌های تونیکا و بخش فوقانی کورپوس، چند لایه سلول به وجود می‌آید که تشکیل پرومیرستم هاگزا را می‌دهد. این بخش در آینده خاستگاه اندام‌های زایشی گل خواهد بود (شکل ۲A). با افزایش تقسیمات سلولی در سلول‌های تحتانی کورپوس و سلول‌های بالای مریستم مرکزی، لایه‌های فشرده‌ای به نام مریستم نهنج‌زا تشکیل می‌شوند که خاستگاه دمگل، نهنج و برخی بخش‌های غیر زایشی گل است. به تدریج بخشی از مریستم زایشی اولین پریموردیوم‌های پرچمی را به وجود آورده و بقیه نیز به تدریج صرف تشکیل سایر پرچم‌ها و برچه‌ها خواهد شد. گلبرگ‌ها با تاخیر بیشتر از مجاور پرچم‌ها تشکیل می‌شوند (شکل ۲ B,C,D).

**تکوین تخمک:** تخمک از نوع واژگون است (شکل D ۴). پوسته‌های تخمک در طرفین جسم تخمک تقارن ندارند و معمولاً پوسته‌ای که در جهت خمیدگی تخمک ایجاد می‌-

قالب‌ها به کمک میکروتوم دستی مدل Micro DS 4055 rotary (دید سبز، ارومیه، ایران) برش‌گیری شده و با روش رنگ‌آمیزی مضاعف همتوکسیلین-انوزین رنگ شدند (۱۵). عکس‌برداری به کمک میکروسکوپ نوری Zeiss مدل Axiostar Plus (Germany) و دوربین دیجیتال Cannon مدل G11 (Japan) در بزرگنمایی‌های مختلف صورت گرفت. برای محاسبه درصد تترادهای با شکل غیر معمول، درصد دانه‌های گرده با انتین ضخیم و تعیین درصد آنها، حداقل در ۱۰ لام متعلق به ۱۰ نمونه تیماری، و از هر لام حداقل ۵ بساک و ۵۰ دانه گرده مورد شمارش و بررسی قرار گرفت.

**زیست‌پذیری دانه‌های گرده:** به منظور ارزیابی زیست‌پذیری دانه‌های گرده، از ده غنچه در هر گروه تیماری دانه‌های گرده جمع‌آوری شده و توسط رنگ استوکارمن رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت زیست‌پذیری دانه‌های گرده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. دانه‌های گرده سالم، توپر و رنگ‌پذیر به عنوان دانه گرده زنده و دانه‌های گرده توخالی، شکسته و بی‌رنگ به عنوان دانه گرده غیر زنده منظور شدند (۱۶) که دانه‌های گرده غیرزیست‌پذیر به شکل درصدی از کل دانه‌های گرده محاسبه شدند.

**آنالیزهای آماری:** آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. مقایسه میانگینها با آزمون

بررسی ما موقعیت چهار لایه زیر اپیدرمی دارد (ترازونیت می‌باشد) و اصولاً در چهارمین لایه زیر پوسته تخمک تشکیل می‌شود (شکل ۴A). نخستین تقسیم میتوزی سلول مادر کیسه رویانی موجب تشکیل دو هسته هاپلوئید می‌گردد. هر هسته به نسبت حجیم و دارای هستک یا هستک-های مشخص است (شکل ۴B). دومین تقسیم میتوزی موجب تشکیل چهار هسته در کیسه رویانی (شکل ۴C, D) و تقسیم سوم موجب تشکیل کیسه رویانی هشت هسته‌ای می‌شود. کیسه رویانی کشیده و کم و بیش شکلی نامنظم دارد (شکل ۴E). اطراف کیسه رویانی با سلول‌های خورش پوشیده شده است. درونی‌ترین لایه پوسته که فرش‌کننده خورش است با نام آندوتلیوم در تصاویر مشهود است (شکل ۴E)؛ این لایه به صورت شعاعی امتداد یافته و سلولهای آن دارای هسته کاملاً واضح و سیتوپلاسمی متراکم هستند.

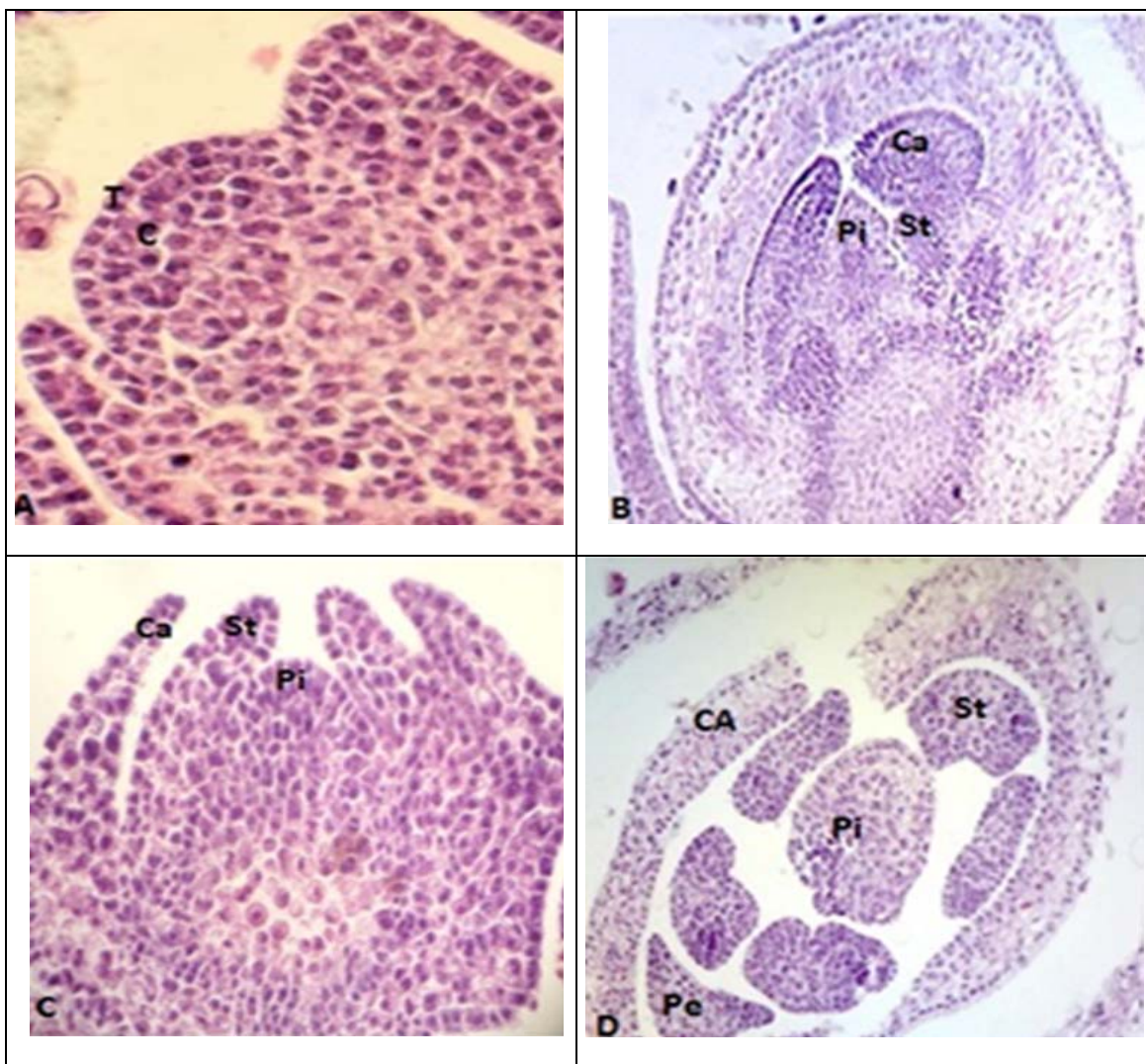
هسته‌های کیسه رویانی آرایش ویژه‌ای پیدا کرده و سه هسته در قطب مجاور سفت، سه هسته در قطب دور از سفت و دو هسته در مرکز کیسه رویانی قرار می‌گیرند. جدار بندی هر هسته به همراه مقداری سیتوپلاسم موجب تشکیل سه سلول در قطب مجاور سفت و سه سلول دور از سفت و یک سلول دیپلوئید در قسمت مرکزی می‌گردد. سلول‌های مجاور سفت که دستگاه تخمزا نیز نامیده می‌شود شامل دو سلول قرینه در طرفین و یک سلول میانی به نام تخمزا می‌گردد. این سه سلول قبل از دیگر سلول‌ها تمایز می‌یابند. سلول‌های دور از سفت یا متقاطرها خیلی سریع و بلافاصله بعد از تشکیل تحلیل می‌روند. دوهسته میانی کیسه رویانی سیتوپلاسم مشترکی دارند و اغلب با هم تلفیق شده و هسته دیپلوئیدی را تشکیل می‌دهند. در تصاویر برش طولی تخمدان در این مرحله پوسته‌های تخمک، مجرای سفت، بقایای بافت خورش و کیسه رویانی قابل تشخیص است (شکل ۴F). جسم تخمک با بند زاویه زیادی پیدا کرده و مجرای سفت به تدریج به پایه تخمک نزدیک می‌شود و در نهایت تخمک واژگون می‌شود. با

شود، در سطح پایین‌تری شکل می‌گیرد. کمی بعد پوسته‌های تخمکی به صورت برجستگی‌هایی در طرفین تخمک پدیدار می‌شوند. سپس پوسته درونی در زیر پوسته بیرونی شروع به تشکیل می‌کند (شکل B ۳). ضمن تشکیل پوسته‌های تخمک، توده مرکزی سلول‌ها با تقسیمات و تمایز خود، بافت خورش با سلول‌های دیپلوئید را تشکیل می‌دهد. از رشد سریع و تحولات یکی از این سلول‌ها، مگاسپوروسیت تمایز می‌یابد. این سلول تقریباً موقعیت مرکزی دارد و با حجم زیاد خود، درشتی هسته، هسته متراکم و حجیم و شکل چند وجهی که دارد به خوبی از سایر سلول‌های خورش قابل تشخیص است (شکل A, B ۳).

اولین تقسیم میوزی مگاسپوروسیت (شکل C ۳) موجب تشکیل دو سلول هاپلوئید یا دیاد (شکل D ۳) و دومین تقسیم میوزی موجب تشکیل تتراد می‌شود. بررسی تعداد زیادی از لام‌ها نشان می‌دهد که تترادها از نوع خطی و به ندرت T شکل می‌باشند. به طور معمول وقتی میوز با تشکیل تترادها به پایان می‌رسد، پوسته‌های تخمک به خوبی قابل تشخیص هستند و حدود ۳/۴ از جسم تخمک را می‌پوشانند. در بسیاری از نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته تعداد لایه‌های پوسته درونی شامل دو و تعداد لایه‌های پوسته بیرونی شامل چهار ردیف سلولی می‌باشد (شکل E, F ۳).

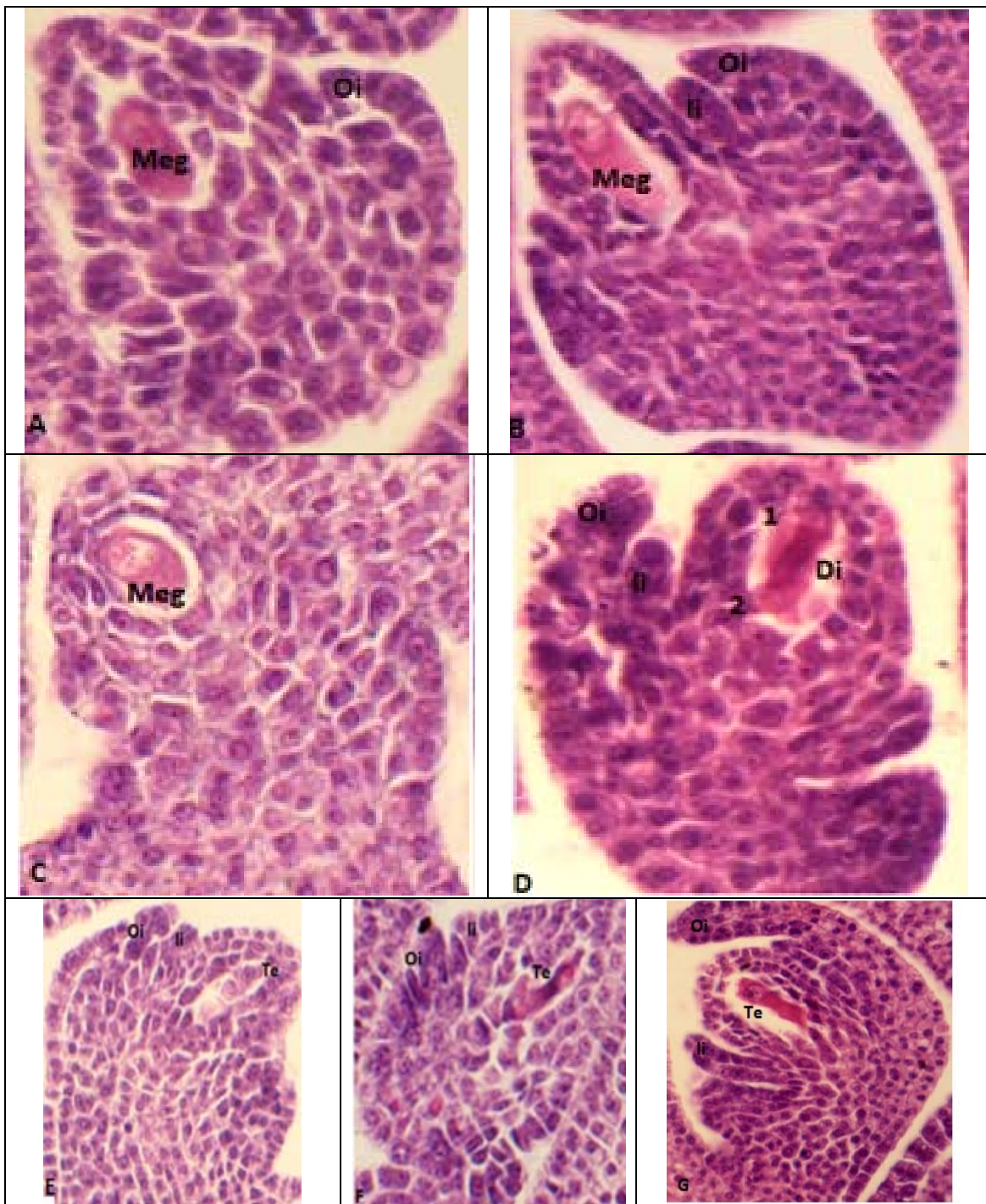
از چهار سلول حاصل از تقسیم میوز، سه سلول تحلیل می‌روند و سلول بنی یا شالازی با افزایش حجم و رشد هسته و سیتوپلاسم خود به صورت سلولی حجیم درآمده و به سمت مجرای سفت مهاجرت می‌کند (شکل G ۳). در تمام طول تقسیم میوز تا مرحله حجیم شدن یکی از مگاسپورها، تقسیمات سلول‌های سازنده خورش موجب افزایش تعداد این سلول‌ها می‌شود و این سلول‌ها به صورت لایه‌های کم و بیش مرتبی اطراف سلول سازنده کیسه رویانی که مادر کیسه رویانی نامیده می‌شود را می‌پوشانند. سلول مادر کیسه رویانی در نمونه‌های مورد

تشکیل کیسه رویانی و سلول‌های قابل لقاح شامل تخمزا (هابلونید) و سلول مرکزی (دیپلوئید) تکوین تخمک به پایان می‌رسد (شکل ۴F).

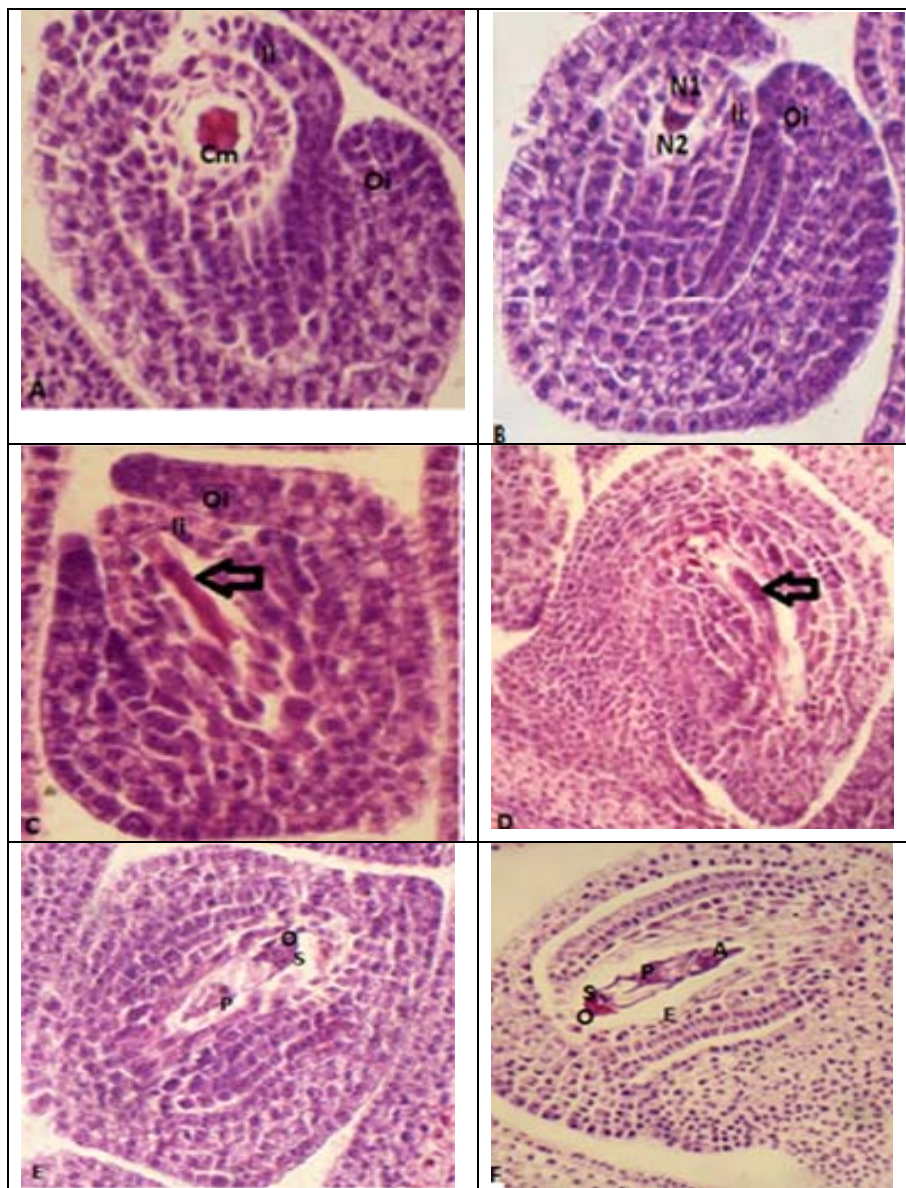


شکل ۲- مراحل بنیان‌گذاری گل: (A) برش عرضی جوانه رویشی لوبیا، تونیکا و کورپوس قابل مشاهده است. (B) برش طولی جوانه زایشی لوبیا: کاسبرگ، پریموردیوم پرچم و پریموردیوم مادگی. (C) جوانه زایشی لوبیا با بزرگنمایی و نمو بیشتر: کاسبرگ، پریموردیوم پرچم، پریموردیوم مادگی. (D) : غنچه درحال تشکیل اندامهای گل، کاسبرگ، پرچم که به دلیل اختلاف ارتفاع فقط ۵ پرچم در سطح برش دیده می‌شود، پریموردیوم مادگی به صورت توده بیضی شکل بدون تمایز زیادی در سلول‌ها و گلبرگ‌ها که در این شکل آنان نیز شروع به تشکیل کرده‌اند. (بزرگنمایی شکلها X400).

مخفف‌ها: T: تونیکا، C: کورپوس، Ca: کاسبرگ، St: پریموردیوم پرچم، Pi: پریموردیوم مادگی، Pe: گلبرگ‌ها



شکل ۳- مراحل تقسیم میوز در تخمک: (A) تشکیل و رشد پوسته بیرونی تخمک (Oi) و نمایی از سلول حجیم مگاسپوروسیت (Meg) (B). رشد بیشتر پوسته بیرونی (Oi) و تشکیل پوسته درونی (Ii)، سلول مگاسپوروسیت (Meg) حجیم شده و برای تقسیم میوز آماده می‌شود. (C) سلول مگاسپوروسیت (Meg) در مرحله پروفاز (D) رشد و تمایز بیشتر پوسته درونی (Ii) و بیرونی (Oi) و بروز اولین تقسیم میوز و تشکیل دیاد (Di) (E). تقسیم دوم میوز شروع شده و تتراد (Te) تشکیل می‌شود. اکثر تترادها خطی است. (F) تتراد از نوع T شکل در تصویر رویت می‌شود. (G) سلول بنی باقی مانده و سه سلول دیگر تحلیل می‌رود. در تصویر آثار باقی مانده سه سلول تحلیل رفته دیده می‌شود و سلول بنی به سمت سفت مهاجرت می‌کند. (بزرگنمایی شکلها X400).



شکل ۴- مراحل تشکیل کیسه‌روبیانی: (A) کیسه‌روبیانی تک هسته‌ای که در آن مادر کیسه‌روبیانی (Cm)، پوسته بیرونی (Oi) و پوسته درونی (Ii) علامت-گذاری شده است. (B) اولین تقسیم میتوزی رخ داده و دو هسته هاپلوئید N1 و N2 را تشکیل می‌دهد (کیسه‌روبیانی دو هسته‌ای). کیسه‌روبیانی رشد کرده و دو هسته به وسیله یک واکوئل از هم جدا می‌شوند. (C) تقسیم دوم میتوزی به وقوع می‌پیوندد و ۴ هسته هاپلوئید تشکیل می‌شود. (D) نمایی از کیسه‌روبیانی هشت هسته‌ای همراه با نمایی از نحوه قرار گرفتن تخمک و پوسته‌ها (تخمک واژگون). (E) کیسه‌روبیانی هشت هسته‌ای که در آن هسته‌ها در حال مهاجرت بوده و جداربندی سلول‌ها نیز در حال انجام است. تخمزا (O)، سلول‌های سینرژید (S)، سلول قطبی (P). (F) کیسه‌روبیانی بالغ با هفت سلول، تخمزا (O)، سلول‌های سینرژید (S)، سلول‌های آنتی پود (A)، سلول‌های آنتی پود (P)، لایه اندوتلیوم (E). (بزرگنمایی شکلها X400).

D ۲). پرچم‌های حلقه اول زودتر و حلقه دوم به صورت متناوب با حلقه اول و با کمی تاخیر به وجود می‌آیند. سپس این دو حلقه خیلی سریع با هم ادغام شده و تشکیل لوله

تکوین پرچم: پرچم‌های لوبیا ۱۰ عدد می‌باشد که در دو حلقه ۵ تایی پدیدار می‌گردند و به دلیل اختلاف ارتفاع فقط پنج پرچم در برش عرضی قابل مشاهده است (شکل

پرچمی متشکل از ۹ پرچم به هم پیوسته و یک پرچم آزاد را می‌دهند (نافه از نوع دیادلف است).

سلول حاشیه‌ای زیر اپیدرمی خاستگاه لایه‌های بساک شامل: اپیدرم، لایه مکانیکی، لایه موقت و لایه تاپی می‌باشد که هر چهار لایه در این گیاه، فقط از یک ردیف سلولی تشکیل شده بود. سلول‌های لایه موقت ناپایدار بوده و در طی مراحل میوز از بین می‌روند (شکل ۵A).

سلول هاگ‌زای از طریق تقسیم میتوزی تکثیر شده و توده سلول‌های مادر گرده که دارای هسته حجیم هستند را به وجود می‌آورد. هریک از این سلول‌ها شروع به تقسیم میوز کرده که مراحل آن از این قرار است: ابتدا میوز I با مرحله پروفاز I آغاز می‌شود و سلول شروع به از دست دادن پوشش هسته کرده و وارد تقسیم میوزی می‌شود (شکل ۵B)، سپس در مرحله متافاز I تترادها در یک ردیف مرتب شده و در آنافاز I این تترادها شروع به جدایی از یکدیگر می‌کنند (شکل ۵C)، در مرحله تلوفاز I تقسیم هسته‌ها بدون سیتوکینز تکمیل می‌گردد و دو هسته هاپلوئید تشکیل می‌گردد (شکل ۵D). سپس میوز II آغاز می‌شود بدین صورت که در مرحله پروفاز II پوشش هسته مجدداً تخریب شده و در مرحله متافاز II کروموزوم‌ها در یک ردیف مرتب می‌شوند (۵E) اما در آنافاز II این بار کروماتیدهای خواهری جدا شده (شکل ۵F) و در تلوفاز II چهار هسته تشکیل می‌شود و در آخر چهار سلول n کروموزومی هاپلوئید به نام تراسپور به وجود می‌آیند (شکل ۵G). آرایش تترادها در این نمونه اغلب از نوع تتراهدردال (آرایش تترادها به صورت هرمی است و میکروسپورها در یک سطح قرار ندارند) است (شکل ۵H,I).

کمی قبل از آغاز میوز در سلول‌های مادر دانه گرده، دیواره ویژه با ماهیت عمدتاً کالوزی توسط همین سلول‌ها به اطراف ترشح می‌شود و آنها را احاطه می‌کند که حجم آن در ابتدا کم ولی بعداً زیادتر می‌شود. این دیواره در انتهای میوز شروع به تخریب می‌کند (شکل ۵I).

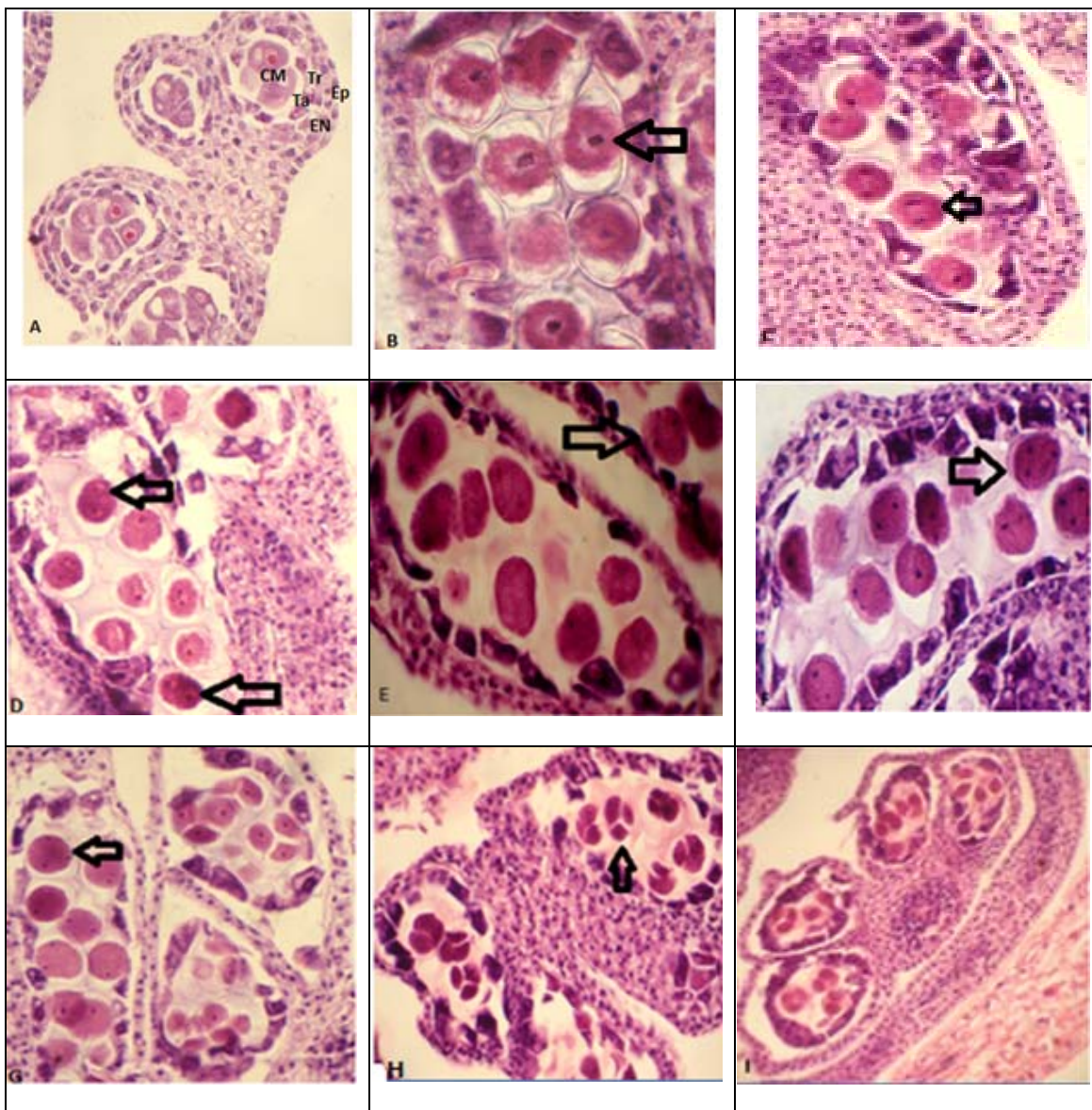
لایه تاپی داخلی ترین لایه بساک است و مجاور تراسپورها قرار دارد که نقش تغذیه‌ای و ترشحاتی را بر عهده دارد. این سلول‌ها به دو دسته ترشحاتی و پلاسمودیال تقسیم می‌شوند که هر دو نوع آن در بساک لوبیا دیده می‌شوند. به این صورت که سلول‌های این لایه تا مرحله میکروسپور جوان پایدار بوده (ترشحاتی) (شکل ۵ A,B,C) و بعد از آن شروع به تخریب می‌نمایند (پلاسمودیومی) (شکل ۶ A,B,C). از طرفی لایه تاپی در لام‌های مورد بررسی ما تک هسته‌ای رویت شد. لایه مکانیکی اولین لایه زیر اپیدرمی است که در بساک تک‌وین پیدا می‌کند و در بساک بالغ تنها لایه است که باقیمانده و قابل مشاهده است (شکل D ۶)

در انتهای میوز دیواره کالوزی اطراف تراسپورها به صورت مرکزرو (سانتری پت) و همزمان فرو رفته، و ۴ میکروسپور جوان از هم جدا می‌شوند. چهار میکروسپور آزاد شده هنوز واکنش نکرده‌اند (شکل ۶A) و در گام بعدی ابتدا واکنش شده و هسته این سلول‌ها به تدریج به کنار مهاجرت می‌کند.

اطراف هر میکروسپور را دیواره آگزین در بر گرفته است. این دیواره ابتدا پلی ساکارییدی و سپس اسپوروپولینینی است. از طرفی، وقتی که دیواره کالوزی تحلیل می‌رود و میکروسپورهای جوان آزاد می‌شوند؛ دیواره پکتوسلولزی دیگری به نام انتین در مجاورت غشای سیتوپلاسمی تشکیل می‌شود (شکل ۶B). علاوه بر لایه‌های آگزین و انتین، منافذ سه‌گانه رویشی بر روی دیواره گرده جوان به چشم می‌خورد که محل خارج شدن لوله گرده در زمان رویش دانه گرده هستند.

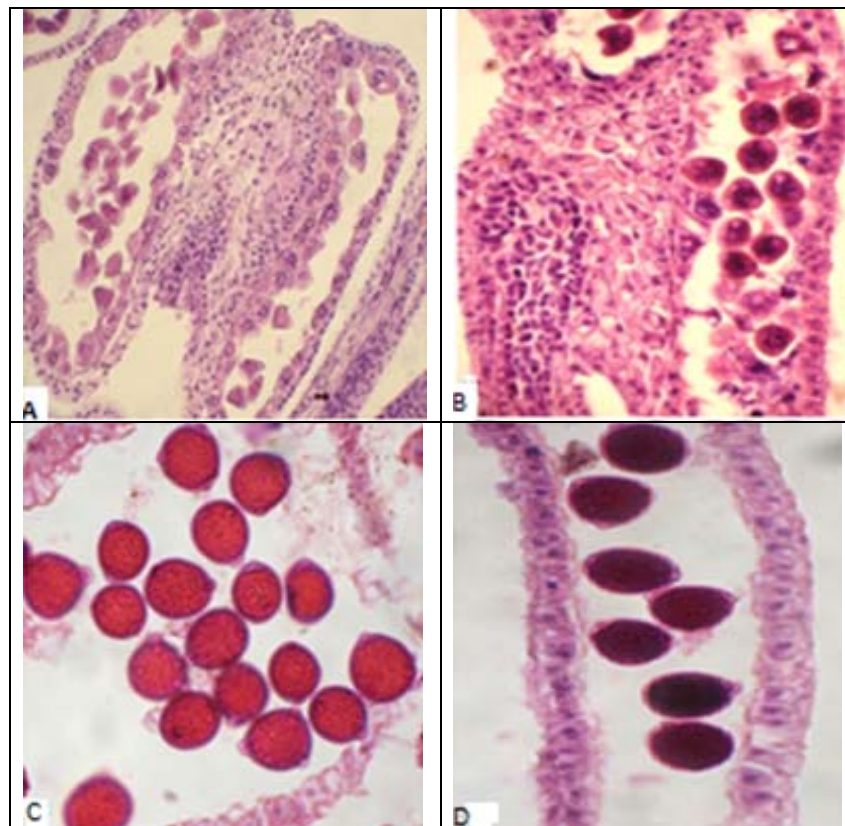
از تقسیم نامساوی هسته در گرده جوان، دو هسته رویشی و زایشی حاصل می‌شود. هسته زایشی دوکی شکل و متراکم است اما هسته رویشی بزرگ و غیر متراکم است که بعد سیتوکینز انجام می‌شود. بنابراین دانه‌های گرده‌ای که از بساک‌ها رها خواهند شد، دارای دو سلول، رویشی و زایشی هستند (شکل ۶C,D).





شکل ۵ - A) برش عرضی یک بساک لویبیا. سلول‌های مادر دانه‌گرده (PMC) که چند وجهی و دارای هسته‌های بزرگ هستند و برای تقسیم میوز آماده می‌شوند. همچنین لایه‌های بساک به وضوح مشاهده می‌شوند. B) مرحله پروفاز I، C) مرحله آنافاز I، D) مرحله تلوفاز I، E) مرحله متافاز II، F) مرحله آنافاز II، G) مرحله تلوفاز II، H) سیتوکینز همزمان و تشکیل تترادها به صورت تتراهدرا، I) در مرحله سیتوکینز لایه موقت از بین رفته و جای آن خالی است بنابراین لایه موقت ناپایدار است. (بزرگنمایی شکلها X400).

مخففها: (Ep) اپیدرم، (En) لایه مکانیکی، (Tr) لایه موقت، (Ta) لایه تابی



شکل ۶: A - سلول‌های میکروسپور نابالغ که هنوز واکوتله نشده و به تازگی با تحلیل لایه کالوزی آزاد شده‌اند. (B) سلول‌های میکروسپور جوان که واکوتله شده، برای تقسیم میتوز آماده شده‌اند. (C) دانه گرده بالغ که در حال انباشت مواد هستند و آگزین وایتین تشکیل شده است. (D) دانه گرده کاملاً بالغ که به خاطر انباشت مواد رنگ تیره داشته، سه منفذ رویشی مشهود است. در این مرحله لایه تاپی تحلیل رفته و فقط لایه مکانیکی باقی مانده است. (بزرگنمایی شکلها X400).

تترادها مشاهده شد (شکل ۷A). حدود ۱۲ درصد از دانه‌های گرده در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر و ۲ درصد در غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر نانوذره اکسید آلومینیوم به صورت معنی‌داری دچار تغییر در آرایش تترادها شدند که این تغییر در سطح احتمال یک درصد ( $P \leq 0/01$ ) معنی دار است. اما در غلظت ۰/۰۰۱ گرم بر لیتر نانوذره اکسید آلومینیوم مراحل تکوینی مشابه شاهد بوده و تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد رویت نشد. بیشترین تغییرات در بالاترین غلظت نانوذره اکسید آلومینیوم (۰/۱ گرم بد لیتر) مشاهده شد (شکل ۸).

بعد از میوز، تترااسپورها با از بین رفتن دیواره کالوزی از هم جدا شده، میکروسپورهای جوان آزاد می‌شوند و دیواره

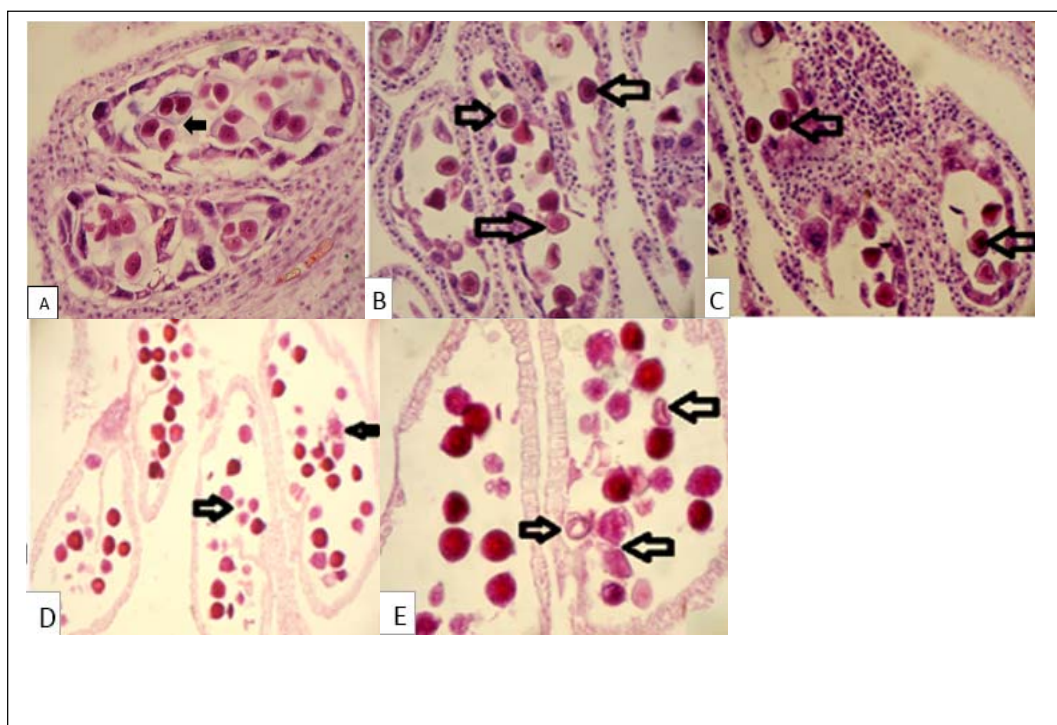
اسپورزایی و تکوین گامتوفیت در گیاهان تحت تیمار: بررسی دقیق لام‌های میکروسکوپی تهیه شده از گیاهان تحت تیمار، نشان داد در مراحل مختلف تکوین تخمک، ناهنجاری مشهودی وجود ندارد. در بررسی مراحل تکوین دانه گرده در برش‌های متعدد میکروسکوپی، ناهنجاری‌هایی در گیاهان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آلومینیوم مشاهده شد. در این نمونه‌ها، هیچ یک از مراحل تقسیم میوز دچار اختلال نشد، اما در مراحل بعدی بلوغ میکروسپور جوان ناهنجاری‌هایی مشاهده شد. بعد از تقسیم میوز، چهار سلول هاپلوئید به نام تتراسپور به وجود می‌آیند. آرایش تترادها در این گیاه اغلب از نوع تتراهدرال است؛ اما در گیاهان تحت تیمار به ویژه در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر نانوذره اکسید آلومینیوم، به هم خوردن آرایش

درحالی که این درصد در گیاهان شاهد سه درصد بوده و از این نظر تفاوت معنی‌دار و حائز اهمیتی در سطح احتمال یک درصد ( $P \leq 0/01$ ) وجود داشت. سایر غلظت‌های به کار رفته نانوذره اکسید آلومینیوم حدود پنج درصد زیست‌ناپذیری در دانه‌های گرده را نشان داد که نسبت به گروه شاهد این تفاوت معنی‌دار بود اما مقایسه بین دو گروه تیماری با هم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در واقع زیست‌پذیری دانه‌های گرده از ۹۷ درصد در شاهد به ۷۵ درصد در بالاترین غلظت کاربردی کاهش یافته‌است (شکل ۱۰).

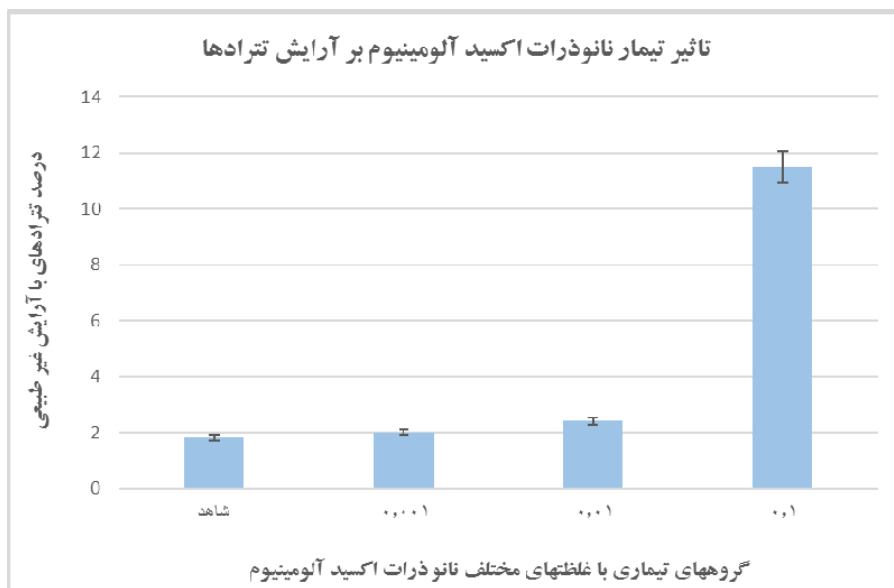
باتوجه به آنالیزهای صورت گرفته، هر سه ویژگی ذکر شده، تحت تاثیر تیمارهای نانوذره اکسید آلومینیوم به صورت معنی‌داری دچار تغییر شده است اما میزان این تغییرات متفاوت بوده و حتی در بعضی تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد.

پکتوسلولوزی دیگری به نام انتین در مجاورت سیتوپلاسم تشکیل می‌شود. در هر سه گروه تیماری، ضخیم شدن لایه انتین نسبت به گروه شاهد، به صورت معنی‌داری در سطح احتمال ( $P \leq 0/01$ ) مشهود بود (شکل VB,C). بیشترین درصد تغییر ضخامت لایه انتین در تیمار ۰/۱ گرم بر لیتر نانوذره اکسید آلومینیوم با ۲۳ درصد رویت شد. در غلظت ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ گرم بر لیتر نانوذره اکسید آلومینیوم به ترتیب ۶ و ۷ درصد دانه‌های گرده با تفاوت کمتری نسبت به شاهد به صورت معنی‌دار، دچار ضخامت در لایه انتین شدند (شکل ۹).

با انجام رنگ‌آمیزی استوکارمن بر روی دانه‌های گرده لوبیا، میزان تغییر در زیست‌پذیری آن‌ها تحت تاثیر نانوذره اکسید آلومینیوم بررسی شد. نتایج نشان داد، تیمار ۰/۱ گرم بر لیتر نانوذره اکسید آلومینیوم بیشترین درصد افزایش دانه‌های گرده زیست‌ناپذیر (۲۵ درصد) را نشان داد (VD,E).



شکل ۷- (A) برهم خوردن آرایش تترادها . (B,C) ضخیم شدگی لایه انتین (D,E) دانه‌های گرده زیست‌ناپذیر (پیکانها) از جمله اثرات تیماری است که کم و بیش در اغلب تیمارها مشاهده شد.



شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آلومینیوم (۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ گرم بر لیتر) بر آرایش تترادها. هرستون معرف میانگین چهار تکرار ± انحراف معیاری است.

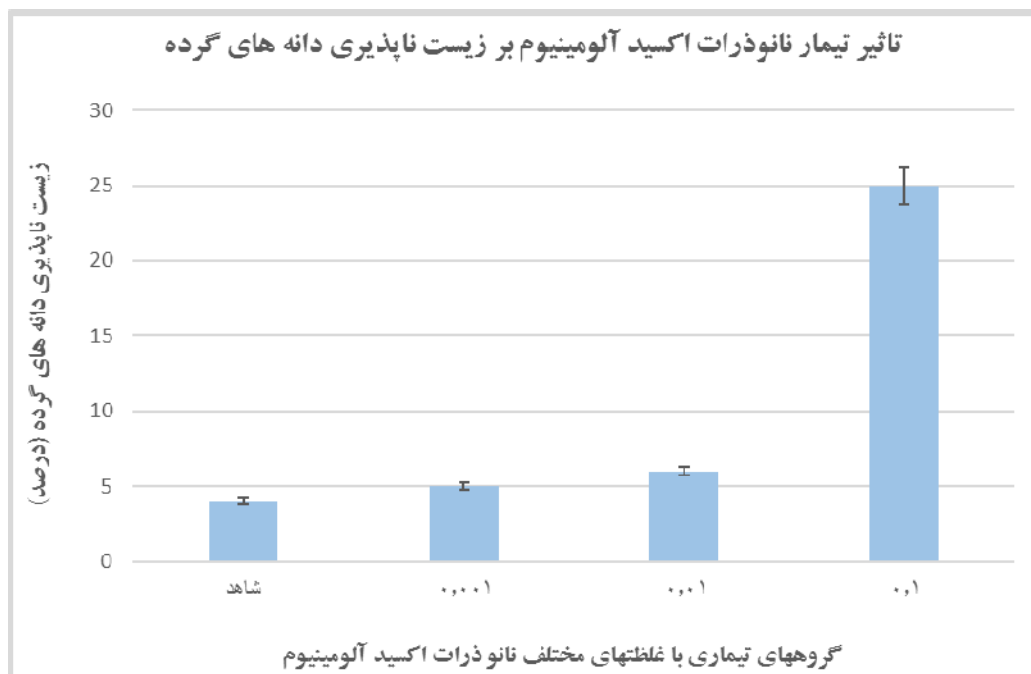


شکل ۹- اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آلومینیوم (۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ گرم بر لیتر) بر ضخامت لایه انتین. هرستون معرف میانگین چهار تکرار ± انحراف معیاری است.

## بحث

ماده در گیاهان عالی دارای پوشش‌هایی هستند و ترشحات آن‌ها باعث پذیرش و جذب ذرات معلق در هوا می‌شود.

با توسعه روزافزون کاربردهای صنعتی نانوذرات، نگرانی‌ها در مورد سرنوشت زیست محیطی و اثرات بیولوژیکی این ذرات تشدید شده است (۱۸، ۱۷). اندامهای تولید مثلی نر و



شکل ۱۰- اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آلومینیوم (۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ گرم بر لیتر) بر زیست‌پذیری دانه‌های گرده.

و به نظر می‌رسد در تمامی اعضای این تیره صفتی ثابت باشد. این خمیدگی، مانند سایر لگوم‌ها، ناشی از رشد نابرابر در ناحیه فونیکولی است (۲۳). پس از تشکیل پریموردیوم تخمکی، پوسته‌های تخمک شکل می‌گیرند که تشکیل آن‌ها حالت قرینه ندارد و پوسته‌ای که در جهت خمیدگی تخمک قرار دارد از رشد بیشتری برخوردار است. تخمک‌ها دوپوسته‌ای هستند و طبق گفته بومن (۱۹۷۴) پوسته بیرونی تخمک در Fabaceae منشا زیرپوستی دارد. ترتیب رشد و نمو دو پوسته در Fabaceae بسیار متغییر است. به طوری که در برخی گیاهان رشد پوسته درونی و در برخی رشد پوسته بیرونی مقدم‌تر است (۲۴). در گیاه مورد بررسی ما، پوسته بیرونی رشد سریع‌تری دارد. از جمله صفات حائز اهمیت تخمک تعداد لایه‌های تشکیل‌دهنده پوسته‌ها می‌باشد؛ در اغلب افراد خانواده Fabaceae پوسته درونی از دو لایه تشکیل شده است و پوسته بیرونی معمولاً از چندین لایه تشکیل شده است (۲۵). در گیاه مورد بررسی ما پوسته درونی شامل دو لایه و پوسته بیرونی از چهار تا پنج لایه تشکیل

اندازه این ذرات به قدری کوچک است که به درون کیسه‌های گرده و تخمک نفوذ می‌کنند. تخمک از طریق کلالة و مجرای ترش‌خی خامه که محل جذب دانه گرده است در معرض آلودگی با ذراتی با ابعاد چند میکرون هست. از طرفی، دانه‌های گرده با یک پوشش درونی و بیرونی دارای منافذی هستند که برای تسهیل رشد لوله گرده و انتقال سلول زایشی به تخمک تعبیه شده‌است و بدین طریق ذراتی با ابعاد چند نانومتر توانایی جذب به دانه گرده را پیدا می‌کنند (۱۹).

مطالعات میکروسکوپی این پژوهش نشان داد مراحل نمو تخمک در گیاه لوبیا الگوی مشابهی با الگوی توصیف شده توسط بووا (۱۹۸۹) در اغلب گیاهان دولپه دارد (۲۰، ۲۱). تکوین تخمک اهمیت بسیار مهمی در بقای گیاه دارد. به طوری که هر نوع اختلال در آن باعث کاهش تولید دانه‌ها و به خطر افتادن بقای گیاه می‌شود. بر اساس بررسی‌های ما تخمک در گیاه لوبیا از نوع واژگون است که با گزارش جوهنسون و والز (۱۹۹۴) در مورد باقلا مطابقت دارد (۲۲)

(۲۸). در نمونه ما این سلول موقعیت بنی یا اپی شالازی دارد که بعد از تحلیل سه سلول دیگر حاصل از میوز، به سمت سفت مهاجرت می‌کند.

در نمونه بررسی شده، کیسه رویانی متشکل از هفت سلول شامل: سلول تخم، دو سلول قرینه، سلول مرکزی و سه سلول متقاطع می‌باشد. در واقع کیسه رویانی از نوع علف هفت بند است. این نوع از کیسه رویانی در این خانواده عمومیت دارد (۲۹). در جریان نمو کیسه رویانی ابتدا کیسه رویانی دوهسته‌ای و سپس به ترتیب چهار وهشت هسته‌ای تشکیل می‌شود و در نهایت جداریندی صورت می‌گیرد. هسته‌های کیسه رویانی به صورت دو سلول کناری قرینه و یک تخمزا مرکزی در قطب سفتی، دو هسته در مرکز کیسه رویانی و سه متقاطع در قطب شالازی آرایش می‌یابند که متقاطرها خیلی زود تحلیل می‌روند که با یافته‌های جوهنسون و والز (۱۹۹۴) در مورد باقلا مطابقت دارد (۲۲).

**تکوین پرچم در نمونه‌های شاهد:** بررسی مراحل تکوین پرچم در لوبیا نشان می‌دهد که تکوین پرچم ها بسیار سریع است. پرچم‌های حلقه اول زودتر و پرچم‌های حلقه دوم کمی با تاخیر تشکیل می‌شوند؛ اما در نهایت پرچم‌ها به هم پیوسته و تشکیل ۹ پرچم بهم پیوسته و یک پرچم آزاد را می‌دهند (۳۰). داویس (۱۹۶۶) در خصوص تشکیل لایه‌های دیواره بساک مطالعات فراوانی انجام داد و بر اساس ترتیب مراحل تقسیم سلولی دو تیپ اصلی را معرفی کرد (۳۱). تشکیل لایه‌های مختلف پرچم و سلول-های هاگزا در لوبیا از تیپ پایه‌ای داویس پیروی می‌کند. بدین صورت که سلول‌های لایه جداری ثانویه درونی بدون تقسیم جدید لایه تاپی یا پرستار را بوجود آورده، در حالیکه لایه جداری خارجی ابتدا به صورت مماسی تقسیم شده و دو لایه جدید تشکیل می‌دهد که لایه خارجی مکانیکی و لایه درونی سلول‌های میانی را بوجود می‌آورند.

شده است. مطالعات بر روی کنترل ژنتیکی و مولکولی نمو تخمک نشان می‌دهد که دو پوسته تخمک خاستگاهی مستقل از یکدیگر دارند و این مسئله می‌تواند گوناگونی فراوان موجود برای ساختار این لایه‌ها را توجیه کند (۲۶).

در برخی دو لپه‌ای‌ها اپیدرم داخلی پوسته، تبدیل به بافت ترش‌حی به نام اندوتلیوم یا لایه مغذی پوسته می‌شود. اندوتلیوم در بسیاری از تخمک‌هایی که بافت خورش در مراحل ابتدایی رشد آن‌ها از بین می‌رود، تشکیل یک لایه محدود کننده را می‌دهد. این سلول‌ها با داشتن هسته‌های درشت، اندازه سلولی بزرگ و فراوانی اندامک‌هایشان احتمالاً دارای نقش موثری در انتقال مواد غذایی به درون کیسه رویانی هستند. لایه کوتیکولی که بین آندوتلیوم و کیسه رویانی وجود دارد؛ در مرحله پیش رویانی دچار شکستگی می‌شود. این لایه احتمالاً از جریان مواد غذایی به درون کیسه رویانی و رویان، در مراحل ابتدایی رشد ممانعت می‌کند (۲۷). در تمام نمونه‌های مورد بررسی ما این لایه تشکیل می‌شود و یک لایه پایدار به نظر می‌رسد اما در *Vicia faba* آندوتلیوم وجود ندارد و پوسته داخلی و سایر بافت‌های مادری، در مراحل ابتدایی رشد و نمو رویان از بین می‌روند (۲۸).

در گیاه مورد بررسی ما نیز مانند سایر اعضا Fabaceae تخمک از نوع پر خورش است (۲۹). در گیاه لوبیا موقعیت سلول مگاگامتوسیت در لایه چهارم می‌باشد. مطالعه بر روی مگاسپورانژ Fabaceae نشان می‌دهد که شکل تترادها در این خانواده بسیار متنوع است. به گونه‌ای که در اغلب مطالعات انجام شده بر روی اعضا این خانواده تترادها به صورت خطی گزارش شده‌اند که از آن جمله می‌توان به *Glycine max* اشاره کرد (۳۰). در نمونه مورد بررسی ما نیز تتراد اغلب از نوع خطی بود.

موقعیت مگاسپور فعال نیز بسیار متغییر است و ممکن است در موقعیت سفتی، بنی یا زیربنی باشد. در گونه *Vicia faba* موقعیت مگاسپور فعال اپی شالازی است

مشابه گیاهان شاهد است اما تفاوت‌هایی در مراحل بلوغ دانه‌های گرده مشاهده شد. در بررسی‌های انجام شده بر روی مراحل مختلف تکوین تخمک در گیاه لوبیا هیچ ناهنجاری رویت نشد. درحالی که سایر آلاینده‌های زیستی سبب بروز انواع مختلف ناهنجاری‌ها در سایر گیاهان شده است. از جمله این تغییرات می‌توان به تغییر در مراحل تکوین تخمک و کیسه‌رویانی، تغییر شکل تخمک و کاهش تعداد آن‌ها، واکوئل شدن سلول‌های بافت خورش و مرگ سلولی، تحلیل هسته‌ها در کیسه رویانی و تخریب سریع دستگاه تخمزا اشاره کرد (۳۰، ۳۳).

مشخص شده است که در بین سلول‌های مختلف گیاهان، گرده‌ها به میزان بیشتر به آلاینده‌های مختلف حساس هستند و جوانه‌زنی گرده‌ها و رویش لوله گرده در آن‌ها بر اثر عناصر سنگین مختلف ممانعت می‌شود، به نحوی که کشت آزمایشگاهی لوله‌های گرده به عنوان یک سیستم استاندارد حساس برای بررسی میزان سمیت عناصر سمی مختلف در سطح سلولی استفاده می‌شود (۳۴، ۳۳).

در بررسی‌های حاضر انجام شده بر روی دانه‌های گرده گیاهان تحت تیمار، برهم خوردن آرایش تترادها رویت شد که با مطالعات چهرگانی و همکاران (۲۰۰۶) تحت تیمار شبیه باران اسیدی در گیاه لوبیا هم‌سو می‌باشد (۲۹). برخی پژوهشگران مشاهده کردند که نانوذره سدیم اکسید و آهن اکسید نسبت به بار الکتریکی خود در سلول‌های پستانداران مکان یابی متفاوتی دارند (۳۴). بنابراین به نظر می‌رسد نانوذره اکسید آلومینیوم با تاثیرگذاری بر روی تشکیل دیواره سلولی و استقرار بارهای الکتریکی بر روی سطح دانه‌های گرده منجر به برهم خوردن آرایش تترادها می‌شود.

همچنین در بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، افزایش ضخامت در لایه ایتتین مشاهده شد که با مشاهدات چهرگانی و همکاران (۲۰۰۶) در مورد تاثیر تیمار شبیه باران اسیدی بر نمو دانه‌های گرده لوبیا مطابقت دارد (۲۹).

سلول‌های تاپی که داخلی‌ترین لایه بساک را تشکیل می‌دهند، به دو نوع ترش‌چی و پلاسمودیال تقسیم می‌شوند که هر دو نوع آن در بساک لوبیا وجود دارد (۳۰). در نمونه مورد بررسی ما تاپی از نوع تک هسته‌ای است. در مراحل اولیه نمو بساک، پریموردیوم بساک به صورت یک مریستم احاطه شده در اپیدرم است. سپس چهار برجستگی در چهار گوشه بساک مشخص می‌شود. در هر کدام، یک یا چند سلول زیراپیدرمی به سلول‌های آرکتوسپور تمایز می‌یابند. تقسیمات مماسی متوالی سلول آرکتوسپور و سلول‌های حاصل از آن موجب تشکیل دیواره میکروسپورانزاها و بافت هاگزا می‌شود (۳۲). این روند مطابق وضعیت موجود در اکثر گیاهان گلدار می‌باشد (۲۰).

تقسیم میوز انجام گرفته و چهار میکروسپور تشکیل شده حفظ می‌شوند. سیتوکینز در سلول مادر گرده از نوع همزمان می‌باشد که الگوی موجود در اکثر نهاندانگان دولپه‌ای است (۱۵). اطراف هر میکروسپور را دیواره آگزین فرا می‌گیرد؛ این دیواره ابتدا پلی‌ساکاریدی و سپس اسپوروپولینینی می‌شود. همزمان با آزاد شدن میکروسپورها، دیواره دوم یعنی ایتتین در داخل آگزین تشکیل می‌گردد. تشکیل آگزین و ایتتین وابسته به سلول‌های تاپی است و با استفاده از مواد و محتویات آن‌ها صورت می‌گیرد. آرایش میکروسپورها در داخل دیواره کالوزی از نوع تتراهدراک است. دانه‌های گرده جوان رشد می‌کنند، واکوئل در آن‌ها بزرگ می‌شود، هسته تقسیم شده و گرده‌های بالغ دارای دو هسته را به وجود می‌آورند. سلول بزرگ‌تر یا سلول رویشی، هسته پخش و غیرمتراکم و سلول کوچک‌تر و یا سلول زایشی هسته دوکی شکل و متراکم دارند. دانه‌های گرده بالغ دارای سه منفذ رویشی و محتویات ذخیره‌ای از نوع نشاسته و لیپید هستند (۳۰).

### بررسی نتایج حاصل از مطالعات تکوینی گیاهان تحت تیمار

مراحل کلی تکوین تخمک و پرچم در گیاهان تحت تیمار

مورفولوژیکی دانه‌های گرده، آسیب‌های غشای سلولی، مبادله یونی با کلسیم دیواره و در نهایت آسیب به رشد لوله گرده می‌شوند. دانه‌های گرده و سلول‌های گیاهی سرب را جذب کرده و طی واکنش‌های مبادله یونی، سرب در دیواره جایگزین کلسیم می‌شود و این جایگزینی مانع رشد لوله گرده می‌شود. در ممانعت رشد لوله گرده، تاثیر نانوذره سرب بیشتر از فرم محلول است زیرا میزان جذب ذرات در فرم نانوذره بیش از فرم محلول است (۳۶).

مطالعات خان و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که هر دو نانوذره تیتانیوم اکسید و روی اکسید مشابه فرم محلول خود، باعث یک همولیز وابسته به غلظت در سلول‌های خونی انسان می‌شوند. به نظر می‌رسد که مکانیسم اصلی سمیت نانوذرات از طریق تنش‌های اکسیداتیو بروز می‌کند (۳۷). همچنین مطالعات بر روی سمیت ژنتیکی نانوذره تیتانیوم اکسید بر روی مریستم راسی ریشه در پیاز و تنباکو الگویی از نسبت افزایش آسیب‌های DNA نسبت به افزایش غلظت نانوذرات را نشان می‌دهند. این نتایج نشان می‌دهند که آسیب‌های DNA وابسته به غلظت نانوذرات هستند (۳۷).

امروزه مکانیسم دقیق سمیت نانوذرات کشف نشده است اما به نظر می‌رسد، ارتباط نزدیکی با ترکیب شیمیایی، ساختار، اندازه و افزایش سطح نانوذرات دارد. در کل، سمیت نانوذرات به دو صورت ممکن است بروز کند: ۱- سمیت شیمیایی که بر اساس ترکیبات شیمیایی بروز می‌کند. مثل تاثیر یون‌های آزاد شده و ۲- تنش‌هایی که وابسته به سطح، اندازه و یا شکل سلول است (۳۸).

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ای مراحل تکوین تخمک و دانه‌های گرده در گیاهان شاهد و تحت تیمار با نانوذره اکسید آلومینیوم صورت گرفت. نتایج مطالعه تاثیر نانوذره اکسید آلومینیوم بر مراحل نمو دانه‌های گرده به ویژه مراحل بلوغ آن‌ها را ثابت کرد. نانوذرات

بار نانوذرات مانع تشکیل سیتوپلاسم دانه‌های گرده می‌شود. همچنین نسبت به بارشان، نانوذرات ممکن است روی تشکیل دیواره هم تاثیرگذارند. در واقع، نسبت به بارذرات ظرفیت مکان یابی آن‌ها متفاوت است (۳۶). بنابراین، پیشنهاد ما این است که بار نانوذره اکسید آلومینیوم منجر به افزایش ضخامت دیواره ایتین می‌شود.

در نمونه‌های مورد بررسی در این مقاله کاهش زیست-پذیری دانه‌های گرده در گیاهان تحت تیمار نانوذره اکسید آلومینیوم رویت شد. همچنین کاهش در زیست‌پذیری دانه‌های گرده و افزایش در دانه‌های گرده نارس تحت تاثیر تیمار نانوذره آهن در گیاه آرابیدوپسیس نیز گزارش شده است (۱۴). در بررسی‌های صورت گرفته بر روی دانه‌های گرده گیاه آرابیدوپسیس تحت تیمار نانوذره آهن کاهش ۵۰ درصدی در رشد لوله گرده رویت شد. با توجه به کاهش در زیست‌پذیری و رشد لوله‌گرده، پیشنهاد شده است که بار نانوذرات اثر منفی روی ظرفیت تولیدمثلی گیاهان می‌گذارد (۱۴).

پوبوریلوا و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی‌های خود مشاهده کردند که نانوذره آلومینیوم توانایی تجمع و ایجاد پیوند با سایر ترکیبات مثل اسیدهای آلی و پپتیدها را دارد و حتی می‌تواند در مبادلات یونی شرکت کند. همچنین نشان داده شده است که اسکلت سلولی تحت تاثیر یون‌های آلومینیوم قرار گرفته و از این طریق روی بسیاری از فرایندهای سلولی مثل تقسیم سلولی اثر دارند و می‌توانند از طریق القای تکثیر سلولی غیر قابل کنترل، اثر سمی خود را اعمال کنند (۳۵).

در مطالعات انجام شده بر روی دوفرم محلول سرب کلرید و نانوذره سرب، سمیت متفاوتی مشاهده شد. این مشاهدات این‌گونه توصیف شدند که دانه‌های گرده و سلول‌ها سرب را به صورت نانوذره بیش از فرم محلول سرب کلرید انباشته می‌کنند. تعدادی از اثرات بیولوژیکی سرب در این‌جا توصیف شده‌اند که شامل: تغییرات



تحت تیمار می‌شوند. اما تیمارهای انجام شده بر مراحل تکوین تخمک موثر واقع نشد.

اکسید آلومینیوم منجر به افزایش ضخامت انتین، بی‌نظمی در آرایش تترادها و کاهش زیست‌پذیری در دانه‌های گرده

## منابع

۱. علمی ح، سلطانی‌نژاد ر، باقی‌زاده ا. بررسی تاثیر ریزذرات اکسید-روی و اکسیدمس بر جوانه‌زنی و صفات ریخت‌شناسی گیاهچه شیرین‌بیان، *Glycyrrhiza glabra* L. اولین همایش بین‌المللی تنش‌های گیاهی (غیرزیستی). ۱۳۹۱. دانشگاه اصفهان.
۲. کمالی م، رستمی ع ا، محسنی کوچصفهانی ه. سمیت سلولی نانوذرات در محیط *in vitro*. تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی- A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Sci. Total Environ. 2009. 407(4): 1461-1468 .
3. Zhu H, Han J, Xiao J Q, Jin Y. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. J. Environ. Monit. 2008. 10(6):713-717 .
4. Zhu X, Zhu L, Duan, Z, Qi R, Li Y, Lang Y. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. J. Environ. Sci. Heal., Part A. 2008. 43(3): 278-284.
5. Dietz K J, Herth, S. Plant Nanotoxicology. Trends Plant Sci. 2011. 16(11): 582-589 .
6. Yu S, Rui Q, Cai T, Wu Q, Li Y, Wang D. Close association of intestinal autofluorescence with the formation of severe oxidative damage in intestine of nematodes chronically exposed to Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-nanoparticle. Environ. Toxicol. Pharm. 2011. 32(2): 233-241 .
7. Sadiq I M, Pakrashi S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. J. Nanoparticle Res. 2011. 13(8): 3287-3299 .
8. Dabrunz A, Duester L, Prasse C, Seitz F, Rosenfeldt R, Schilde C, Schulz R. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO<sub>2</sub> nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. PLOS One. 2011. 6(5): online published.
9. Armelao L, Barreca D, Bottaro G, Gasparotto A, Maccato C, Maragno C, Mahne, D. Photocatalytic and antibacterial activity of TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> nanosystems. Nanotechnology. 2007. 18(37).
10. Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, Kahru
11. Franklin NM, Rogers NJ, Apte, SC, Batley GE, Gadd, GE, Casey PS. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO , Bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. Environ. Sci. Technol. 2007. 41(24): 484-8490 .
12. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollution. 2007. 150(2): 243-250.
13. Yang L, Watts DJ. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. Toxicol. letters. 2005. 158(2): 122-132 .
14. Bombin S, Lefebvre M, Shenwood J, Xu Y, Bao Y, Ramonell KM. Developmental and Reproductive Effects of Iron Oxide Nanoparticles in *Arabidopsis thaliana*. Inter. J. Molecular Sci. 2015. 16: 24174-24193.
15. Tanaomi N, Jonoubi P, Chehregani Rad A, Majd A, Ranjbar M. Embryology of *Onobrychis persica* Sirj. and its systematic implications. Cayologia. 2016. 69: 256-266.
16. Shirkhani Z, Chehregani Rad A, Gholami M. Effects of Cadmium on floral organ and gametophyte development in *Datura stramonium* L. Braz. J. Bot. 2020. (Online Published)
15. Shamrov I. Ovule classification in flowering plants- new approach and concepts. Botanische Jahrbucher fur Systematik.1998. 120: 37- 44..

16. Ghahraman A. Iranian's Chromophyts (Plant systematic) Tehran: University Publishing Center; 1993; 504-505.
18. Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, et al. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*. 2003; 164(3): 317-22.
19. Holleman A, Wiberg E. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Berlin: Springer. 1985.
20. Ruzin SE. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford New York: Oxford University Press. 1999.
21. Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E. The Neurotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicol*. 2008; 17: 315-25.
22. Monica RC, Cremonini R. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 2009.62(2): 161-165
23. Chichiricò G, Poma A. Penetration and Toxicity of Nanomaterials in Higher Plants. *Nanomaterials*. 2015. 5. 851-873.
24. Buvat R. *Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plant*. Springer-verlag. 1989.
25. Johansson M, Walles B. Functional anatomy of the ovule in broad bean (*Vicia faba*): ultra structural seed development and nutrient pathways. *Ann. Bot.* 1994. 74: 233-244.
26. Arrudo SCC, Silva ALD, Galazzi RM, Azevedo RA, Aruda MAZ. Nanoparticle applied to plant science. *Talanta*. 2015. 131: 693-705. 3. Zhu H, Han J, Xiao J Q, Jin Y. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J. Environ. Monit*. 2008. 10(6).713-717 .
27. Bouman F, Boesewinkel F. the campylotropous ovules and seed: their structure and functions. *Botanische Jahrbuche Fursystematik*. 1991. 113: 255-270.
28. Copper DC. Macrosporogenesis and embryology of *Mellilotus*. *Botanical Gazette*. 1993. 95: 143-155.
29. Schneitz K, Balasubramanian s, Schiefthaler U. Organogenesis in plant: the molecular and genetic control of ovule development. *Trends Plant Sci*. 1998. 3: 468-472.
30. Chehregani A, Tanaomi N. Ovule ontogenesis and megagametophyte development in *Onobrychis schahuensis* Bornm. (Fabaceae). *Turk J Bot*. 2010. 34. 241-248.
31. Majed A, Chehregani A. Studies on developmental process in ovules of Soja *Glycine max* plants and effects of certain toxin and environmental pollutants. *Acta Horticulture*. 1992. 319: 431-436.
32. Mitchell JP. Megasporogenesis and microsporogenesis in *Vicia faba*. *Can. J. Bot*. 1975. 53: 2804-2812.
33. Chehregani A, Malayeri EB, Kavianpour F. Effect of acid rain on the development structure and viability of pollen grain. *Pak. J. Biol. Sci*. 2006. 6: 1033-1036.
34. Davis G. *Systematic Embryology of the Angiosperms*. John Wiley & Sons. Ltd. 1996. New York. London. Sydney.
35. Speranza A, Leopold K, Aaire M, Taddei AR, Scocciati V. Pb nanoparticles cause increased toxicity of Kivifruite pollen compared to soluble Pb (II). *Environ Pol*. 2010. 158: 873-882.
36. Khan M, Naqvi AH, Ahmad M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potential of ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicol. Reports*. 2015. 2: 762-774.
37. Kristen U, Hoppe U, Pape W. The pollen tube growth test: a new alternative to the Draize eye irritation assay. *J Soc Cosmet Chem*. 1993; 44: 153-162
38. Poborilova Z, Opatrilona R, Babula P. Toxicity of aluminum oxide nanoparticle demonstrated using By-2 plant cell suspension culture model. *Environ. Exp. Bot*. 2013. 91: 1-11.

## Effect of aluminum oxide nanoparticle on sporogenesis and gametophyte development in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Chehregani Rad A.K. \*, Moatabarniya S. and Jafari Anvari M.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

### Abstract

The purpose of the study was to determine the exact developmental stages of reproductive organs and to survey the effects of Aluminum oxide nanoparticles on different developmental stages of ovule, embryo sac, stamen and pollen grains in bean plants as one of the main sources of food in the world. Bean seeds were cultured in greenhouse conditions and treated with Aluminum oxide nanoparticles in different concentrations (0.1, 0.01, 0.001 g/l). Flowers and buds were collected, in different sizes, and fixed in a FAA, dehydrated, embedded in paraffin and sliced with a rotary microtome. The staining was carried out using Hematoxylin-Eosin. The samples were studied by light microscope and photographed. The results showed that in control plants, different developmental stages were similar to the prior reports. Ovule was anatropous, embryo sac was of polygonum type, and tetrad arrangement was often linear, and sometimes T-shaped. Anther was tetrasporangiate, tetrad arrangement was tetrahedral, and tapetum was of secretory type at beginning and plasmodial at the late developmental stages. Pollen grains were spherical to ovular shaped. Results showed that the treatments did not affect the development of ovule, but caused a decrease in pollen viability and increased the thickness of the intine layer. Irregularities in tetrad arrangement and structure of pollen grains were some effects of treatment by Aluminum oxide nanoparticles.

**Key words:** nanoparticles, aluminum oxide, ovule, pollen grains, development