مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد پنجم، شماره اول، ۱۳۹۶
۳۳-۴۸
www.jcri.ir

بررسی ریزریخت‌شناسی و تشریحی ساختار بذر در دو رقم پنبه و اهمیت کاربرد آنها

مریم کلاهی[1*]، الهام فغانی[2]، صادق قیصری[3]

[1]استادیار گروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
[2]استادیار، موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.
[3]دانشجوی گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۲

چکیده

مطالعه خصوصیات ریز ریخت‌شناسی و تشریحی بذرها طیف گسترده‌ای از ویژگی‌هایی را ارائه می‌دهد که نقش مهمی در بررسی کیفیت بذر و شناسایی ریزریخت‌شناسی ارقام مختلف را فراهم می‌کنند. سلامت بخش‌های تشکیل‌دهنده بذر، برای جوانه‌زدن و تولید محصول مطلوب، همواره لازم و ضروری است. هدف از این مطالعه مقایسه ساختار تشریحی رویان و بذر دو رقم پنبه (لطیف و گلستان) و اهمیت کاربرد این ویژگی‌ها در زمان کاشت و افزایش عملکرد پنبه بود. در این مطالعه بذرهای هر دو رقم از نظر ویژگی‌های مورفومتری بررسی شدند. ساختار تشریحی درونی و ساختار بذرها بعد از مراحل آماده سازی و برش‌گیری با دستگاه میکروتوم به روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ نوری و فلورسنت مطالعه شدند. نتایج این بررسی نشان داد که بذر رقم گلستان سطح، قطر، نسبت اقطار، فاکتور شکل، فاکتور گردی و وزن هزار دانه بیشتری داشت. در رقم گلستان مریستم‌ها کاملا شکل گرفته‌اند و پرومریستم‌ها در منطقه هیپوکوتیل نسبت به رقم لطیف توسعه یافته‌ترند. در هر دو رقم، سلول‌های کلرانشیم اسفنجی و نردبانی مزوفیل متمایز شده‌اند اما این سلول‌ها در رقم گلستان نمو بیشتری داشتند. در رنگ‌آمیزی تولوئیدن برای شناسایی ترکیبات فنلی، ساختار حفره ترشحی در بذرهای گلستان نسبت به رقم لطیف رنگ‌پذیری بالایی داشتند. میکروسکوپ فلورسنت، حضور فراوان ترکیبات فلوروسنت را در ساختار بذر نشان داد. در نهایت می‌توان بیان داشت که رقم گلستان به سبب بلوغ زودرس رویان و درصد جوانه زنی بیشتر، در شرایط یکسان می‌تواند درصد سبز بیشتری نسبت به رقم لطیف داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: بذر پنبه، تشریح، ریخت‌شناسی، گلستان، لطیف.

*نویسنده مسئول: m.kolahi@scu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

از دیرباز، یکی از مشکلات عمده جداسازی بذرهای با کیفیت مطلوب از بذرهای نامطلوب، زنده‌مانی بهتر، جوانه‌زنی بیشتر، تولید گیاه‌چه طبیعی و سالم با عملکرد بالا بوده است (برلی، ۲۰۰۵). بارتی و کریگ در ۱۹۷۲ گزارش کردند که زنده‌مانی پایین و دیررسی گیاه در عملکرد نقش زیادی ندارد در حالی که از کیفیت محصول می‌کاهد. از سوی دیگر کریگ و همکاران در ۱۹۸۹ گزارش کردند که جوانه‌زنی بالقوه و نمو دانه‌رست، برای افزایش عملکرد و بازده محصول بسیار مهم است. برلی (۲۰۰۵) نیز اظهار داشت که تفکیک بذرها بر اساس عوامل فیزیکی از جمله اندازه، وزن و تراکم بذر، در بهبود کیفیت بذر موثر هستند. کشت بذرهای باکیفیت کم، نه تنها جوانه‌زنی، سبز شدن و استقرار گیاه را تحت تاثیر قرار داده بلکه در بروز بیماری نیز موثر است (برلی، ۲۰۰۵).

همواره سلامت بخش‌های تشکیل دهنده‌ی بذر، برای جوانه‌زدن و تولید محصول مطلوب، لازم و ضروری است. بذر پنبه به‌منظور جدا کردن سه فرآورده روغن، پوسته (کرک‌ها) و مصرف غذایی دارای اهمیت است. به‌منظور دستیابی به بازده عملکرد مطلوب در مزرعه سلامت بخش‌های تشکیل دهنده‌ی بذر در مرحله سبز شدن پنبه و رشد طبیعی گیاهچه‌ها اهمیت دارد. بررسی‌ها نشان داده است که عدم توانایی بذر در تولید گیاهچه طبیعی در مزرعه، به‌واسطه ویژگی‌های خاص ساختاری آنهاست که تحت شرایط نامساعد، فرایندهای فیزیولوژیک حیاتی جوانه‌زنی را ممانعت می‌کنند و یا به تأخیر می‌اندازند (بیلالوی و همکاران، ۲۰۱۵). استفاده از بذرهای مرغوب می‌تواند به افزایش برداشت در سطح مزارع منجر شود، از طرف دیگر استفاده از بذور نامناسب منجر به حجم بالای بذر مورد استفاده می‌شود که مشکلات اقتصادی را در پی خواهد داشت. ساختار بذر گیاهان توسط محققین مختلف بررسی شده‌است اما اطلاعات دقیق در مورد مناطق مختلف رویانی و پوسته بذر پنبه گزارش نشده‌است.

مطالعات دقیق ساختار این مناطق برای تفسیر برخی از مراحل فیزیولوژی جوانه‌زنی بذر اهمیت دارد (پاول، ۲۰۱۰). بذر پنبه بالغ در یک پوسته نسبتاً سخت پوشیده شده‌است (پایزیو، ۲۰۰۶). از این‌رو مطالعات محدودی در ارتباط با ساختار بذر پنبه صورت گرفته است (بلالوی، ۲۰۱۵؛ پازیو، ۲۰۰۶؛ خانگ، ۲۰۱۵). زنده‌مانی، خواب بذرها، القا خواب و زوال بذرها از مشکلات عمده جوانه‌زنی بذرها محسوب می‌شوند. جوانه‌زنی تحت تأثیر عواملی از جمله کیفیت ذاتی رویان، آناتومی پوشش بذر (بر شکستن پوسته بذر در زمان جوانه‌زنی تأثیر می‌گذارد)، ساختار مکانیکی و شیمیایی پوشش بذر (موثر بر نفوذپذیری بذر)، نفوذپذیری غشای بذر به آب و دیگر مایعات، ممانعت از نفوذ اکسیژن بوسیله غشاءها یا پوسته (نفوذناپذیری پوسته بذر به اکسیژن) بذر متغیر است (بنسینک و کورنف، ۲۰۰۸).

آناتومی بذر بالغ پنبه در رقم‌های مختلف، تفاوت‌هایی دارند (پایزیو، ۲۰۰۶). به همین دلیل روش‌های فلورسنت جهت مطالعه جزئیات تشریحی گیاهان و ویژگی مواد ساختاری آنها مورد توجه

Archive of SID

www.SID.ir

قرار گرفته است. فلورسنت مرئی (۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر) سلول‌های زنده؛ تحت عنوان اتوفلورسنت توسط نورهای ماوراء بنفش، بنفش یا آبی تحریک شده و توسط میکروسکوپ لومینسانس قابل مشاهده است (تیلور و سالمون، ۱۹۸۹ و اندرسون و همکاران ۱۹۹۸). اتوفلورسنت‌ها ترکیبات سلولی تحریک شده هستند که به واسطه مشارکت ترکیبات فلورسنت در بخش‌های مختلف سلولی قابل مشاهده اند (ولف بیس، ۱۹۸۵). ترکیبات فلورسنت در انواع موجودات زنده قابل مشاهده هستند، از ترکیبات فلورسنت موجود در گیاهان و قارچ‌ها می‌توان به سلولز اشاره کرد. سلولز در حداکثر طول موج ۴۳۰-۴۲۰ نانومتر، فلورسنت نور آبی قابل مشاهده است. در سلول‌های گیاهی شناخته شده‌ترین فلوئوروفور برای تشخیص، کلروفیل با حداکثر طول موج ۶۷۵ تا ۶۸۰ نانومتر می‌باشد (آگاتی، ۱۹۹۸). اتوفلورسنت می‌توانند در بررسی ریز آنالیزهای متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های ترشحی بدون فرایندهای بیوشیمیایی طولانی، تشخیص تخریب سلولی و تشخیص برهم‌کنش‌های بین سلولی مورد استفاده قرار گیرند (رش چینا و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۰۹، ۲۰۱۱).

پدیده اتوفلورسنت به‌عنوان یک ابزار غیرمخرب برای تجزیه میکروسکوپی موجودات زنده قابل استفاده می‌باشد، همچنین می‌توانند در فرایندهای تشخیصی مختلف برای بیولوژی سلول، اکولوژی، فارماکولوژی و پزشکی کاربرد داشته باشد (وال دسساس و آباد، ۲۰۱۱)

ارقام مورد مطالعه شامل رقم لطیف و گلستان از گونه *Gossypium hirsutum* L. بود. رقم لطیف دارای ویژگی‌های زراعی مناسب از جمله زودرسی، پتانسیل غوزه‌دهی و عملکرد مطلوب، کیل مناسب، تحمل به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی و برخی آفات پنبه می‌باشد. تعادل رشد رویشی، زودرسی و همزمان‌رسی این رقم نسبت به سایر ارقام، در مدیریت مطلوب این محصول و کاهش هزینه‌های برداشت، موثر است (عالیشاه، ۲۰۱۴). رقم گلستان، از ارقام زودرس با پتانسیل عملکرد بالا است که دارای خصوصیات مطلوبی از جمله عملکرد مناسب، زودرسی، فرم کوتاه و جمع و جور و کیفیت الیاف مناسب می‌باشد. لذا در سیستم‌های کشت متعارف و کشت دوم (پس از برداشت غلات و کلزا) با پتانسیل عملکرد بیش از ۵ تن در هکتار مناسب می‌باشد (عالیشاه و میری، ۲۰۱۰).

بذر این دو رقم، که بدلیل دارا بودن خصوصیات کمی و کیفی جهت مطالعه ویژگی‌های تشریحی، ریخت‌شناسی و ساختاری انتخاب شدند. با توجه به اهمیت خصوصیات ساختار بذر پنبه در فرآیند کرک‌زدایی، ساختار بذر و جنین در این دو رقم (لطیف و گلستان) پنبه مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

روش کار

به‌منظور مطالعه مقایسه‌ای خصوصیات ریخت‌شناسی و تشریحی بذور پنبه، دو رقم لطیف و گلستان، نمونه‌گیری از آزمایشات مزرعه‌ای ایستگاه کارکنده مؤسسه تحقیقات پنبه کشور در سال

Archive of SID

www.SID.ir

۱۳۹۴ صورت گرفت. نمونه‌ها توسط فرمالین استیک الکل[1](FAA) و فرمال کلسیم[2] در دمای پایین (°C ۴) تثبیت شدند و پس از آبگیری[3] و شفاف‌سازی[4] جهت به‌دست آوردن استحکام کافی برای برش‌گیری در پارافین قرار گرفتند. در این تحقیق، ساختار بذر، جنین و لپه‌های بالغ بررسی شدند. برش‌هایی به ضخامت ۱۰ میکرومتر توسط میکروتوم مدل LEICL تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی توسط گزیلول و آبدهی داخل حمام‌های متوالی از اتانول با درجات مختلف، لام‌های حاوی نوارهای پارافینی جهت رنگ‌آمیزی با معرف‌های خاص آماده شدند. جهت تسریع پارافین‌زدایی، لام‌ها قبل از قراردادن در گزیلول، تا شفاف شدن پارافین، حرارت داده‌شدند (بندیکت، ۲۰۱۵).

جهت مطالعات بافت‌شناسی ساختار درونی بذرها، از روش‌های هماتوکسیلین – ائوزین (وی.ای، ۱۹۶۲)، سافرانین-فست‌گرین (برلین، ۱۹۷۶) (برلین و میکسشی، ۱۹۷۶)، کارمن زاجی- متیل بلو، شناسایی سلولز (جنسین، ۱۹۶۲)، شناسایی پکتین (جنسین، ۱۹۶۲)، شناسایی لیپیدها با روش رنگ‌آمیزی با معرف سودان سیاه B[5] (گاهان، ۱۹۸۴)، شناسایی ترکیبات فنلی با روش فدر و ابرین (فدر و ابرین، ۱۹۶۸) و شناسایی پروتئین‌ها با روش کوماسی برلیانت بلو صورت گرفت. پس از تهیه لام، توسط میکروسکوپ نوری مدل Olympus Labomed TC400 مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت. همچنین به‌منظور بررسی ساختار تشریحی بذر، نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مدل Olympus Labomed TC400 مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از رنگ‌آمیزی و تهیه لام، بررسی‌های بافت‌شناسی و تشریحی صورت گرفت. بذرها توسط ترازو بر حسب میلی‌گرم توزین گردیدند. علاوه بر این، ویژگی‌های مورفومتری بذرهای هر دو رقم از نظر طول، سطح و محیط بذر توسط کولیس و خط‌کش دقیق بررسی شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS براساس آزمون LSD، میانگین ± انحراف معیار تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری در سطح $p< ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

با توجه به اهمیت سلامت بذر در رشد و نمو گیاه، مطالعه ساختار بذر دو رقم لطیف و گلستان مورد توجه قرار گرفت. نتایج این پژوهش بیانگر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ساختاری و بافت‌شناسی این دو رقم بذر پنبه بود. مقایسه مورفومتری بذر دو رقم گلستان و لطیف در صفات مورد مطالعه نشان داد

1. Formalin-acetic-alcohol (FAA)
2. Formal-Calcium(Baker)
3. Dehydration
4. Infiltration
5. Sudan Black B

Archive of SID

www.SID.ir

(شکل ۱) که ویژگی‌هایی مورفومتری بذر مانند قطر، نسبت قطر بزرگ به کوچک، شکل، گردی بذر و وزن هزاردانه در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بودند، در حالی‌که مساحت بذر در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. بذر رقم گلستان نسبت به رقم لطیف دارای مساحت، قطر، نسبت قطر بزرگ به کوچک، ضریب گردی و وزن هزار دانه بیشتری بود. این دو بذر به لحاظ محیط، طول و عرض تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۱). ریزی و درشتی بذر در یک رقم از مسائل مهمی است که باید مورد توجه قرار گیرد. بذرهای ریز، رویان کوچک و مواد ذخیره‌ای کمتری دارند و گیاهچه‌های کوچکتری تولید می‌کنند، در صورتی که بذرهای درشت‌تر قابلیت کاشت در عمق بیش‌تر را دارند و قادرند شرایط نامساعد را بیشتر تحمل کنند و گیاهچه‌های سالم، با توان زیستی بالاتری تولید می‌کنند. اندازه‌ی بذر تحت تاثیر عوامل مختلف قرار می‌گیرد، این تفاوت‌ها علاوه بر ماهیت ژنتیکی بذر به عواملی از قبیل نوع گیاه، محل قرارگرفتن دانه روی گیاه، عوامل محیطی نیز بستگی دارد (آمیکا و همکاران، ۲۰۱۴).

جدول ۱: بررسی برخی از ویژگی‌های مورفومتری بذر دو رقم پنبه (لطیف و گلستان). حروف ناهمسان بیانگر معنی‌داری می‌باشد.

ویژگی‌های مورفومتری	گلستان		لطیف	
سطح (mm^2)	۳۶/۲۷ ± ۱/۰۳	a	۱±۳۱/۹۲/۶۹	b
محیط (mm)	۲۸/۰۲۷ ± ۰/۰۷۱۱	a	۲۷/۸۲۴±۰/۸۳۳	a
طول (mm)	۸/۵۹۶± ۰/۱۲۱۵	a	۸/۰۸۷± ۰/۲۸۹۶	a
عرض (mm)	۵/۷۶۹± ۰/۱۶۸۵	a	۵/۷۰۷± ۰/۱۴۶۱	a
حداقل قطر (mm)	۵/۰۷۱± ۰/۰۰۱	a	۵/۰۱۳± ۰/۰۰۰۱	b
حداکثر قطر (mm)	۹/۹۵۳± ۰/۰۷۰	a	۹/۲۵۰± ۰/۰۰۰۷	b
وزن هزار دانه (g)	۱۱۵/۴۴۰± ۰/۳۵۴	a	۱۰۳/۴۸۵± ۰/۹۰۱۸	b
نسبت حداقل قطر به حداکثر قطر	۰/۵۴۵۷ ± ۰/۱۳۵۸	a	۰/۵۰۹۵ ± ۰/۰۰۰۱	b
فاکتور گردی	۰/۵۱۷۷±۰/۰۰۸۷	a	۰/۴۲۷۶ ±۰/۰۰۶۵	b
فاکتور شکل	۰/۵۵۶۲± ۰/۰۰۵۴	a	۰/۵۳۱۹ ±۰/۰۰۷۹	b

همانطور که در شکل (2a-d) مشاهده می‌شود بذر پنبه بالغ در یک پوسته سخت پوشیده شده‌است که ضخامت آن در دو ناحیه شالازی و میکروپیلی قابل مقایسه است. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که ساختار بذر بالغ می‌باشد، رویان به شکل محوری در برش طولی و به شکل مقطع گرد در برش عرضی فضای نسبتا کمی از ساختار بذر را در بر گرفته است که در حالت محوری در یک رأس آن ساقه‌چه شامل مریستم انتهایی ساقه و در انتهای دیگر آن ریشه‌چه قرار دارد. لپه‌ها بسیار توسعه یافته، بهم

Archive of SID

www.SID.ir

تابیده و پیچ خورده قسمت اعظم بذر را در برگرفته‌اند و دارای بافت ذخیره‌ای هستند. در سراسر لپه‌ها ساختارهای ترشحی رنگی حاوی گوسیپیول مشاهده می‌شود (شکل ۲ و ۳).

شکل ۱: ریخت‌شناسی بذرها و کرک‌های سطحی بذرها. a: بذر رقم لطیف، b: بذر رقم گلستان.

ساختار لپه‌های بذر بالغ مشابه به برگ دو لپه‌ای مزوفیت است. برروی سطح برگ‌های لپه‌ای، اپیدرم تک لایه قرار گرفته است. این سلول‌های اپیدرم دارای روزنه‌های نمو نیافته هستند. مزوفیل حاوی یک یا دو لایه سلول پارانشیم نردبانی و اسفنجی است. در لایه پارانشیم اسفنجی تعدادی ساختار ترشحی یافت می‌شود که در پژوهش‌ها تحت عنوان غدد رزینی نام می‌برند. به‌منظور تعیین نوع ساختار ترشحی، برش‌های طولی و عرضی از بذر مورد مقایسه قرار گرفتند (شکل ۲ و ۳). همانطورکه در تصاویر مشاهده می‌شود ساختارهای ترشحی رنگی در برش طولی بذر، گرد و کروی دیده می‌شوند و هیچگونه ساختار طولی، کانال و مجرای طویل مشاهده نمی‌شود، بنابراین این ساختارها نوعی حفره یا کیسه‌های ترشحی هستند. حفره‌ها یا کیسه‌های ترشحی از مجموع سلول‌های ترشحی ساخته شده‌اند که در پیرامون یک حفره مرکزی بزرگ آرایش پیدا کرده‌اند، این حفره از مواد ترشحی پر شده است. وجود بقایای سلولی در فضای ترشحی بیانگر نقش فرایند لیزوژنی در شکل‌گیری این ساختارها است (شکل 2i). مساله لیزیژن و یا شیزولیزیژن بودن کیسه ترشحی از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا اتولیز سلول‌های غده روغنی و آزادسازی ترشحات در فضای بین سلولی می‌تواند مثالی از پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی باشد. کیسه ترشحی توسط یک یا دو لایه سلول

Archive of SID

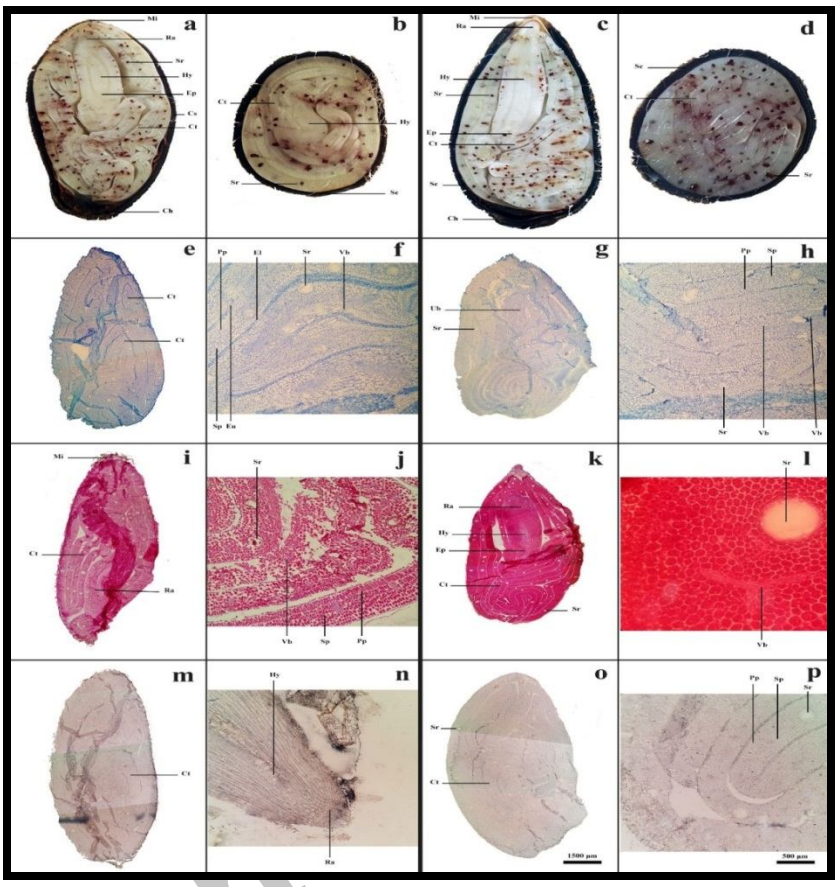
www.SID.ir

نازک و پهن احاطه شده‌اند. محتوای ساختار ترشحی در بذر پنبه در بررسی محققین شامل ترکیبات صمغی و ترکیبات لیپیدی می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که حدود ۵ تا ۶ درصد محتوای آنها را پنتوزان‌ها تشکیل می‌دهند (هورن و همکاران، ۲۰۱۲). همانطور که در برش طولی بذر پنبه دیده می‌شود پراکنش ساختارهای ترشحی اغلب در لپه‌ها مشاهده می‌شود اما به تعداد محدودی ساختارهای ترشحی در پریبلم ساختار هیپوکوتیلی نیز یافت می‌شود. (شکل ۲a-d). ساختارهای ترشحی شکل گرفته در طی نمو بذر بعد از سبز شدن گیاهچه روی آن دیده می‌شود این ساختارها بر روی گیاهچه‌های طبیعی کمتر پدیدار می‌شوند، اما در گیاهان اتیوله شده بیشتر پراکنش دارند که علت این پدیده را می‌توان به وجود کلروفیل II در گیاهان طبیعی تعمیم داد که موجب پوشاندن ساختارهای ترشحی می‌شوند (ورو بی و همکاران، ۱۹۹۹). در بررسی محققین، عمده ماده ترشحی این ساختارها تحت عنوان گوسیپول، یک ترکیب پلی فنلی است که با وجود شش گروه هیدروکسی فنولی و دو گروه آلدهیدی از نظر شیمیایی فعال و واکنش دهنده می‌باشد، رنگ‌آمیزی تولوئیدن و سودان سیاه بترتیب شناسایی ترکیبات فنلی و لپیدی را نشان می‌دهد (شکل ۲e-h و ۲m-p). گوسیپول و مشتقات آن به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی چند وجهی مانند فعالیت‌های ضدباروری، ضدویروسی، ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدانگل تریپانوزوما، ضدمیکروبی و ضدمالاریایی مورد مطالعات زیادی قرار گرفته است (گادلها و همکاران، ۲۰۱۴).

گوسیپول به‌طور عمده ۴۰-۲۰٪ وزن کیسه ترشحی و ۱/۷-۰/۴٪ بذر کامل را شامل می‌شود که تولید آن می‌تواند به تنهایی از ۴۰،۰۰۰ تن در سال در ایالات متحده تجاوز کند (خونگ و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین میزان گوسیپول گیاهان پنبه به یک مسئله مهم از نظر علمی و اقتصادی تبدیل شده که به‌دلیل ویژگی‌های بیولوژیکی خاص و تأثیر سمیت آن به‌عنوان خوراک دام و روغن پنبه دانه در محصولات غذایی و آرد پنبه جهت مصرف انسانی می‌باشد (گادلها و همکاران، ۲۰۱۴). علاوه بر بذر، غدد گوسیپول در سایر قسمت‌های گیاه پنبه مانند پوست ریشه‌های گیاه، برگ‌ها، پوست دانه و گل‌ها نیز یافت شده‌است. از طرف دیگر، میزان گوسیپول بسته به گونه و رقم گیاه پنبه دانه، شرایط آب و هوایی و خاک منطقه، تأمین آب، تیمارهای اعمال شده و به‌ویژه مقدار و ترکیب کود مورد استفاده تا حد زیادی متفاوت است (مارکمن، ۱۹۶۸؛ استانسبوری، ۱۹۵۴).

Archive of SID

www.SID.ir



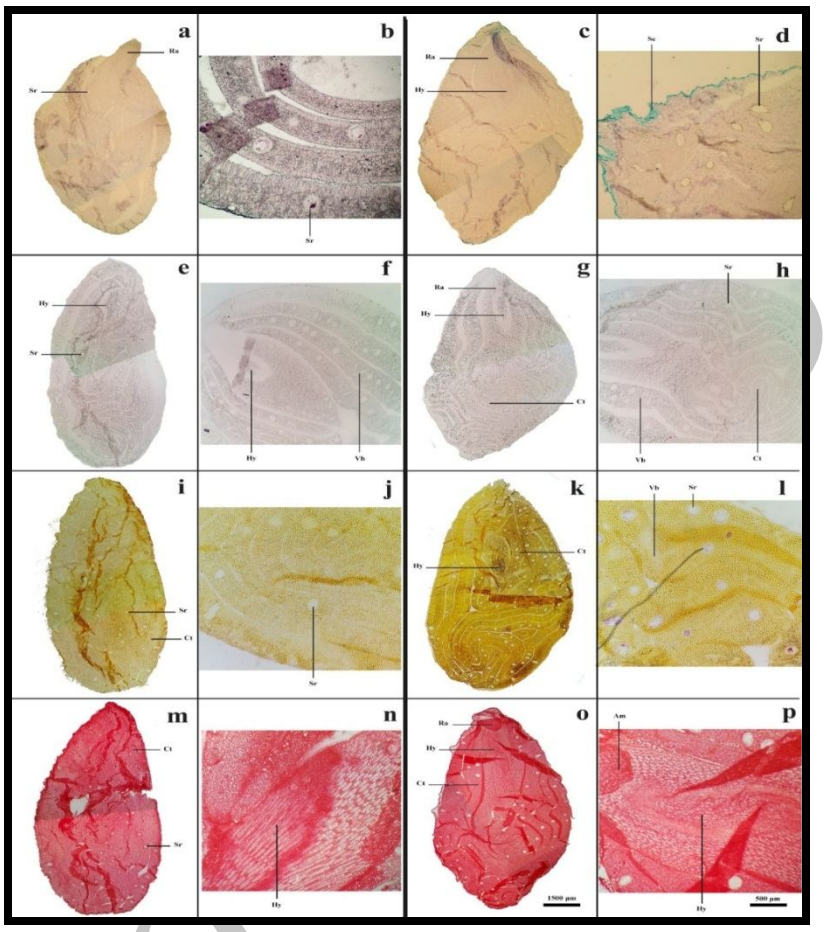
شکل ۲: ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی بذرهای دو رقم لطیف (دو ستون سمت چپ) و گلستان (دو ستون سمت راست). **a** و **b**: ساختار درونی، برش طولی و عرضی بذر رقم لطیف. **c** و **d**: ساختار درونی، برش طولی و عرضی بذر رقم گلستان. موقعیت جنین در داخل دانه، پراکنش گوسیپیول‌های واقع در ساختار ترشحی در ساختار رویان و موقعیت و مقدار فضای اشغال شده توسط جنین قابل مشاهده است. **e** و **f**: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم لطیف با رنگ‌آمیزی تولوئیدن برای شناسایی ترکیبات فنلی. **g** و **h**: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم گلستان با رنگ‌آمیزی تولوئیدن برای شناسایی ترکیبات فنلی. **i** و **j**: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم لطیف با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین برای تشخیص بافت‌های مختلف و سلول‌های تمایز یافته. **k** و **l**: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم گلستان با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین برای تشخیص بافت‌های مختلف و سلول‌های تمایز یافته. **m** و **n**: برش طولی و ساختار درونی بذر رنگ‌آمیزی شده با سودان سیاه و حضور ترکیبات لیپیدی در ساختار بذر رقم لطیف. **o** و **p**: برش طولی و ساختار درونی بذر رنگ‌آمیزی شده با سودان سیاه و حضور ترکیبات لیپیدی در ساختار بذر رقم گلستان. **Ch**: قطب شالازی، **Ct**: لپه، **Ep**: اپی کوتیل، **Hy**: هیپوکوتیل، **Mi**: قطب میکروپیل، **Pp**: پارانشیم نردبانی، **Ra**: ریشه‌چه،**Sc** : پوسته بذر، **Sp**: پارانشیم اسفنجی، **Sr**: ساختار ترشحی، **Vb**: دسته آوندی.

www.SID.ir

تغییرات میزان گوسیپول در طول مراحل مختلف بلوغ نیز گزارش شده است (کاسکی و گالوپ، ۱۹۳۱؛ گالوپ، ۱۹۲۷، ۱۹۲۸). مریستم‌های اولیه پلروم، پریبلم و درماتوژن در هیپوکوتیل بذر بالغ قبل از سبز شدن دیده می‌شود. کیسه‌های ترشحی همچنین در پریبلم هیپوکوتیل یافت می‌شوند. چربی در تمام بافت‌های دانه یافت می‌شوند اما میزان آن در مزوفیل لپه‌ها و سلول‌های پارانشیم هیپوکوتیل فراوان است (شکل ۲m-p). پروتئین در ساختار بذر و رویان مشاهده شد (شکل ۳e-h). آزمایش سیتوشیمی قندها در بذر پنبه منفی بود، مقدار کم ذرات نشاسته در بذر بالغ پنبه به ندرت دیده شد (شکل ۳i-l). اما مطالعات گذشته وجود دانه‌های نشاسته و چربی را در طی نمو دانه پنبه نشان داد. مقادیر نشاسته درون دانه بالغ احتمالا بسیار کم است. برخی گزارشات حاکی از آن است که در دانه بالغ پنبه ذرات نشاسته وجود ندارد (سیمپسون، ۱۹۴۰). ذرات نشاسته موجود در دانه بالغ پنبه، مانند سایر گیاهان، ویژگی‌های لاملایی ندارند و بیشتر در منطقه بالای هیپوکتیل یافت می‌شوند بنابراین تجمع ذرات نشاسته در بذر پنبه مشهود نیست و به ندرت می‌توان ذرات بزرگ نشاسته را در این بذرها یافت (شکل ۳i-l). در مرحله بلوغ دانه فقط لایه نازکی از آندوسپرم در اطراف رویان باقی می‌ماند، سلول‌های آندوسپرم در این مرحله مستطیلی شکل هستند و به ندرت ضخیم شده اند (روان و همکاران، ۲۰۰۳). سلول‌های رویانی حاوی مقادیر زیادی روغن و پروتئین هستند (شکل ۲e-h و m-2p). به‌نظر می‌رسد ظاهرا آندوسپرم به رویان چسبیده است. آلورون در تصویر رویان‌ها مشخص نیست و احتمالا به پوسته چسبیده و یا خیلی نازک می‌باشد (شکل ۲ و ۳). پریسپرم کاملا چسبیده و در رویان بالغ که معمولا چروکیده شده و به پوسته چسبیده‌است. در مقایسه ساختار درونی این دو بذر بنظر می‌رسد که در رقم گلستان مریستم‌ها کاملا شکل گرفته‌اند و پرومریستم‌ها نسبت به رقم لطیف توسعه یافته‌ترند (شکل ۲n، ۳n و ۳p). در هر دو رقم سلول‌های پارانشیم اسفنجی و نردبانی مزوفیل تمایز یافته‌اند، اما این سلول‌ها در رقم گلستان رشد و تمایز بیشتری دارند (شکل ۲h، ۲f، ۲j، ۲p و ۳b)، تفاوت در رنگ‌پذیری و اندازه سلول‌ها در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین قابل مشاهده است (شکل ۲i-l). همچنین در این نمونه‌ها سلول‌های اپیدرم لپه رویان بذر گلستان، بخوبی تمایز یافته‌اند و لایه‌های سلولی قابل تشخیص می‌باشند. در رنگ‌آمیزی سودان، سلول‌های رویان و لپه در رقم گلستان رنگ‌پذیری بیشتری دارند و به‌نظر می‌رسد سلول‌ها تمایز بیشتری یافته‌اند و دانه‌های چربی بیشتری به چشم می‌خورد. ماهیت لیپیدی این بخش‌ها توسط معرف سودان سیاه به اثبات رسیده است. همچنین غشاء اطراف ساختار ترشحی رنگ‌پذیری بیشتری نسبت به رقم لطیف دارد (شکل ۳e-h). در رنگ‌آمیزی با معرف تولوئیدن بلو برای شناسایی ترکیبات فنلی، در بذرهای گلستان نسبت به رقم لطیف، ساختار مجرای ترشحی، رنگ‌پذیری بالایی دارد و کاملا متمایز و مشخص هستند، این تفاوت می‌تواند مربوط به تفاوت در مواد ترشحی و یا جنس دیواره سلول‌های اطراف حفره ترشحی باشد و حضور ترکیبات پلی‌فنلی در دانه را به اثبات می‌رساند (شکل ۲e-h).

Archive of SID

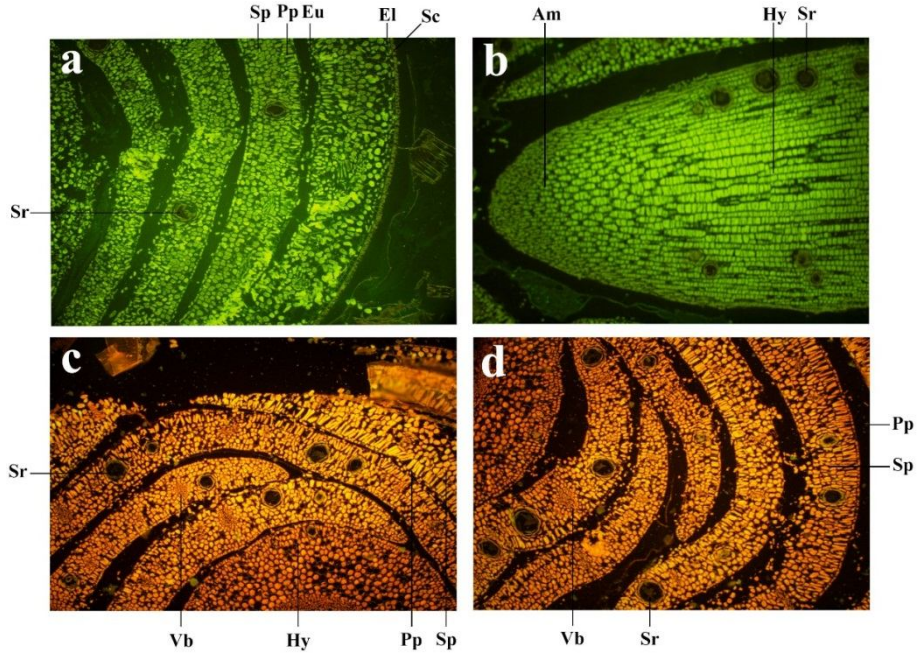
www.SID.ir



شکل ۳: ریخت‌شناسی و بافت‌شناسی بذرهای دو رقم لطیف (دو ستون سمت چپ) و گلستان (دو ستون سمت راست). a و b: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم لطیف با رنگ‌آمیزی کارمن زاجی-متیل بلو. c و d: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم گلستان با رنگ‌آمیزی کارمن زاجی-متیل بلو. e و f: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم لطیف با رنگ‌آمیزی کوماسی برلیانت بلو، حضور ترکیبات پروتئین ی در سلول‌های رویانی. g و h: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم لطیف با رنگ‌آمیزی کوماسی برلیانت بلو، حضور ترکیبات پروتئین ی در سلول-های رویانی.i و j: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم لطیف با رنگ‌آمیزی ید یدوره-اسید سولفوریک. سلولز در دیواره اولیه سلول های رویانی قابل مشاهده می‌باشد k و l: برش طولی و ساختار درونی بذر رقم گلستان با رنگ‌آمیزی ید یدوره -اسید سولفوریک. سلولز در دیواره اولیه سلول های رویانی قابل مشاهده می‌باشد.m و n: برش طولی و ساختار درونی بذر رنگ‌آمیزی شده با سافرانین و فست گرین در ساختار بذر رقم لطیف. o و p: برش طولی و ساختار درونی بذر رنگ‌آمیزی شده با سافرانین و فست گرین در ساختار بذر رقم گلستان. Ch: قطب شالازی، Ct: لپه، Ep: اپی کوتیل، Hy: هیپوکوتیل، Mi: قطب میکروپیل، Pp: پارانشیم نردبانی، Ra: ریشه‌چه، Sp: پارانشیم اسفنجی، Sc : پوسته بذر، Sr: ساختار ترشحی، Vb: دسته آوندی.

www.SID.ir

در رنگ‌آمیزی با کارمن- متیل بلو بررسی ساختار بذر نشان داد که دیواره سلول‌ها از نوع نخستین با ضخامت کم بود و جنس آن پکتوسلولزی است، در این رنگ‌آمیزی ساختار دهانه حفره ترشحی در بذر گلستان قابلیت رنگ‌پذیری بیشتری داشت.



شکل ۳: مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت و حضور فراوان ترکیبات فلوروسنت در ساختار بذر. a, c, d: برش عرضی و b: برشی طولی. Am: مریستم انتهایی ریشه، Eu: اپیدرم بالایی برگ، El: اپیدرم پایینی برگ، Hy: هیپوکوتیل، Pp: پارانشیم نردبانی، Ra: ریشه‌چه، Sp: پارانشیم اسفنجی، Sc : پوسته بذر، Sr: ساختار ترشحی، Vb: دسته آوندی.

بقایای پوسته بذر به رنگ آبی دیده شد که بیانگر دیواره چوبی شده این سلول‌هاست (شکل ۳a-d). حضور ترکیبات پروتئینی در بذر با رنگ‌آمیزی کوماسی برلیانت بلو قابل مشاهده است (شکل ۳e-h). در رنگ‌آمیزی یدو یدوره-اسید سولفوریک، رنگ‌پذیری بذر گلستان نسبت به لطیف بیشتر بود، دیواره‌ها کاملا تمایزیافته و ضخامت بیشتری داشتند (شکل ۳i-l). این امر بیانگر تخصص یافتگی و تمایز بیشتر سلول‌ها در رقم گلستان می‌باشد و به نظر می‌رسد بذرهای بدست آمده از شرایط کشت یکسان، در مراحل نموی متفاوت هستند. مطابق شکل، در ساختار تشریحی بذر گلستان، رویان کاملا توسعه‌یافته بود، مطالعه بیشتر این رقم نشان داد که ساختارهای ریشه‌چه، مریستم‌های اولیه، ساختار مزوفیل

Archive of SID

www.SID.ir

برگ‌ها و اپیدرم تمایز یافته بودند (شکل ۳n-p). بافت‌های رنگ‌آمیزی شده با ید یدوره-اسید سولفوریک، میزان سلولز در دیواره اولیه سلول‌های رویانی را مشخص کرد (شکل ۳i-l). مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت و حضور فراوان ترکیبات فلوروسنت در بخش‌های مختلف رویان و لپه‌ها می‌تواند با ترکیبات سلولز دیواره، ترکیبات فنلی و مواد ترشحی کیسه‌های ترشحی مشاهده شده، در بررسی‌های ساختاری مطابقت داشته باشد (شکل ۲e-h). بررسی‌های میکروسکوپ فلورسنت، وجود مواد اتوفلورسنت ترشحی را نشان می‌دهد (شکل ۴).

اتوفلورسنت ترکیبات سلولی به‌عنوان نشانگرهایی برای تشخیص سلولی و همچنین به‌عنوان شاخص‌های طبیعی حالت سلولی در نظر گرفته می‌شود، زیرا اغلب بیانگر تغییرات متابولیسم سلول و پاسخ به علائم داخلی و خارجی هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که در بین مواد مختلف گیاهی ترپن‌ها، برخی آلکالوئیدها مثل کلشی‌سین و فلاونوئیدها در نور آبی و سبز-آبی در طول موج ۴۷۰ تا ۵۲۵ نانومتر از طول موج های مرئی پرتوهای فلورسنت منتشر می‌کنند، در حالیکه پلی‌استیلن‌ها ایزوکوئیی یونولین و آلکالوئیدهای آکریدین در طیف زرد و نارنجی ساطع می‌کنند. فلورسنت قرمز سلول‌های گیاهی به‌واسطه حضور آنتوسیانین و ازولنز در طول موج ۶۰۰ تا ۶۰۹ متر می‌باشد. در پیری یا در حضور گونه‌های رادیکال‌های آزاد لیپوفوزین، رنگدانه‌های فلورسنتی شکل گرفته که باعث افزایش طول موج ساده از ۴۵۰ تا ۴۸۹ به طول موج قرمز بیش از ۶۰۰ نانومتر می‌شوند که البته میزان آن بسته به ماهیت موجود زنده و زمان در معرض قرار گرفتن فاکتور تنشی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (رش چینا، ۲۰۱۲).

این مسئله در ارتباط با ساختارهای ترشحی گیاهان عینیت می‌یابد مطالعه ساختارهای ترشحی گیاهان تحت میکروسکوپ فلورسنت براحتی صورت می‌گیرد، در حالی که این ساختارها در میکروسکوپ معمولی بدون رنگ‌آمیزی‌های هیستوشیمیایی قابل مشاهده نیستند. شدت و ترکیبات طیفی تحریک در ارتباط با ماهیت موجود زنده، موقعیت موجود، شرایط محیطی و آزمایشگاهی مثل نور، رطوبت، حالت فیزیولوژی سلول و در کل مرحله‌ی نمو، سلول‌ها و اندام‌های اطراف و موجوداتی مثل پارازیت‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد (رش چینا، ۲۰۰۷؛ رش چینا، ۲۰۰۷ و رش چینا، ۲۰۰۷). آناتومی بذر پنبه، علیرغم تفاوت در رقم‌ها، شباهت‌های کلی دارد. در بذر پنبه ساختار بندناف[1] توسط محققین مختلف بررسی شده‌است، در این پژوهش همچنین به سلول‌های حاشیه‌ای[2] که از اپیدرم داخلی پوشش درونی پوسته بذر پنبه شکل می‌گیرد، اشاره شده‌است (وندل و همکاران ، ۲۰۱۰). در پژوهش‌های قدیمی‌تر به منطقه لایه یا پد[3] در ناحیه شالازی اشاره کرده‌اند. این منطقه (پولستر) در

1. Funiculus
2. Fringe
3. Polster

Archive of SID

www.SID.ir

واقع یک ناحیه بزرگ از لایه‌های رنگی داخلی است که از سلول‌های پارانشیمی ستاره‌ای شکل یا اسفنجی تشکیل شده‌است و در ناحیه شالازی بذر دیده می‌شود. همچنین اشاره شده‌است که غشاء و لایه‌های پوسته بذر در منطقه شالازی و میکروپیل ضخیم‌تر هستند. میکروپیل در انتهای نوک تیز بذر واقع شده و کاملاً توسط بندناف پوشیده شده و از رویان توسعه یافته تا رافه[1] رویان ادامه دارد (سیمپسون و همکاران، ۱۹۴۰). در انتهای بذرواقع در نوک پهن بذر پنبه، منطقه شالاز دیده می‌شود. تغییر در ساختار مناطق میکروپیل و شالازی نشان دهنده اهمیت این مناطق در جذب آب، تبادل گازها و تغییرات مناطق تمرکز عفونت است (اوسی و همکاران، ۲۰۱۳).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه ضمن تاکید بر تفاوت‌های ریخت‌شناسی، بافت‌شناسی و ساختاری در دو رقم مورد مطالعه، بر اهمیت صفات ریز ریخت‌شناسی، ریخت‌شناسی و تشریحی در تفکیک و کشت ارقام مختلف سفارش می‌کند. بر اساس صفات مهم تشخیصی، شناسایی بذر ارقام مختلف قابل شناسایی می‌باشد. یافته‌های مطالعه ریخت‌شناسی بذر و تشریحی ساختار رویانی بذرها نشان داد که شکل، اندازه و نمو بخش‌های مختلف رویانی از مهم‌ترین صفات در بین این ارقام می‌باشند. این امر بیانگر تخصص یافتگی و تمایز بیشتر سلول‌های رویانی در رقم گلستان می‌باشد و بنظر می‌رسد بذرهای بدست آمده از شرایط کشت یکسان، در مراحل نموی متفاوت هستند که می‌تواند با توجه به شرایط اکولوژی و اقلیمی مناطق مختلف در تعیین زمان کشت و برداشت مناسب مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و موسسه تحقیقات پنبه کشور به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش در قالب طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Agati, G. 1998. Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength. J Opt. A: Pure Appl. Opt. 7(4): 797–807.
2. Alishah. O. 2014. Applied Instruction Planting, Caring and Harvesting of Cotton, Latif genotype. Ministry of Jihad–e-Agriculture Agricultural Research, Education & Extension Organization

1. Raphe

Archive of SID

www.SID.ir

3. Alishah. O. and Miri, A. A.2010. Cotton Golestan genotype. Applied Instruction Ministry of Jihad–e-Agriculture Agricultural Research, Education & Extension Organization
4. Ambika, S., Manonmani, V. and Somasundaram, G. 2014. Review on effect of seed size on seedling vigour and seed yield. Res J Seed Sci. 7: 31-38.
5. Andersson, H., Baechi, T., Hoechl, M. and Richter, C. 1998. Autofluorescence of living cells. J. Micro. 191(1): 1–7
6. Avci, U., Pattathil, S., Singh, B., Brown, V.L., Hahn, M.G., and Haigler, C.H. 2013. Cotton fiber cell walls of Gossypium hirsutum and Gossypium barbadense have differences related to loosely-bound xyloglucan. PLoS One, 8(2): 56315-56329.
7. Bellaloui, N., Stetina, S.R., and Turley, R.B. 2015. Cottonseed protein, oil, and mineral status in near-isogenic Gossypium hirsutum cotton lines expressing fuzzy/linted and fuzzless/linted seed phenotypes under field conditions. Front Plant Sci. 19(6): 137.
8. Benedict, J.C. 2015. A new technique to prepare hard fruits and seeds for anatomical studies. Appl Plant Sci. 3(10):1500075.
9. Bentsink, L., and Koornneef, M. 2008. Seed dormancy and germination. The Arabidopsis book. American Society of Plant Biologists, 119 pp.
10. Berlyn, G.M. and Miksche, J.P. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry., Ames, Iowa: The Iowa State University Press. 326 pp.
11. Gadelha, I.C.N., Fonseca, N.B.S., Oloris, S.C.S., Melo, M.M., and Soto-Blanco, B. 2014. Gossypol toxicity from cottonseed products. Scientific World J. 2014: 231-635.
12. He, Z., Zhang, H., and Olk, D.C. 2015. Chemical composition of defatted cottonseed and soy meal products. PLoS One, 10(6):129933.
13. Horn, P.J., Korte, A.R., Neogi, P.B., Love, E., Fuchs, J., Strupat, K., and Chapman, K.D. 2012. Spatial mapping of lipids at cellular resolution in embryos of Cotton. Plant Cell, 24(2): 622-636.
14. Paiziev, V.A.K. a. A.A. 2006. Structural features of the stony cotton seeds. NDT.net, 11(6): 7.
15. Powell, A.A. 2010. Morphological and physiological characteristics of seeds and their capacity to germinate and survive. Ann Bot, 105(6): 975-976.
16. Roshchina, V.V. 2007. Cellular models as biosensors. pp. 5–22. In V.V. Roshchina and S.S. Narwal, Eds., Cell diagnostics: Images, Biophysical and biochemical processes in allelopathy, Science, Enfield, UK.
17. Roshchina, V.V. 2007. Luminescent cell analysis in allelopathy. pp. 103–115. In V.V. Roshchina and S.S. Narwal, (Eds.) Cell Diagnostics: Images, biophysical and biochemical Processes in Allelopathy. Science, Enfield, UK.
18. Roshchina, V.V. 2012. Vital autofluorescence: application to the study of plant living cells. Inter J Spec. 2012:1-14.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Roshchina, V.V., Yashin, V.A., Kononov, A.V. and Yashina, A.V. Laser-scanning confocal microscopy (LSCM): study of plant secretory cell. pp. 93–102. In V.V. Roshchina and S. S. Narwal. (Eds.) Cell Diagnostics: Images, biophysical and biochemical processes in allelopathy, Science, Enfield, UK.
20. Roshchina, V.V., Yashina, A.V. and Yashin, V.A. 2008. Cell communication in pollen allelopathy analyzed with laser-scanning confocal microscopy. Allelopathy J. 21(2): 219–226.
21. Roshchina, V.V., Yashina, A.V., Yashin, V.A. and Gol'tyaev, M.V. 2011. Fluorescence of biologically active compounds in plant secretory cells. pp. 3–25. In Narwal, S.S., Pavlovic, P. and John, J. (Eds.), Research Methods in Plant Science, Vol. 2. Forestry and Agroforestry, Studium Press, Houston, Tex, USA.
22. Roshchina, V.V., Yashina, A.V., Yashin, V.A. and Prizova, N.K. 2009. Models to study pollen allelopathy. Allelopathy J. 23(1): 3–24.
23. Ruan, Y.L., Llewellyn, D.J., and Furbank, R.T. 2003. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. Plant Cell, 15(4): 952-964 .
24. Simpson, D.M.B., Adams, C.L., and Stone, G.M. 1940. Anatomical structure of the cottonseed coat as related to problems of germination: U.S. Department of Agriculture.
25. Taylor, D.L. and Salmon, E.D. 1989. Basic fluorescence microscopy. pp. 207–237. In J.L. Wang and D.L. Taylor. (Eds.), Methods in cell biology: living cell in culture. Academic Press, San Diego, Calif, USA.
26. Valdecasas, A.G. and Abad, A. 2011. Morphological confocal microscopy in arthropods and the enhancement of autofluorescence after proteinase K extraction. Microsc. Microanal. 17(1): 109–113.
27. Vroh Bi, I., Baudoin, J.P., Hau, B., and Mergeai, G. 1999. Development of high-gossypol cotton plants with low-gossypol seeds using trispecies bridge crosses and in vitro culture of seed embryos. Euphytica, 106(3): 243-251.
28. Wa., J. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. W. H. San Francisco: Freeman and Company.
29. Wendel JF, Brubaker CL, Seelanan T. The origin and evolution of *Gossypium*. 2010. pp. 1–18. In: Stewart JM, Oosterhuis DM, Heitholt JJ, Mauney JR, editors. Physiology of Cotton. Netherlands: Springer.
30. Wolfbeis, O.S. 1985. The fluorescence of organic natural products. pp. 167–370. In S.G. Schulman (Ed.) Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
31. Zhong, S., Leong, J., Ye, W., Xu, P., Lin, S.H., Liu, J.Y., and and Lin, Y.C. 2013. (−)-Gossypol-enriched cottonseed oil Inhibits proliferation and Adipogenesis of human breast pre-adipocytes. Anticancer Res, 33(3): 949-955.

Archive of SID

www.SID.ir