

بررسی جنبه‌های فراساختاری خفتگی در بذر یولاف وحشی

A study on ultrastructural aspects of seed dormancy in wild oats

حمیرا سلیمی*، مه لقا قربانلی، بهروز شاهسون بهبودی و نوح شهرآیین

موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی،

دانشگاه تربیت معلم و دانشگاه تهران

پذیرش ۱۳۸۲/۳/۱۲

دریافت ۱۳۸۱/۳/۱۳

چکیده

تفاوت‌های ساختاری و فراساختاری بذور خفته و غیر خفته یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی (TEM) بررسی گردید. پس از جذب آب، رشد شعاعی سلول‌های روپوششی (epithelial) لپه در بذور غیر خفته مشاهده گردید. در بذور خفته، سلول‌های مذکور رشد نیافته و به صورت متراکم و فشرده وجود داشتند. هضم دانه‌های چربی و آلورون درون سلول و در نتیجه رقیق شدن سیتوپلاسم، توسعه شبکه آندوپلاسمی، افزایش تعداد پلی زومها و تجمع آنها، افزایش تعداد میتوکندری، مشاهده حضور یک واکوئول بزرگ در سلول، تغییرات فراساختاری موجود در سلول‌های بذور غیر خفته بود که در بذور خفته مشاهده نگردید. در بذور خفته واکوئول‌های کوچک و متعدد، تعداد زیادی دانه‌های چربی و آلورون وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: یولاف وحشی، بذر، خفتگی، ساختار، فراساختار

* مسئول مکاتبه

یولاف وحشی یکی از علف‌های هرز مهم غلات به ویژه گندم است که بذر آن خفتگی عمیقی دارد. شناخت جنبه‌های سلولی و ملکولی خفتگی در یافتن روش‌های موثر در شکستن خفتگی و کاهش تراکم بانک بذر در خاک‌های زراعی مفید می‌باشد. شناخت مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در زمینه انتقال بذر از حالت خفته به غیر خفته هنوز کامل نشده است. نیلور (Naylor 1966) وجود هورمون جیبرلین را در بذور غیر خفته *Avena fatua* نشان داد. بیولی و بلک (Bewley & Black 1978) نقش هورمون جیبرلین را در سنتز آنزیم α -amylase در سلول‌های آلورون بذر گیاهان تیره گندمیان برای هضم نشاسته نشان دادند. بیلین و فولی (Bailin & Foley 1994) وجود پروتئین‌های جدیدی را در بذر غیر خفته *Avena fatua* نشان دادند. فینچر (Fincher 1989) هورمون جیبرلین را در بیان ژن آنزیم α -آمیلاز موثر دانست. نگبی (Negbi 1984) ساختمان و عمل لپه را در گیاهان تیره گندمیان بررسی نمود و نگبی و سارجنت (Negbi & Sargent 1986) لپه موجود در بذر یولاف را بررسی کردند و آنرا ساختاری مهم در جذب ذخایر سلول‌های اندوخته‌ای و تجهیز آنها به رویان معرفی نمودند. راتو و راجو (Rao & Raju 1985) رشد شعاعی سلول‌های روپوششی لپه را پس از جذب آب در بذر غیر خفته *A. fatua* نشان دادند. در این پژوهش تفاوت‌های فرا ساختاری بین بذور خفته و غیر خفته یولاف وحشی بررسی گردید.

روش بررسی

با کشت بذور تازه برداشت شده و بذوری که یک سال در آزمایشگاه موجود بود (یولاف وحشی) و مشاهده و مقایسه جوانه زنی آنها، بذور تازه به عنوان بذور خفته و بذوری که به مدت یک سال در محیط طبیعی آزمایشگاه نگهداری شده بود به عنوان بذور غیر خفته استفاده گردیدند (Salimi & Ghorbanli 2001, Salimi et al. 1998). سبوسه (glumel) از بذر جدا گردید و بذور پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در آب به دو نیمه تقسیم شد که نیمه دارای رویان، لپه و بخشی از اندوخته جهت مطالعات میکروسکوپی انتخاب شد. از هر یک از بذور خفته و غیر خفته ۵۰ نمونه انتخاب و از هر یک سه الی چهار قطعه جدا گردید. نمونه‌ها نسبت به وضعیت رویان با برش‌های طولی و عرضی به قطعات ۳-۴ میلی‌متری تقسیم شدند. از هر یک از قطعات نیز هشت الی ده برش تهیه شد. جهت تهیه برش‌های میکروتومی و مشاهده آنها با میکروسکوپ نوری، قطعات در فیکساتور فرمالین: اسید استیک: اتانول ۹۶ درجه (FAA, ۲:۲:۱۶) به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. پس از شستشو در آب، آبیگری با درجات مختلف اتانول، واضح سازی با مخلوط اتانول و تولوئن

و سپس تولوئن خالص انجام گردید. قالب‌گیری درون آون با دمای ۶۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد با استفاده از پارافین انجام شد. پس از برش‌گیری با میکروتوم (برش‌ها به ضخامت ۸ میکرومتر) حذف پارافین با تولوئن و سپس با اتانول انجام گرفت و برش‌ها آبدهی شدند. رنگ آمیزی با مخلوط رنگ‌های هماتوکسیلین و قرمز کنگو و نیز رنگ‌های سافرانین و فست‌گرین انجام گردید (Behbody 1984). جهت تهیه برش‌های اولترا میکروتومی و مشاهده آنها با میکروسکوپ نوری به صورت برش‌های نیمه نازک (semi thin) و مشاهده برش‌های نازک با میکروسکوپ الکترونی، قطعات در گلو تار آلد هید ۲٪ و بافر فسفات با $\text{pH} = 7$ به مدت ۶ ساعت با دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد و سپس برای ۳ ساعت درون اسید اسمیک با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آبگیری با اتانول و اکسید پروپیلن نمونه‌ها در اپوکسی رزین (Epon 812) قالب‌گیری شدند. برش‌گیری با اولترامیکروتوم انجام گردید و نمونه‌ها روی پولک مسی قرار گرفتند. ضخامت قطعات برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ۶۰-۸۰ نانومتر و با میکروسکوپ نوری ۲-۱ میکرومتر بود. از استات اورانیوم و سیترات سرب جهت رنگ‌آمیزی برش‌های نازک (Behbody 1984) و تولودین بلو یک در صد جهت رنگ‌آمیزی برش‌های نیمه نازک استفاده شد (Dykstra 1993).

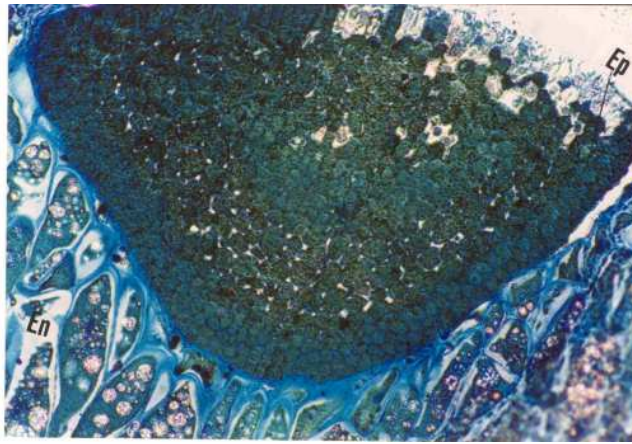
نتیجه

الف - مشاهده سلول‌های رو پوششی لپه در برش‌های اولترا میکروتومی نیمه نازک با میکروسکوپ نوری

شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به برش عرضی از بذور خفته و غیرخفته است که از برش‌های نیمه نازک به دست آمد. سلول‌های رو پوششی لپه در بذور خفته (شکل ۱) ریز و فشرده بود و تراکم بیشتری از مواد ذخیره‌ای در آنها و در سلول‌های اندوخته‌ای مشاهده گردید، در صورتی که سلول‌های رو پوششی در بذور غیر خفته رشد شعاعی داشت و طویل‌تر بود. همچنین ذخایر در سلول‌های اندوخته‌ای نیز در جریان هضم شدن قرار داشتند (شکل ۲).

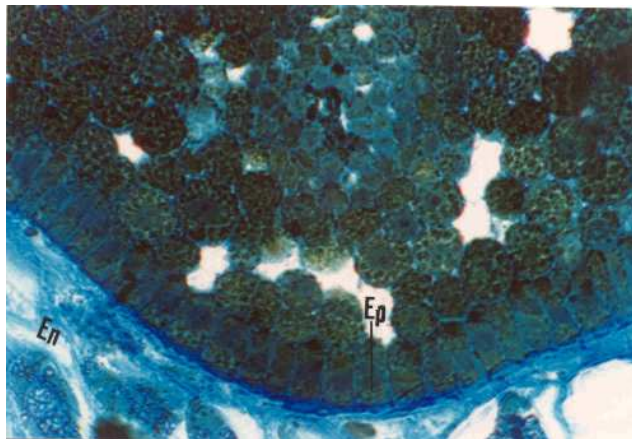
ب - مشاهده سلول‌های رو پوششی لپه و سلول‌های اندوخته (endosperm) در برش‌های اولترامیکروتومی با میکروسکوپ الکترونی

در بذور خفته، سلول‌های رو پوششی لپه دارای مقادیر زیادی چربی، دانه‌های آلورون (دانه‌های در بردارنده پروتئین)، گلوبوبین و پیش پلاست بودند (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). در صورتی که در بذور غیرخفته ذخایر فوق کاهش یافته و شبکه آندوپلاسمی وسیع، میتوکندری فراوان و تجمع پلی زوم‌ها مشاهده گردید (شکل‌های ۶ و ۷). در سلول‌های اندوخته‌ای بذور خفته تعدادی واکوئول ریز وجود داشت (شکل ۱۰)، اما در بذور غیر خفته تنها یک واکوئول بزرگ مشاهده گردید (شکل ۸ و ۹).



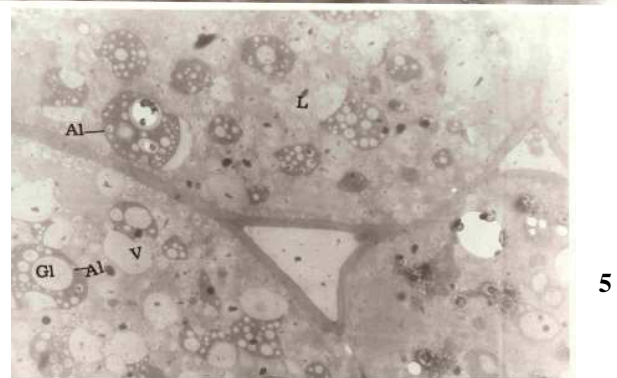
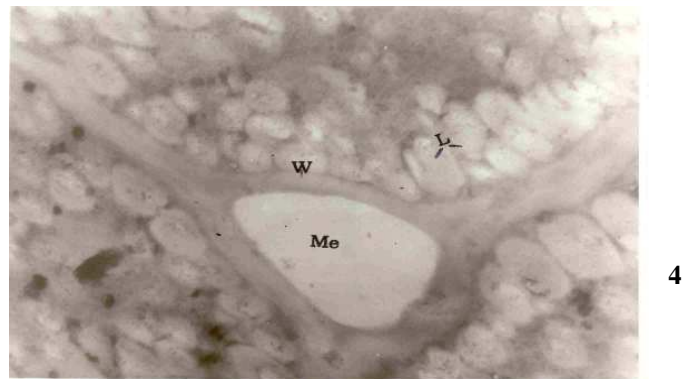
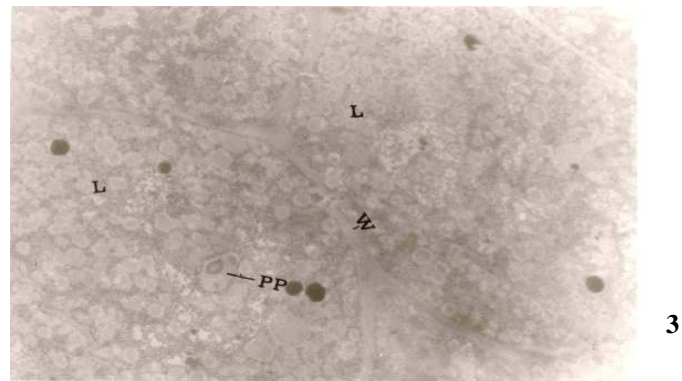
شکل ۱- مشاهده برش‌های نیمه نازک با میکروسکوپ نوری: برش عرضی از لپه بذر خفته (En) سلول‌های اندوخته، (Ep) سلول‌های روپوششی. (x191).

Fig. 1. Light microscopy, Semi section: Radial section of scutellum in dormant seed. (x191). Endosperm (En), Epithelial cell (Ep).



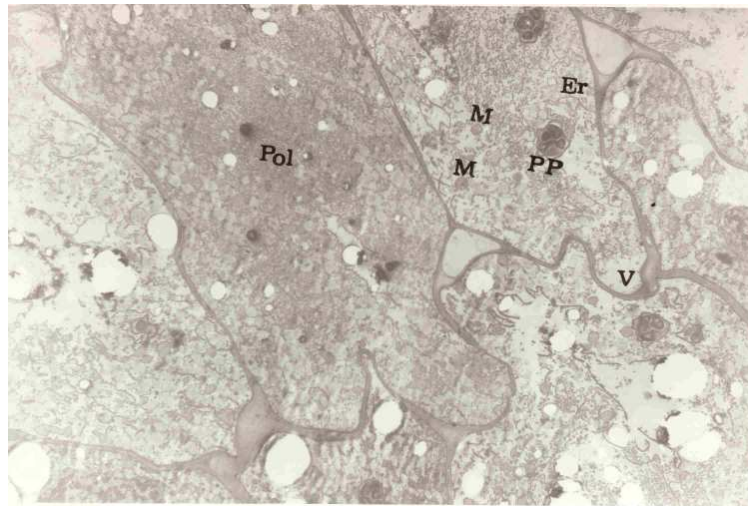
شکل ۲- مشاهده برش‌های نیمه نازک با میکروسکوپ نوری: برش عرضی از لپه بذر غیرخفته (En) سلول‌های اندوخته، (Ep) سلول‌های روپوششی. (x383).

Fig. 2. Light microscopy, Semi section: Radial section of scutellum in nondormant seed. (x383). Endosperm (En), Epithelial cell (Ep).

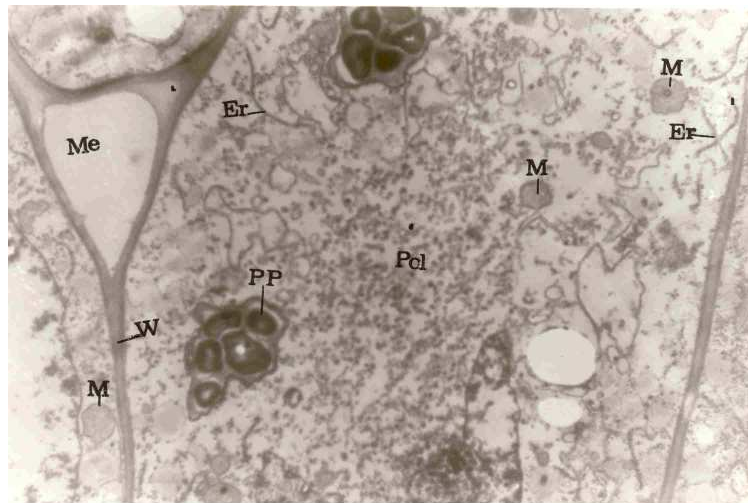


شکل ۳، ۴ و ۵ - مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن: سلول‌های روپوشی لپه در بذر خفته. شکل‌های ۳، ۴ و ۵ به ترتیب $\times 7335$ ، $\times 55420$ و $\times 11573$. دیواره (W)، فضای بین سلولی (Me)، چربی (L)، واکوئل (V)، دانه آلورون (Al)، گلوبوئید (Gl).

Figs. 3, 4 & 5. Transmission electron microscopy: Epithelial cells of the scutellum in dormant seed (x 55420, x 7335 & x 11573). Cell wall (W), Mea (Me), Lipid (L), Vacuole (V), Aleurone grain (Al), Gluboid (Gl).



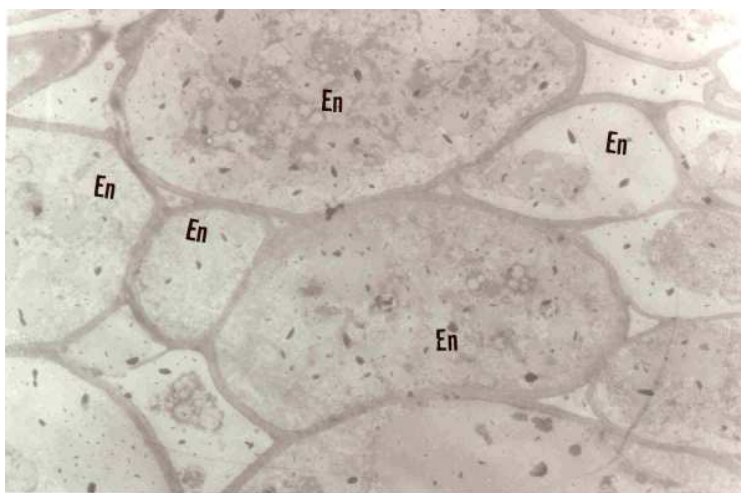
6



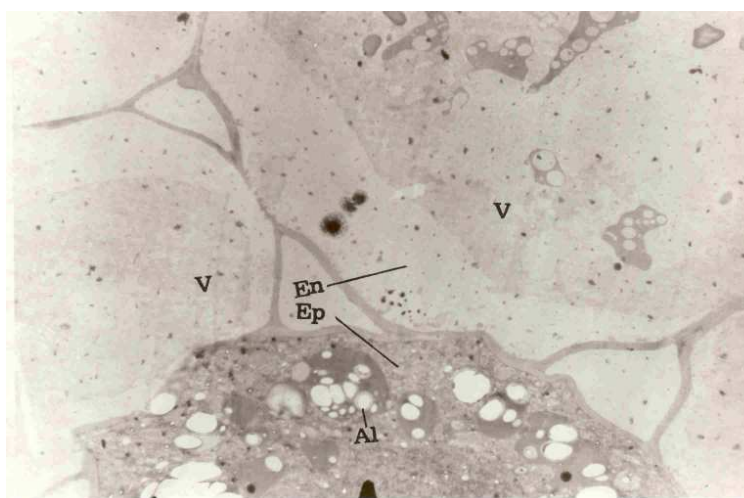
7

شکل ۶ و ۷ - مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن: سلول‌های روپوششی لپه در بذر غیرخفته. شکل‌های ۶ و ۷ به ترتیب $\times 9291$ و $\times 24450$. (Pp) پیش پلاست، (Er) شبکه آندوپلاسمی، (M) میتوکندری، (Pol) پلی‌زوم.

Figs. 6 & 7. Transmission electron microscopy: Epithelial cells of the scutellum in dormant seed ($\times 9291$ & $\times 24450$). Proplast (Pp), Endoplasmic reticulum (Er), Mitochondria (M), Polysome (Pol).



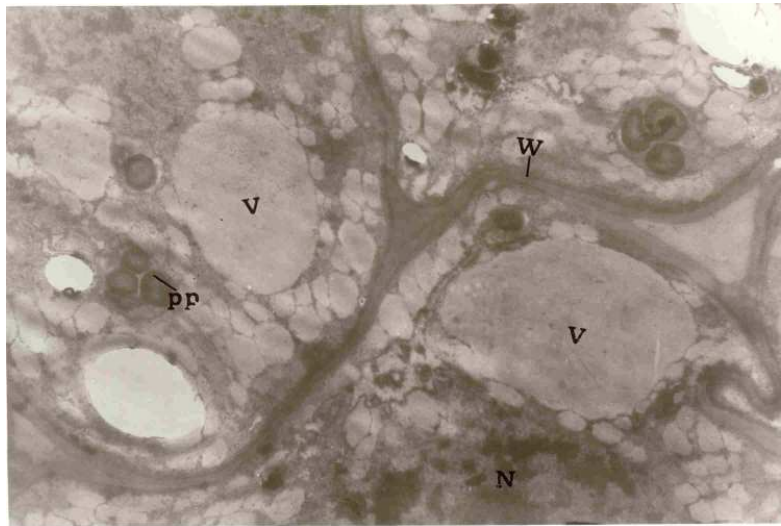
8



9

شکل ۸ و ۹- مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن: سلول‌های اندوخته‌ای در بذر غیرخفته. شکل‌های ۸ و ۹ به ترتیب $\times 8930$ و $\times 11573$. (V) واکوئل، (En) سلول‌های اندوخته‌ای.

Figs. 8 & 9. Transmission electron microscopy: Endospermal cells in nondormant seed. (x 8930 & x 11573). Vacuole (V), Endospermal cells (En).



شکل ۱۰- مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن: سلول‌های اندوخته‌ای در بذر خفته (x 24450).

Fig. 10. Transmission electron microscopy: Endospermal cells in dormant seed (x 24450).

بحث

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که پس از جذب آب، تغییرات ساختاری و فراساختاری در بذر غیرخفته به وجود آمد. این تغییرات در بذر خفته مشاهده نشد، به طوری که رشد شعاعی سلول‌های روپوششی لپه تنها در بذر غیر خفته مشاهده گردید. پدیده فوق با مشاهدات راتو و راجو (Rao & Raju 1985) موافق بود. آنها رشد شعاعی سلول‌های روپوششی لپه را پس از جذب آب در بذر غیر خفته *A. fatua* مشاهده کردند و دلیل آن را توسعه سطح سلول جهت جذب بیشتر مواد هضم شده برای انتقال به رویان ذکر نمودند. پدیده فوق در روند جوانه زنی بذر ذرت (*Zea mays*) نیز توسط زامسکی (Zamski 1973) مشاهده گردید. هضم چربی، دانه‌های آلورون و تشکیل یک واکوئل بزرگ در سیتوپلاسمی رقیق در نتیجه فعال شدن آنزیم‌های درون سلول بذر غیر خفته پس از جذب آب بود. افزایش تعداد میتوکندری‌ها در سلول‌های مذکور مبین افزایش تنفس سلولی و فعالیت سلول‌ها در بذر غیر خفته بود که در تجزیه ذخایر و تولید انرژی نقش داشت. افزایش و تجمع پلی زوم‌ها و توسعه شبکه آندوپلاسمی صاف و دانه دار نیز در جهت انتقال مواد و نیز سنتز پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در بذر غیر خفته مشاهده گردید. در بذر خفته چنین تغییراتی مشاهده نشد و عدم حضور یا عدم افزایش تعداد اندامک‌های فوق الذکر موجب غیر فعال ماندن سلول‌ها و استمرار خفتگی در آنها شد. در نتیجه،

باقی ماندن ذخایر و عدم تجهیز و انتقال آنها به رویان در ابقای خفتگی موثر بود. با توجه به مشاهدات فوق پدیده خفتگی در بذر یولاف وحشی به سطوح درون سلولی بستگی داشت که تغییرات در این سطوح در حذف خفتگی و جوانه زنی بذور مؤثر است. سلیمی و همکاران (Salimi et al. 1998) حضور دو باند پلی پپتیدی در بذور خفته و ناپدید شدن آنها و ظهور ۸ باند پلی پپتیدی جدید را در بذور غیر خفته یولاف وحشی نشان دادند که موافق با تغییرات درون سلولی مشاهده شده بود. مشاهدات فوق احتمال دخالت ژن‌ها را در پدیده خفتگی نشان داد.

سپاسگزاری

از خانم مهندس شهلا امینی کارشناس شرکت داروپخش جهت همکاری در تهیه برش‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 2-3 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: حمیرا سلیمی و دکتر نوح شهرآیین، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵؛ دکترمه لقا قربانلی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تربیت معلم و دکتر بهروز شاهسون بهبودی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران.

References

- BAILIN, L. and FOLEY, M. E. 1994. Differential polypeptide patterns in imbibed dormant and after-ripened *Avena fatua* embryos. *Journal of Experimental Botany* 45: 275- 279.
- BEHBODY, SH. B. 1984. Guide book of cytological laboratory, Department of Biology, Tehran University.
- BEWLEY, J. D. and BLACK, M. 1978. *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. I. Development, Germination and Growth.* Springer-verlag, Berlin.
- DYKSTRA, M. J. 1993. *A manual of applied technic for biological electron microscopy.* Plenum Press.
- FINCHER, G. B. 1989. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization germination cereal grains. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 40: 305-346.
- NAYLOR, J. M. 1966. Dormancy studies in seed of *Avena fatua* 5. On the response of aleurone cells to gibberelic acid. *Can. J. Bot.* 44 : 19-22.
- NEGBI, M. 1984. The structure and the function of the scutellum in the Gramineae. *Bot. J. Linn. Soc.* 88: 205-222.
- NEGBI, M. and SARGENT, J. A. 1986. The scutellum of *Avena*: a structure to maximize exploitation of endosperm reserves. *Bot. J. Linn. Soc.* 93: 247-258.
- RAO, D. V. and RAJU. M.V. 1985. Radial elongation of the epidermal cell of scutellum during caryopsis germination of wild oats (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* 63: 1789-1793.
- SALIMI, H., GHORBANLI, M. and BEHBODY, SH. B. 1998. Physiological basis of seed dormancy in wild oats (*Avena ludoviciana*). 6th EWRS Mediteranean Symposium, Montpellier, France: 231.
- SALIMI, H. and GHORBANLI, M. 2001. A study on seed germination of *Avena ludoviciana* and the effective factors in seed dormancy breaking. *Rostaniha* 2: 41-55.
- ZAMSKI, E. 1973. Light and electron microscope observations on scutellum epithelial cells during germination of *Zea mays* seeds. *Israel Journal of Botany* 22: 211-230.