Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸، صفحه ۱ تا صفحه ۱۳

بررسی مراحل تکوینی سلول‌های پاپی کلاله تاتوره (*Datura stramonium* L.)

حسن قاسم‌پور[۱]، محبوبه علی اصغرپور[۲]، علی موافقی[۲]، محمدرضا دادپور[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه زیست شناسی،دانشگاه پیام نور مرکز زنجان. **h.ghasempour@gmail.com**

۲- استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز.

۳- استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

تاریخ دریافت: ۸۷/٦/٤ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۲

چکیده

تاتوره (*Datura stramonium* L.) گیاه سمی و دارویی از تیره سولاناسه با گل‌های سفید، جام گل شیپوری، پنج پرچم، دو برچه متصل و کلاله‌ای از نوع مرطوب و پاپی‌دار می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی مراحل تکوینی سلول‌های پاپی و مشاهده آن توسط میکروسکوپ‌های نوری و فلورسانس است. پس از جمع‌آوری گل‌های گیاه در اندازه‌های متفاوت و جدا نمودن غنچه‌های ۷۵-۵ میلی متری، جهت بررسی بافت شناسی پس از مراحل بلوک‌گیری و برش‌گیری توسط اولترا میکروتوم، برش‌های نیمه نازک با تولوئیدین بلو برای میکروسکوپ نوری و اورامین *O* برای مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس در طول موج‌های ٤۹۰-۳۸۰ نانومتر، رنگ آمیزی شدند. بررسی‌های میکروسکوپی مشخص نمود، سلول‌های پاپی تک سلولی، منشا گرفته از اپی درم بوده و در طی نمو سطح کلاله را پوشانده و در نهایت لیز و از کلاله جدا می‌شوند. در طی مراحل نمو، پاپی‌ها و سلول‌های بافت‌های زیرین آن‌ها فعالیت ترشحی داشتند. ترشح ترکیبات لیپیدی این سلول‌ها در غنچه‌های ۲۵-۲۰ میلی متری آغاز و با پیشرفت نمو میزان تراکم ترشحات افزایش می‌یابد به طوری که در کلاله‌ی بالغ غنچه‌های ۶۰-۴۵ میلی متری با الحاق قطرات لیپیدی، اجسام لیپیدی در زیر لایه کوتیکول و در سطح کلاله به وجود می‌آورند. این روند باعث پیدایش گسستگی‌هایی در کوتیکول گردیده و منجر به جدا شدن و فاصله گرفتن آن از دیواره سلولی می‌گردد. بر اساس این مشاهدات ترشحات لیپیدی از طریق این شکستگی‌ها به سطح کلاله رسیده و وجود این گسستگی‌ها عبور ترشحات لیپیدی که از طریق کوتیکول نازک صورت می‌گیرد را تسهیل می‌نماید.

کلید واژه: تکوین پاپی، تاتوره، اولترا میکروتوم، قطرات لیپیدی.

مقدمه

کلاله بخشی از مادگی است که دانه گرده در زمان گرده افشانی روی آن قرار گرفته و در گونه‌های مختلف شکل کلاله‌های بالغ متفاوت است (۱). کلاله‌ها در حضور یا فقدان ترشحات در سطح کلاله بالغ به دو دسته مرطوب یا خشک تقسیم بندی می‌شوند (۲). طبقه‌بندی دیگر و کامل‌تری نیز با در نظر گرفتن جزییات از جمله نوع ترشحات، مقدار آب، قند، پروتئین، لیپید، آنزیم، آمینواسید، کلسیم، آرابینوزگالاکتان، فنل و ترکیبات هتروژن حاصل مخلوط این مواد مورد توجه قرار گرفته است (۳). بر اساس حضور یا فقدان سلول‌های کرک مانند پاپی (Papillae) که در سطح کلاله برخی از گیاهان به صورت منفرد یا مرکب قرار گرفته، گیاهان به

www.SID.ir

Archive of SID

گروه‌های فرعی‌تری نیز طبقه‌بندی می‌گردند (۸، ۷، ۶، ۵، ۴ و۱). مشاهده کلاله در سطح استرئومیکروسکوپ نشان دهنده ساختمان دولبی و متقارن و پوشیده از کرک‌های کوچک (پاپی) می‌باشد. پاپی‌ها، سلول‌های برجسته‌ای در سطح کلاله هستند که با تکوین کلاله، کشیده‌تر شده و از سلول‌های مجاور خود جدا می‌گردند. این سلول‌ها انتهای مدوری داشته و تنها در قسمت قاعده‌ای با سلول‌های زیرین و سلول‌های مجاور متصل می‌باشند. اگر چه سطح کلاله یک گل، پناهگاه تیپ‌های مختلفی از دانه‌های گرده می‌باشد، ولی مکانیزم‌های فیزیولوژیکی وجود دارند که موجب می‌گردد تنها دانه گرده درون گونه‌ای (Intraspecific) قابلیت جوانه زدن پیدا کرده و لوله گرده را بر روی کلاله به وجود آورد (۱۲، ۱۱، ۱۰ و۹). مکانیسم شناسایی دانه‌ی گرده‌ی سازگار توسط سلول‌های پاپی از طریق واکنش‌های مولکولی بین مواد دیواره دانه گرده و روپوستک (Pellicle) و یا واکنش با ترشحات کلاله‌ای انجام می‌شود. این میان کنش‌ها از زمان آب گیری دانه گرده آغاز می‌شود (۱۵، ۱۴ و۱۳).

سطح سلول‌های کلاله در مراحل اولیه توسعه، با یک لایه کوتیکول پوشیده می‌شود. در برخی از گیاهان نهاندانه‌ی دولپه‌ای و تک لپه‌ای تیپ خشک بر روی این لایه کوتیکول، یک پوشش خارجی که توسط سلول‌ها ترشح می‌شوند، قرار می‌گیرد که به روپوستک معروف است و ضخامتی در حدود ۱۵ الی۲۰ نانومتر دارد. در تک لپه‌ای‌هایی نظیر زعفران و گلایول ترشح روپوستک زمانی صورت می‌گیردکه کلاله برای پذیرش دانه گرده آماده باشد (۱۶). جزییات ساختمانی روپوستک هنوز به طور کامل مشخص نشده است. روپوستک در به دام انداختن، آب گیری دانه گرده و در شناسایی دانه گرده در طول واکنش‌های متقابل بین کلاله و دانه گرده نقش عمده‌ای را بر عهده دارد (۱۹، ۱۸ و ۱۷). در سال‌های اخیر بررسی‌های ساختاری و فراساختاری کلاله در تیره سیب زمینی به طور گسترده‌ای درگونه‌های اطلسی (۲۰)، گوجه فرنگی (۲۱)، توتون (۸) و سیب زمینی تجارتی (۲) مورد بررسی قرار گرفته است. کلاله تاتوره برای اولین بار در سال ۱۹۴۴ در سطح میکروسکوپ نوری توسط ساتینا (Satina) مورد مطالعه قرار گرفته است. حسینی در سال ۱۳۸۴ کلاله آن را در سطح میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره (S.E.M) بررسی کرده است. صومعه در سال ۱۳۸۶ ترشحات کلاله گل را از نظر هیستوشیمیایی، بیوشیمیایی و مداح در سال ۱۳۸۶ بافت ترشحی کلاله گل را در سطح فراساختاری، مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۲). کار پژوهشی حاضر در ادامه بررسی‌های قبلی و در جهت تکمیل نتایج به دست آمده از پژوهش‌های پیشین انجام گردیده و یکی از اهداف آن کسب دانش کافی در زمینه ساختار کلاله است، این اطلاعات قطعاً در زمینه‌های تولید مثل و تکثیر این گونه مثمر ثمر خواهد بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

جمع‌آوری گل‌های تاتوره در تاریخ ۸۱/۹/۱ و ۸۲/۴/۱ از پایه‌های رشد یافته در منطقه چای کنار تبریز انجام گردید. غنچه‌های جدا شده برحسب اندازه و طول به ۱۵ گروه تقسیم بندی شدند (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- طبقه بندی کلاله تاتوره بر حسب اندازه و طول غنچه

گروه	طول غنچه	مرحله ریخت شناسی	مراحل
۱	۵	کاسبرگ‌های چسبیده به هم (غنچه‌های بسته)	هیستوژنز
۲	۱۰		
۳	۱۵		
٤	۲۰	جدا شدن انتهای کاسبرگ غنچه‌ها	رشد و نمو
٥	۲۵		
٦	۳۰		
۷	۳۵	وجود گلبرگ‌های سبز رنگ در پوشش کاسبرگ	
۸	۴۰		
۹	۴۵	خارج شدن گلبرگ سبز از کاسبرگ	بلوغ و گرده افشانی
۱۰	۵۰	ظاهر شدن گلبرگ‌های سبز مایل به زرد	
۱۱	۵۵	تغییر رنگ گلبرگ‌ها به رنگ زرد	
۱۲	۶۰	بزرگ شدن گلبرگ‌های زرد رنگ	
۱۳	۶۵	شکفته شدن گل(تغییررنگ گلبرگ به سفید)	بعد از گرده افشانی
۱٤	۷۰	شکفته شدن گل به طور کامل	
۱۵	۷۵	مراحل از بین رفتن گل	

مراحل آماده سازی نمونه‌ها جهت تهیه برش‌های نیمه نازک و مشاهده توسط میکروسکوپ نوری و فلوروسانس

از نمونه‌های ۰/۵ میلی متری بر اساس روش‌های استاندارد آماده سازی (مراحل تثبیت‌های اولیه و ثانویه، آب گیری، شفاف سازی، آغشته سازی با رزین، قالب گیری، پلی مریزاسیون) برش‌های نیم‌نازک (Semithin) با اولترامیکروتوم به ضخامت ۱ تا ۲ میکرومتر تهیه شده و با معرف‌های مختلف رنگی از جمله تولوئیدین بلو ۲٪ (رنگ‌آمیزی دیواره‌های سلولی هسته و ذرات لیپیدی داخل واکوئل و سیتوپلاسم)، نیل بلوسولفات ۱٪ محلول در اسید استیک (لیپیدهای خنثی در این رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز و لیپیدهای اسیدی به رنگ آبی) جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری رنگ آمیزی شدند (۲۶، ۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۲، ۸، ۵ و ۲).

اغلب ترکیبات سلولی با استفاده از فلوئوکروم‌ها به حالت درخشان درآمده و تحت تأثیر پرتوهای فرابنفش، فلوئورسانس ثانویه ایجاد می‌نمایند. اورامین O فلوئوکرومی است که ترکیبات کوتینی را به رنگ زرد درخشان درمی‌آورد. در این پژوهش برای بررسی ترکیب سطح سلول‌های کلاله گیاه تاتوره از اورامین O ۰/۰۱٪ در بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH=۷/۵ به مدت ۵ دقیقه استفاده شده و با استفاده از میکروسکوپ دیجیتالی فلورسنت لایه کوتیکول سلول‌های پاپی سطح کلاله در مراحل مختلف مورد بررسی قرار گرفت (۲۷، ۸، ۶ و ۲).

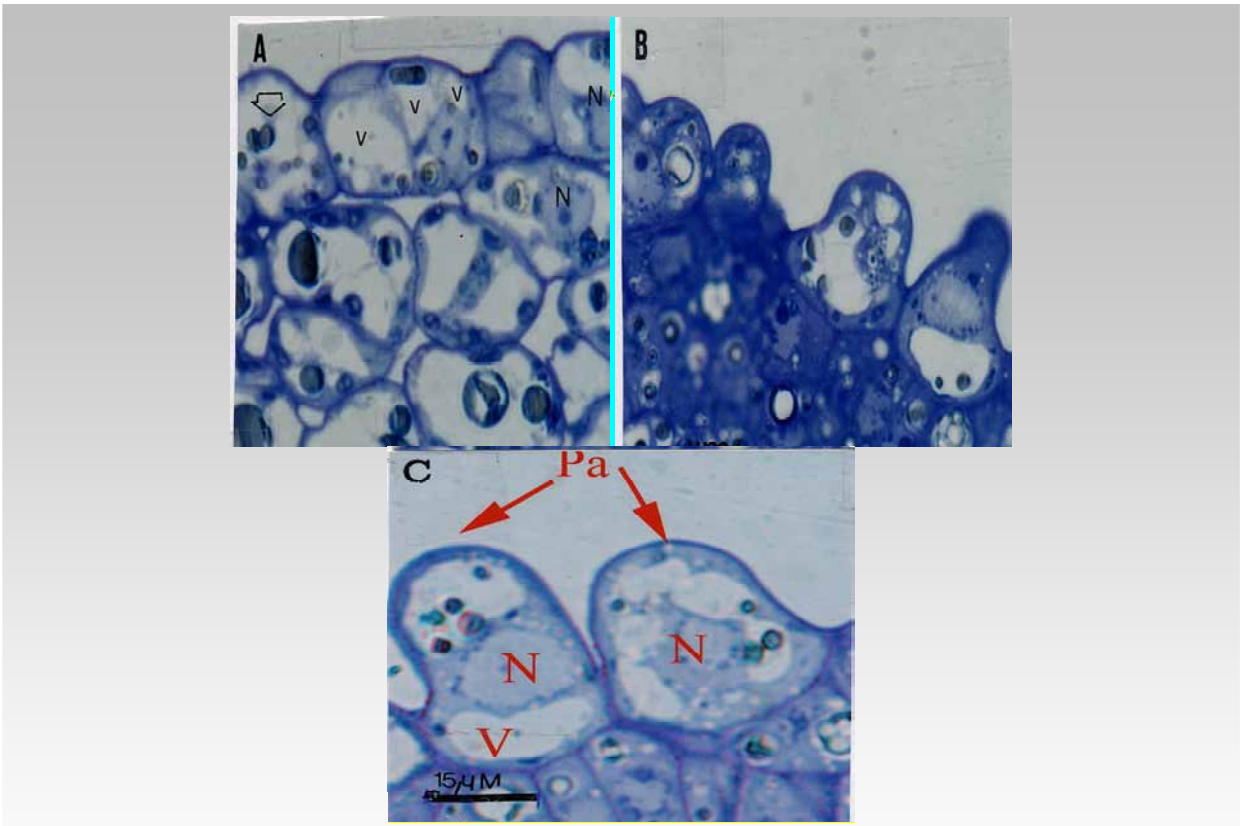
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

سلول‌های پاپی تاتوره در مرحله هیستوژنز کلاله (غنچه‌های ۱۵-۵ میلی متری)

برش‌های نیم نازک در اولین مراحل شکل گیری کلاله (غنچه‌های ۵ میلی متری) تشکیل زودرس پاپی‌ها را نشان می‌دهند، اگر چه در این مرحله سلول‌های پاپی برجسته و کشیده نیستند، ولی با دارا بودن برخی ویژگی‌های سیتولوژیکی کاملاً از سلول‌های زیرین قابل تشخیص می‌باشند (شکل ۱A). از اواسط مرحله هیستوژنز دیواره خارجی سلول‌های اپی درمی در سطح کلاله به تدریج برآمده شده و به سلول‌های کم و بیش مدوری تبدیل می شوند (اشکال ۱Bو ۲B). پاپی‌ها در اواخر این مرحله به صورت سلول‌هایی نسبتاً کشیده با سطح کوتیکولی هستند که از سلول‌های اپی درمی کاملاً متمایز شده‌اند (اشکال ۱C و ۲A). پاپی و لایه کوتیکول سطح این سلول‌ها در میکروسکوپ فلوئورسنت با پدیده اتوفلوئورسانس قابل مشاهده است (شکل ۲A). در سیتوپلاسم پاپی‌ها، تعدادی واکوئل کوچک وجود دارد که به تدریج بر اندازهٔ آن‌ها افزوده شده و در هم ادغام می‌شوند. رنگ آمیزی پاپی‌ها در این مرحله از رشد با آبی تولوئیدین نشان دهنده وجود تعدادی قطرات سبز مایل به آبی در درون واکوئل‌هاست که احتمالاً ماهیت پروتئوپلی‌فنولی دارند (اشکال ۲B و۱C).

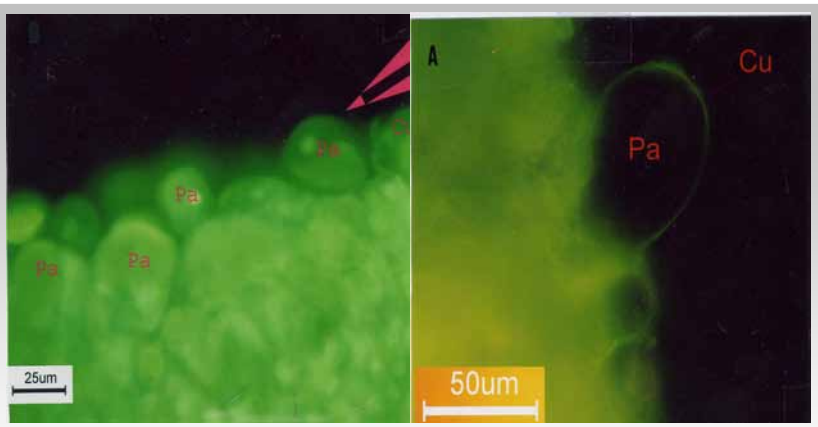


شکل ۱- بر ش‌های نیم نازک کلاله تاتوره در مرحله هیستوژنز (غنچه‌های ۱۵-۵ میلی متری) با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو ۲٪

A) سلول‌های اپی درمی و زیر اپی درمی: هسته بزرگ و هستک درون آن مشخص است واکوئل‌های کوچک و اجزاء گرد داخل آن وجود دارد B) سلول‌های پاپی در این مرحله برجسته و کشیده هستند با دارا بودن دیواره سلولی نازک، سیتوپلاسم متراکم، هسته بزرگ و واکوئل‌های کوچک متعدد از سلول‌های زیرین قابل تمیز هستند C) دو سلول پاپی در غنچه‌های ۱۵ میلی متری: پاپی‌ها از نظر طولی کشیده، هسته بزرگ و حداقل یک هستک درون آن قابل مشاهده و واکوئل‌های کوچک و قطراتی به رنگ آبی در داخل آن وجود دارد. هسته=N، واکوئل = V، سلول پاپی=Pa

www.SID.ir

Archive of SID

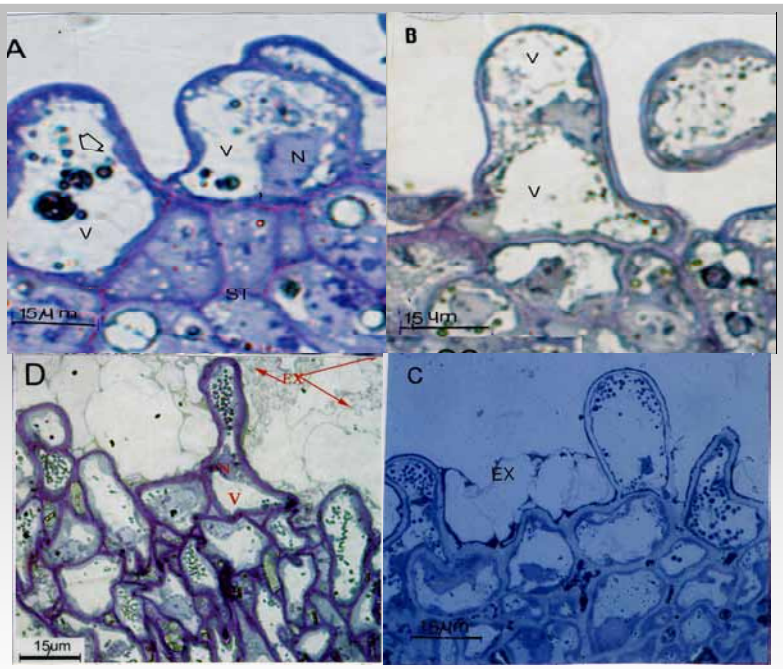


شکل ۲- فلوروسانس سلول‌های پاپی در مرحله هیستوژنز (غنچه‌های ۱۵-۵ میلی متری)

A) لایه کوتیکول پاپی در غنچه‌های ۱۵ میلی متری در زیر میکروسکوپ فلوروسنت با نور آبی (۴۹۰-۴۵۰) به صورت اتو فلوروسانس قابل مشاهده است.B) لایه کوتیکول پاپی در غنچه‌های ۱۰ میلی متری که با فلوئوروکروم اورامین O در زیر میکروسکوپ فلوروسنت نور آبی (۴۹۰-۴۵۰) به صورت فلوروسانس قابل مشاهده است. کوتیکول= Cu پاپی=Pa

پاپی‌های تاتوره در مرحله رشد و نمو کلاله (غنچه‌های ٤٠ – ٢٠ میلی متری)

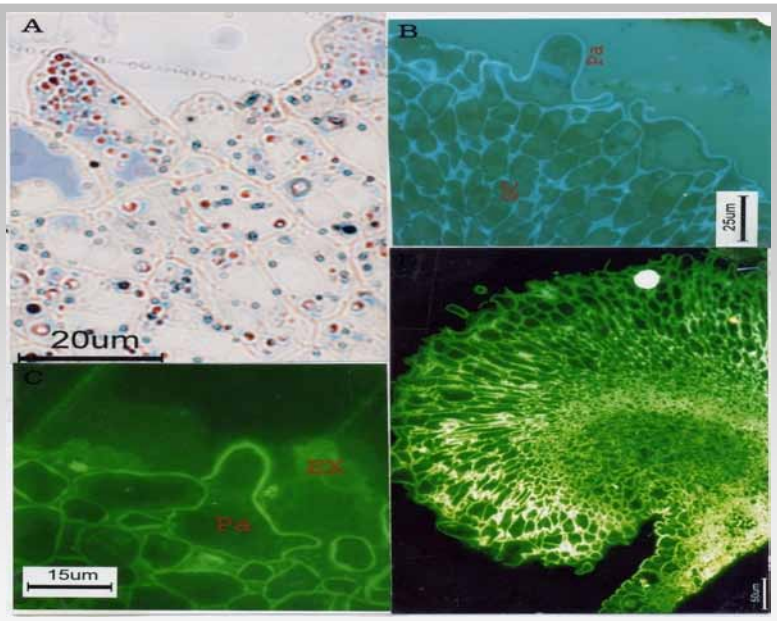
پاپی‌ها در این مرحله از سلول‌های تحتانی کاملاً قابل تشخیص بوده و در قسمت رأسی کشیده و در قسمت قاعده پهن و حجیم هستند (اشکال۵D، ۵B، ۴Aو ۳D). افزایش طولی پاپی‌ها باعث شده آن‌ها را از سلول‌های اپی‌درمی تشخیص داد. سلول‌ها دارای یک واکوئل مرکزی درشت، سیتوپلاسم تقلیل یافته به صورت نواری در بین واکوئل و دیواره سلولی می‌باشند (اشکال۳B و ۳C). در این مرحله فعالیت ترشحی بافت کلاله آغاز شده و مواد ترشحی در فضای بین سلولی سلول‌های ترشحی تجمع یافته و به طرف سطح کلاله جریان می‌یابد (اشکال ۴Bو ۴C). ذرات لیپیدی در داخل سلول با رنگ



شکل ۳- سلول‌های پاپی و سلول‌های ترشحی زیرین کلاله تاتوره در مرحله رشد و نمو (غنچه‌های ۴۰-۲۰ میلی متری) با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو ۲٪.A) پاپی کلاله در غنچه‌های ۲۰ میلی متری. B) افزایش پاپی کلاله در غنچه‌های ۲۵ میلی متری.C) سلول پاپی در غنچه‌های ۳۰ میلی متری. D) یک سلول پاپی در غنچه‌های ۴۰ میلی متری.

www.SID.ir

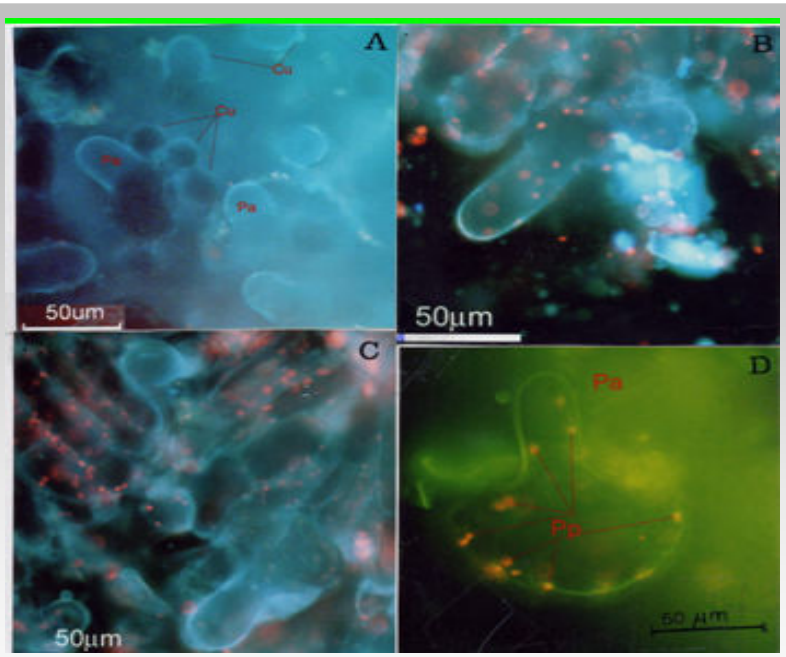
Archive of SID



شکل ٤-پاپی‌ها و سلول‌های زیرین آن در کلاله تاتوره، در مرحله رشد و نموکلاله (غنچه‌های ۴۰-۲۰ میلی متری).A) برش‌های نیم نازک کلاله در غنچه‌های ۲۵ میلی متری. B) برش‌های نیم نازک کلاله در غنچه‌های ۳۰ میلی متری. C) فتوگراف برش نیم نازک در غنچه‌های ۳۵ میلی متری. D) فتوگراف برش نیم نازک در غنچه‌های ۴۰ میلی متری.

آمیزی نیل بلو سولفات قابل مشاهده است (شکل 4A).

حرکت این ترشحات به سطح کلاله و اتصال سست پاپی‌ها به هم دیگر و به سلول‌های زیرین باعث جدا شدن بسیاری از پاپی‌ها از سطح کلاله می‌شود (اشکال 5D و 4D). مشاهده پاپی‌ها در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت نشان دهنده اتوفلوئورسانس لایه کوتیکول (شکل 5A) بوده و قطراتی در داخل سلول‌ها به رنگ قرمز تا صورتی قابل مشاهده است (شکل 5D).



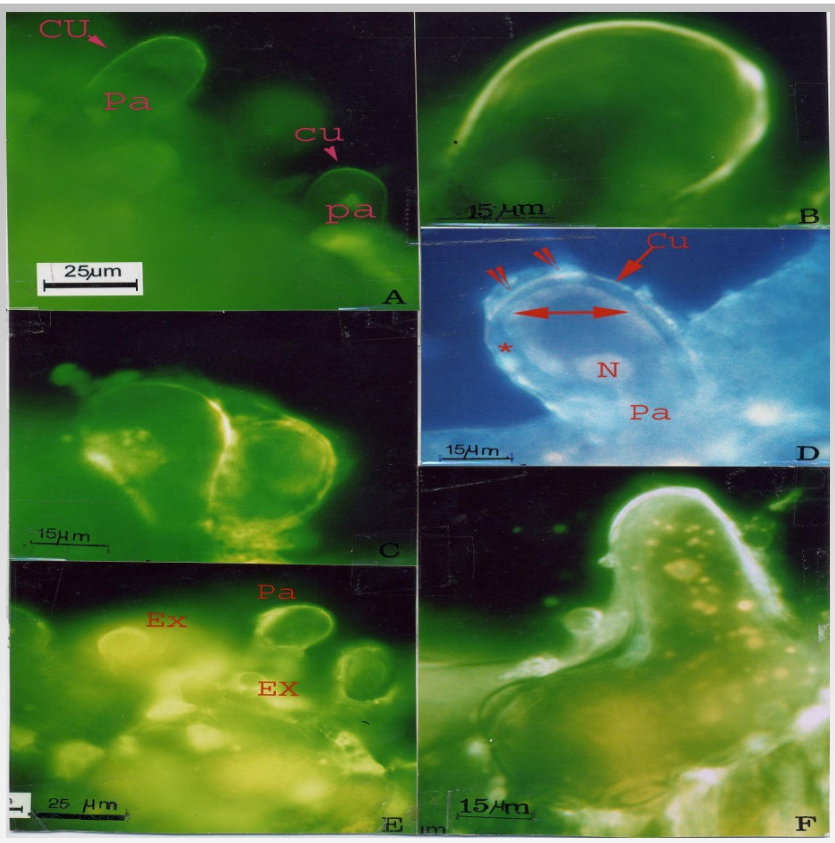
شکل ۵- اتو فلوروسانس سلول پاپی کلاله تاتوره در مرحله رشد و نمو

A) پاپی کلاله در غنچه‌های ۲۰ میلی متری. B) پاپی کلاله در غنچه‌های ۳۰ میلی متری.C) پاپی کلاله در غنچه‌های ۳۵ میلی متری D) اتو فلوروسانس قطرات پروتئوپلی فنولی در یک سلول پاپی کنده شده از سطح کلاله تاتوره در غنچه‌های ۴۰ میلی متری. کوتیکول= Cu، پاپی= Pa، پروتئوپلی فنولی=Pa

www.SID.ir

Archive of SID

انجام مشاهدات دقیق‌تر با رنگ آمیزی اورامین O در طول موج‌های ۴۹۰-۴۵۰ نانومترنشان داد که لایه کوتیکول به رنگ زرد طلایی تا سفید و قطرات ترشحی لیپیدی در برخی موارد مشخص (اشکال ۶B، ۶A و ۶D) و در بیش‌تر موارد لایه کوتیکول از ترکیبات ترشحی لیپیدی، غیرقابل تشخیص است (شکل ۶E) و انباشتگی و افزایش ترشحات لیپیدی زیر کوتیکولی را تنها با افزایش فلوئورسانس ایجاد شده، می‌توان تشخیص داد (شکل ۶F). تجمع زیر کوتیکولی این ترشحات باعث جدا شدن این لایه از سطح دیواره پاپی شده (شکل ۶C) و به نظر می‌رسد که افزایش انباشتگی ترشحات باعث کشیدگی و از هم گسیختگی این لایه بسیار نازک در بعضی از قسمت‌ها و در نتیجه دفع ترشحات به دام افتاده در زیر آن به بیرون وحتی احتمال تراوش ترکیبات لیپیدی از لایه کوتیکول نیز است (شکل ۶D). مشاهدات نشان داده که در داخل سلول قطراتی وجود دارندکه اتوفلوئورسانس قرمز در طول موج‌های ۴۵۰-۳۸۰ نانومتر از خود نشان می‌دهند. ماهیت آن‌ها قبلاًشناسایی شده است این قطرات با اورامین O فلوئورسانس زرد و زرد مایل به سفید نشان می‌دهند (شکل ۴A). فلوئورسانس ترکیبات ترشحی زیر کوتیکولی و بین سلولی یاخته‌های ترشحی با همان معرف و در همان طول موج، سفید تا آبی است (اشکال ۶Eو ۶F) رنگ آمیزی این قطرات با نیل بلو سولفات وجود ترکیبات لیپیدی کمپلکس با قطرات پروتئوپلی فنولی را تأیید می‌نماید (شکل ۴A).



شکل ٦- فلوروسنت سلول‌های پاپی تازه رنگ آمیزی شده با اورامینO

A) لایه بسیار نازک کوتیکول پاپی‌ها در غنچه‌های ۲۰ میلی متری. B) تجمع نقطه مواد ترشحی در زیر لایه کوتیکول پاپی در غنچه‌های ۳۰ میلی متری. C) تجمع و انباشتگی لیپیدی در زیر لایه کوتیکول سلول‌های پاپی تازه در غنچه‌های ۳۰ میلی متری.D) سلول‌های پاپی در غنچه‌های ۳۵ میلی متری. در این مرحله سلول‌ها کاملاً کشیده ترشحی شده و به صورت انگشت مانند است. E) سلول‌های پاپی در رأس کشیده و در قاعده پهن در غنچه‌های ۴۰ میلی متری.F) ترشحات سلول‌های پاپی با ماهیت قطرات زرد طلائی از نوع پروتئوپلی فنولی.

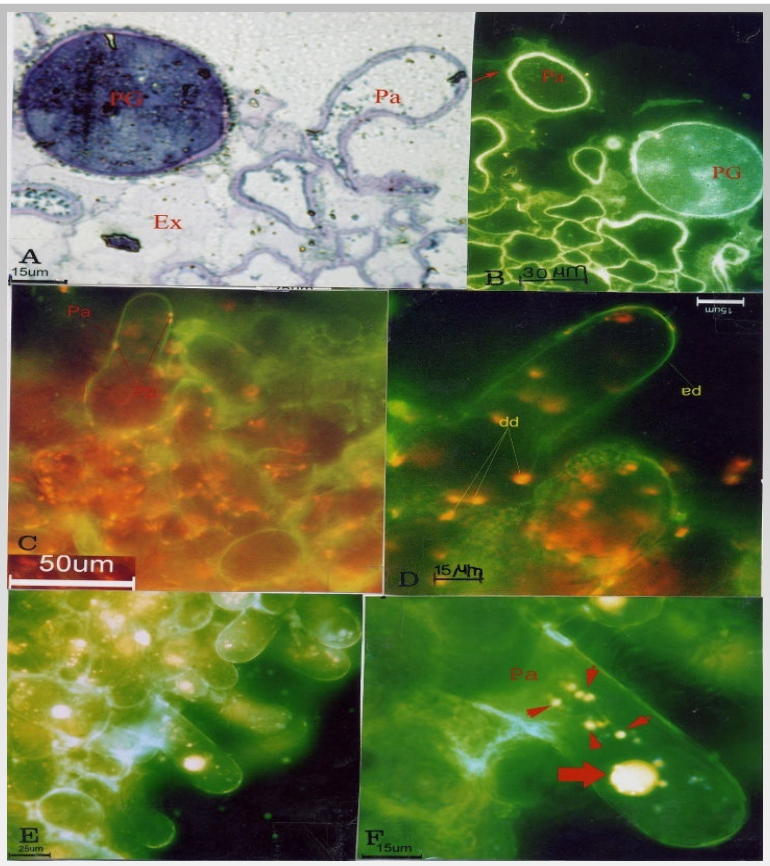
کوتیکول= Cu ، قطرات =D ، ترشحات =Ex، هسته=N، پاپی=Pa

www.SID.ir

Archive of SID

پاپی‌های تاتوره در مرحله بلوغ و گرده افشانی (غنچه‌های ٦٠ – ٤٥ میلی متری)

ترشحات لیپیدی آزاد شده در سطح کلاله، محیط مناسبی برای اتصال و رویش دانه‌های گرده است (اشکال ۷A و ۷B). تجمع ترشحات سطح کلاله و وجود تعداد زیادی دانه گرده بر روی آن، مشاهده پاپی‌ها را به صورت اتو فلوئورسانس و با فلوئوروکروم اورامین O با مشکل مواجه می‌سازد (شکل ۷E). از طرف دیگر فلوئورسانس مواد لیپیدی ترشحات با لایه کوتیکول، هم پوشانی داشته و به همین دلیل مشاهده این لایه و سلول‌های پاپی در بیش‌تر موارد غیر ممکن است. با این وجود قطرات درون سلولی در اوایل این مرحله کم (شکل ۷C و ۷D) و افزایش این قطرات در مراحل پایانی (اشکال ۷D و ۷F) چشم گیر است. پاپی‌ها و سلول‌های ترشحی از سطح کلاله به دنبال جریان یافتن مواد ترشحی از سلول‌های پاپی و ترشحی به سطح کلاله و رشد دانه‌های گرده، جدا شده و در ترشحات غوطه‌ور می‌شوند.



شکل ۷-پاپی تاتوره در مرحله بلوغ کلاله (غنچه‌های ٦٠-٤٥ میلی متری)

A) برش نیم نازک کلاله در غنچه‌های ۵۰ میلی متری با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو ۲٪، تجمع مواد ترشحی و حرکت آن‌ها به سطح کلاله باعث جدا شدن سلول‌های پاپی و سلول‌های ترشحی سطح کلاله شده است. واکوئل بزرگ مرکزی بیشترین حجم سلول پاپی را اشغال کرده و در درون آن قطرات متعدد قابل مشاهده است. دانه گرده در ترشحات سطح کلاله گیر افتاده است.

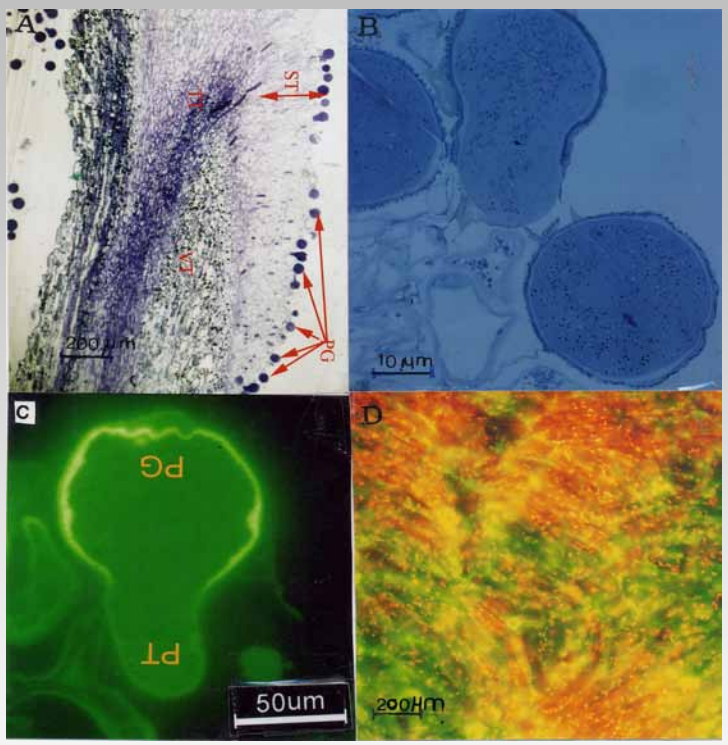
B) جدا شدن سلول‌های پاپی و سلول‌های ترشحی در غنچه‌های ۵۵ میلی متری و قرار گرفتن آن‌ها در ترشحات سطح کلاله و به دام افتادن دانه گرده در این ترشحات ژله مانند. C) یک سلول پاپی در غنچه‌های ۵۰ میلی متری که در رأس کشیده و در قاعده پهن.D) اتو فلوروسانس رأس سلول پاپی و قطرات پروتئوپلی فنولی سطح کلاله در غنچه‌های ۵۰ میلی متری. E) پاپی سطح کلاله و غنچه‌های ۶۰ میلی متری رنگ آمیزی شده با اورامین O. F) ترشحات سلول‌های پاپی با ماهیت قطرات زرد طلائی از نوع پروتئوپلی فنولی.

www.SID.ir

Archive of SID

پاپی‌های کلاله تاتوره در مرحله بعد از گرده افشانی (بزرگ تر از ۶۰ میلی متر و گل‌های شکفته)

بررسی برش‌های نیم نازک این مرحله با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو نشان دهنده مراحل پایانی حیات بسیاری از پاپی‌ها و سلول‌های ترشحی سطح کلاله است (اشکال ۸A و ۸B). بافت کلاله در این مرحله به شدت نرم بوده و سلول‌های پاپی در هم پاشیده به همراه ترکیبات ترشحی، سطح کلاله را پوشش می‌دهند (اشکال ۸B و ۸D). رویش دانه گرده در سطح کلاله و نفوذ لوله‌های گرده رشد یافته به داخل بافت ترشحی در بسیاری از برش‌های نیم نازک را می‌توان مشاهده کرد. پاپی‌ها و سلول‌های ترشحی در این مرحله استحکام دیواره خود را کاملاً از دست داده و به اشکال نامنظم و به صورت مچاله شده (شکل ۸C و ۸B) در مقاطع میکروسکوپی و در نمونه‌های تازه درون سلولی پاپی‌ها و سلول‌های ترشحی آزاد شده‌اند. این ترکیبات قطعاً در رشد لوله گرده بعد از مرحله گرده افشانی نقش اساسی دارند.



شکل ۸- سطح کلاله در مرحله بعد از گرده افشانی (غنچه‌های بزرگ تر از ۶۰ میلی متر)

A) مراحل مختلف رشد دانه گرده بر روی سطح کلاله در غنچه‌های ۷۰ میلی متری: سلول پاپی و بسیاری از سلول‌های زیرین آن شکل طبیعی خود را از دست داده اند. B) دانه گرده در میان سلول‌های پاپی و ترشحی در حال از هم پاشیدن، برش نیم نازک کلاله غنچه‌های ۷۵ میلی متری. C) دانه گرده در حال رویش که در داخل ترشحات سطح کلاله در غنچه‌های ۷۵ میلی متری به دام افتاده است. D) اتو فلوروسانس قطرات پروتئوپلی فنولی نمونه‌های تازه کلاله در غنچه‌های ۷۰ میلی متری. دانه گرده= PG لوله گرده= PT

بحث

بر اساس مشاهدات حاصل از میکروسکوپ نوری پاپی‌های کلاله تاتوره در مراحل اولیه تشکیل، از سلول‌های اپی درمی قابل تشخیص نمی‌باشند، ولی همراه با رشد و تمایز کلاله این سلول‌ها، واکوئلیزه شده و از سلول‌های اپی درمی متمایز می‌شوند. در طول تکوین کلاله، این سلول‌ها کشیده و کشیده‌تر شده و در نهایت

www.SID.ir

Archive of SID

تبدیل به پاپی (کرک‌های کوچک) می‌گردند. در مراحل اولیه تکوینی، پاپی‌ها اگرچه از لحاظ شکل و اندازه متفاوت از یکدیگر بوده ولی با داشتن برخی ویژگی‌ها از جمله اندازه نسبتاً بزرگ سلول، سیتوپلاسم متراکم و هسته درشت قابل تشخیص می‌باشند. فعالیت ترشحی پاپی‌ها و دیگر یاخته‌های ترشحی کلاله، خیلی زود اتفاق می‌افتد. تجمع بین سلولی ترشحات، در سلول‌های ترشحی و جریان آن‌ها به سطح کلاله باعث جدا شدن بسیاری از پاپی‌ها و یاخته‌های ترشحی در مراحل رشد، نمو و بلوغ کلاله از سطح آن می شود،که مشابه یافته‌های Mackenzie و همکارانش بر روی گیاه سیب زمینی است (۲). سلول‌های کنده شده از سطح کلاله تاتوره به صورت غوطه ور در ترشحات ژله مانند کلاله‌ای قرار می‌گیرد. جدا شدن پاپی‌ها از سطح کلاله تاتوره در مراحل اولیه رشدو نمو باعث طبقه بندی کلاله این گیاه در گروه کلاله‌های مرطوب بدون پاپی شده است. بررسی‌های انجام شده در سطح میکروسکوپ نوری نشان داده است که این نوع کلاله می‌تواند در گروه سوم (کلاله‌های مرطوب پاپی دار) از طبقه بندی Harrison–Heslop و Shivanna قرار گیرد (۲۸، ۲۲ و۱۷). در مرحله بلوغ و گرده افشانی حجم ترشحات به حدی است که تمام سطح کلاله را پوشش می‌دهد. انبوه ترشحات سطحی کلاله موجب غوطه ور شدن دانه‌های گرده پس از گرده افشانی و رویش دانه‌های گرده و نفوذ لوله‌های آن در بافت‌های ترشحی و هدایت کننده کلاله می‌شود. جدا شدن سلول‌های سطحی کلاله در زمان گرده افشانی را می‌توان در گل‌های شکفته گیاه *Prunus avium* مشاهده کرد (۲۷ و ۲۳). در تاتوره سیتوپلاسم پاپی‌ها کاملاً تحلیل رفته و به نظر می‌رسد که دیواره سلول‌های پاپی عموماً استحکام خود را از دست داده و به اشکال مچاله شده در داخل ترشحات کلاله‌ای قرار بگیرد (۲۲). مراحل تشکیل کلاله گل تاتوره مشابه با تشکیل کلاله گیاهان *Lycopersicum pervianum* (۲۱) و کلاله سیب زمینی (*Solonum taberosum*) (۲) است.

تغییرات ساختاری پاپی‌های تاتوره در جریان تکوین کلاله در سطح میکروسکوپ نوری

پاپی‌های کلاله تاتوره با توجه به توانایی سنتز و دفع بعضی از ترکیبات شیمیایی (با ماهیت لیپیدی) در گروه یاخته‌های ترشحی قرار می‌گیرند. سلول‌های ترشحی نسبت به سلول‌های غیرترشحی از فعالیت‌های متابولیسمی بالاتری برخوردار می‌باشند (۳۲، ۳۰،۳۱، ۲۹، ۲۵، ۲۳، ۲۰ و ۲). پاپی‌های تاتوره مشابه سلول‌های پاپی کلاله گیاهان *Hypericum calycinum* (۲۸)،گیاه *Ornithogalum* (۱۶)، گیاه*Olea europaea* (۱۲) و گیاه *Tiboachina semidecandra* می‌باشد (۳). در این گونه‌های گیاهی اجسام لیپیدی ساخته شده در پاپی‌های کلاله در زیر لایه کوتیکول تجمع می‌یابند. مدل تولید ترشحات کلاله در گیاه تاتوره مشابه سایر کلاله‌های مرطوب گیاهان از جمله *Lycopersicum pervianum* (۲۱)، گیاه *Tiboachina semidecandra* (۳)، گیاه اطلسی (۲۰)، گیاه *Olea euopaea* (۱۲)، گیاه*Lycopersico esculentum* (۴) و گیاه توتون (۸) است. در تمام این گونه‌ها، ترکیبات ترشحی ساخته شده در سلول‌های ترشحی، در بین دیواره‌های سلولی و فضاهای بین سلولی به صورت قطراتی تجمع یافته است و با الحاق قطرات در هم دیگر یک لایه با دانسیته الکترونی بالا را در سطح کلاله‌های بالغ بوجود می‌آورند. بررسی‌های انجام شده بر روی قطرات اسمیوفیل توسط حسینی و صومعه در سال‌های ۱۳۸۴ و ۱۳۸۷ نشان دهنده ماهیت پروتئوپلی فنولی این ترکیبات است (۲۲). ترکیبات فنولیکی واکوئل‌ها ترکیباتی هستند که پدیده اتوفلوئورسانس را به صورت رایج در سلول‌های گیاهی نشان می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

علاوه بر این ماده لیگنین در دیواره‌های آوندهای چوبی، کلروپلاست‌ها، دانه‌های نشاسته در سلول‌های گیاهی خاصیت اتوفلوئورسانس دارند (۳۳، ۸ و۴). بررسی سلول‌های پاپی در این مرحله در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت در طول موج‌های ۴۹۰ - ۴۵۰ ناتومتر نشان دهنده اتوفلوئورسانس این قطرات به رنگ صورتی - قهوه‌ای است. اتوفلوئورسانس ترکیبات فنولیک به رنگ قرمز - قهوه‌ای را در ترکیبات ترشحی و در سلول‌های غدد پرچم گیاه *Thyptomene calycina* تحت تاثیر همان طول موج می‌توان مشاهده کرد (۳۲). رنگ آمیزی پاپی‌ها در نمونه‌های تازه با اورامین O در همان طول موج‌ها، قطراتی را به رنگ زرد طلایی در داخل سلول‌ها آشکار می‌کند. فلورسانس این قطرات با اورامین O نشان دهنده وجود ترکیبات لیپیدی است که به دلیل مشکلات آشکارسازی لیپیدهای متصل به پروتئین، با تست‌های سیتوشیمیایی رایج در بررسی‌های قبلی شناسایی نشده است. فلوئورسانس ترکیبات لیپیدی در ترشحات و در درون سلول‌های برش خورده با استفاده از رنگ آمیزی اورامین O در زیر میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده است (۶). *Ciompolini* و همکارانش در سال ۱۹۹۵ گیاه *Tiboachina semidecandra* را مورد بررسی قرار دادند (۱). در سلول‌های پاپی این گیاهان، انباشتگی ترکیبات به شدت اسمیوفیل در درون واکوئل از جنس تانن شناسایی شده است. Cresti و همکارانش در سال ۱۹۹۶ با بررسی پاپی‌های گیاه انگور (*Vitis vinifera*) به وجود یک واکوئل بزرگ مرکزی در سیتوپلاسم سلول‌ها اشاره کرده است (۵). ماهیت تاننی این اجزا با رنگ آمیزی ترکیبی آزور ۲ /متیلن بلو (Methylen blue/AzureII) به اثبات رسیده است. بررسی سلول‌های پاپی در گیاه *Corylus avellana* توسط Ciampolini و همکارانش در سال ۱۹۹۸، به وجود چندین واکوئل بزرگ با مواد الکتروالانس، کدر و از جنس تانن اشاره کرده‌اند (۷). بر روی دیواره سلول‌های پاپی تاتوره، لایه کوتیکول وجود دارد. وجود انبوهی از موم‌های متنوع یکی از فاکتورهایی است که به آن خاصیت نفوذ پذیری می‌دهد، یک لایه کوتیکول غنی از موم، ترکیبات محلول در چربی‌ها را از خود عبور می‌دهد. اما به عنوان سدی در مقابل ترکیبات محلول در آب عمل می‌کند (۵). این لایه در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت در طول موج‌های ۴۵۰-۳۸۰ و ۴۹۰-۴۵۰ ناتومتر به صورت اتوفلوئورسانس قابل مشاهده است. رنگ آمیزی این لایه با اورامین O باعث فلوئورسانس شدید این لایه می‌گردد. فلوئورسانس این لایه مشابه اتوفلوئورسانس و فلورسانس لایه کوتیکول پاپی کلاله گیاه *Metrosideros excelsa* می‌باشد (۲۹)، مشاهده فلوئورسانس شدید این لایه بعد از رنگ آمیزی با اورامین O، حاکی از این واقعیت است که لایه کوتیکول پاپی‌های کلاله تاتوره، واجد مقادیر بسیار زیادی از موم‌ها می‌باشد، بنابراین بخش مهمی از ترکیبات لیپیدی می‌توانند از لایه کوتیکول به خارج از سلول تراوش نماید. انباشتگی ترشحات در زیر لایه کوتیکول باعث فاصله گرفتن وجدا شدن کوتیکول از دیواره و گسستگی این لایه در بعضی از نقاط، باعث هم پوشانی فلوئورسانس لایه کوتیکول و ترشحات زیر کوتیکولی می‌شود. بررسی ماهیت ترشحات کلاله در سطح میکروسکوپ فلوئورسنت با رنگ آمیزی اورامین O و در سطح میکروسکوپ نوری با نیل بلو سولفات، لیپیدی بودن این ترشحات را ثابت کرد. وجود ترکیبات لیپیدی در ترشحات کلاله تاتوره قبلاًتوسط حسینی در سال ۱۳۸۴ به اثبات رسیده است (۲۲). وجود ترکیبات لیپیدی در ترشحات کلاله بعضی از گیاهان تیره سیب زمینی، از جمله توتون، گوجه فرنگی،اطلسی و سیب زمینی نیز گزارش شده است (۲۱، ۲۰، ۸ و۲).ماهیت ترشحات

www.SID.ir

Archive of SID

کلاله ای در گیاهان متفاوت است، به عنوان مثال ماهیت ترشحات سطح کلاله بالغ گیاه نخل روغنی (*Oil plam*) از نوع پلی ساکاریدی می‌باشد (۱۲). لقاح در مادگی گل‌ها زمانی صورت می گیرد که گرده بالغ بر روی کلاله آب گیری کرده و لوله گرده ضمن رشد در کلاله نفوذ و در آن پیش می‌رود (۳۳، ۲۹، ۲۶، ۱۸، ۱۵، ۱۱، ۱۰ و ۹). در خانواده سولاناسه، این وقایع در یک محیط انباشته از ترکیبات لیپیدی که توسط ترشحات کلاله‌ای حاصل شده‌اند، اتفاق می‌افتد حضور این محیط برای رویش دانه گرده و رشد آن ضروری است (۲۹ و ۸).

منابع

1. Ciampolini F, Faleri C, Cristi M.(1995) Structural and cytochemical analysis of the stigma and style in *Tibouchina semidecandra*. Annals of Botany.76:421-427.

2. Makenzie C J,Yoo Y B , Seabrook J E A. (1990)Stigma of *Solanum tuberosum* CV shepody: morphology, ultrastructure and secretion. Amer. J.Bot. 77(9):1111-1124.

3. Dulmen A V. (2001) Pollination and phenology of flowers in the caropy of two contrasting rain forest types in Amazonia, Colombia. Plant Ecology. 153:73-83.

4. Ciampolini F , Shivanna K R, Cresti M.(1990) The structure and cytochemistry of the pistil of *Sternbergia lutea* (Amaryllidaceae). Annals of Botany. 66:703-712.

5. Ciampolini F ,Faleri C , Di pietro D, Cresti M.(1996) Structural and cytochemical characteristics of the stigma and style in *Vitis vinifera* L.var. Sangiovese (vitaceae).Annals of Botany. 78:759-764.

6. Ciampolini F , Shivanna K R , Cresti M**.** **(**2001**)** Organization of the stigma and transmitting **t**issue of Rice , **(***Oryza sativa* L.). Plant Bio. 3:149-155**.**

7. Ciampolini F , Cresti M. (1998) The structure and cytochemistry of the stigma styl complex of *Corylus avellana* L. (Corylaceae). Annals of Botany.81:513-518.

8. Cresti M , Keizjer C J, Tiezzi A , Ciampolini F , Focardi S. (1986) Stigma of *Nicotiana*: ultratrutural and biochemical study. Amer. J. Bot. 73: 1713-1722.

9. Goring D R. (2000) The search for component of self- incompatibility signaling pathway(s)in *Brassica napus*. Annals of Botany. 85 (1): 171-179.

10. Hiscoek S J, Mclnnis S M. (2003) Sporophytic self – incompatibility in *Senecio squalidus* L.(Asteraceae) the search for S.journal of Experimental Botany. 54(380):169-174.

11. Dixit R, Rizzo C, Nasrallah M, Nasrallah J.(2001)Recognizing self in the self incompatibility response. Plant physiology. 125:105-108.

12. Tandon R, Manohara T N, Nijalingappa B H M, shivanna K R.(2001) Pollination and pollen – pistil interaction in *Oil palm*, *Elaeis guineensis*. Annals of Botany. 87:831-838.

13. Zinki G M, Preuss D. (2000) Dissecting *Arabidopsis* pollen – stigma interactions reveals novel mechanisms that confer mating specificity.

14. Lord E M, Russell S D. (2002)The mechanisms of pollination and fertilzation in plant. Annual Review of cell and Developmental Biology. 18:81-105.

15. Lord E M. (2003) Adhesion and guidance in compatible pollination. Journol of Experimental Botany. 54:47-54.

16. Tilton V R ,Horner H T.(1980)Stigma, style and opturator of *Orrithogalum caudatum* (Liliaceae) and their function in the reproductive process. American journal of Botany. 67: 1113-1131.

17. Heslop – Harrison J. (1979) Aspect of the stracture, cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereale* L.).Annals of Botany. 44:1-47.

18. Mollet J C , Park S Y, Nothnagel EA. (2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to on in vitro *Stylar matrix*.The Plant Cell. 12:1737-1749.

19. Dought J, Wong H Y , Dickinson H G. (2000) Cysteine – rich pollen coat protein (pcp_s) and their interactions with stigmatic S (Incompatibility) and S- Related proteins in *Brassica*: putative roles in SI and pollination. Annals of Botany. 85 (1): 161-169.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Konar R N, Minskens H F. (1966) The morphology and anotomy of the stigma of the *Petunia hybrida*. Planta. 71:356-371.

21. Cresti M, Van went J L, Pacini E, Willemse W T M.(1976) Ultrastructure of transmitting tissue of *Lycopersicum peruvianum* style: development and histochemistry. Planta. 132:305-312.

22. Aliasgharpour M, Hekmat shoar H, Hossenyi M S. (2000) Stigma of *Datura stramoniu*L.(Solanaceae):Histogenesis,morph ology and developmental anatomy. J.Sci.I.R.IRAN. 11(4): 267-276.

23. Chen Y-F,Matsubayashi Y, Shakagami Y. (2000) Peptide growth factor phytosulfokine - a Contributes to the pollen population effect. Planta. 211:752-755.

24. Corsi G, Bottega S. (1999) Glandular hairs of *Saliva officinalis*: New data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. Annals of Botany. 84: 657-664.

25. Davies K L, Turner M P, Gregg A. (2003) Lipodial labellar secretions in *Maxillaria ruiz* & pav. Ann Bot. 91(4):439-446.

26. Gersbach P V. (2002) The essential oil secretory structures of *Prostanther ovalifolia* (Lamiaceae). Annals of Botany. 89:255-260.

27. Sanzol J, Rallo P, Herrero M. (2003) Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; Rosaceae) flower. Am.J.Bot. 90 (1):78.

28. Shivanna K R, Ciampolini F, Cresti. (1989) The structure and cytochemistry of the pistil of *Hypericum calycinum*: The stigma. Annals of Botany. 63:613-620.

29. Schmidt- Art G. (2002) Structure and histochemistry of the stigma and style of *Metrosideros excelsa*. New Zealand Journal of Botany. 40:95-103.

30. Sage T L , Griffin S R, Pontieri V, Drobac P, Cole W W, Barrett S H. (2001) Stigmatic self – incompatibitity and mating patterns in *Trillium grandiflorum* and *Trillum erectum*. 88:829-841.

31. Turner G W , Gershenzon J, Croteau B. (2000) Development of peltate glandular trichomes of peppermint. plant physiology. 124:665-679.

32. Beardsell D V, Williams E C, Konx R B. (1989) The structure and histochemistry of the nectary and anther secretory tissue of the flower of *Thryptomene calycina*. Aust. J. Bot. 37: 65-80.

33. Ska M S, Davies K L, Gregg A. (2004) Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea*. Ann. Bot. 93:37-95.

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract

Datura stramonium L., of the family Solanaceae, is a toxic and medical annual that grows as a wasteland weed in Iran. Its flowers are white with a pentamerous trumpet shaped corolla, five stamen and two fused carpels. The stigma is of the wet and papillate type. In the present study, the ontogenetic and structural aspects of papillae were investigated using light microscopy. The papillae were unicellular and originated from the epidermis at the apex of very young style (within buds ≤10 mm in length). In the course of development, they progressively covered the stigma, then lysed and detached from its surface. This was an early - began in ≥15 mm long buds - and continuous process and caused almost lack of the papillae in pollinated opened flowers. Papillae as well as underlying stigmatic cells showed secretory activity during their development. Secretion began very early in 20-25 mm long buds. These structures represented stigmatic secretion material. Electron density of secretory components after post-fixation with Auramine O revealed their lipoid nature. With further development a large number of lipoid droplets were observed just below the cuticle. In the mature stigma (in 40-60 mm long buds) droplets increased in number, coalesced and formed large lipid bodies under the cuticle and on the stigma surface. This procedure caused the cuticle to rupture and become distanced from the cell wall. It seemed that lipoid exudates passed through the ruptures and reached the stigma surface. Otherwise, the existence of these ruptures may facilitate the passage of the lipoid material that occurs through the thin cuticle.

Key words:development papi, *Datura stramonium*,ultera microtom, lipoid droplets

www.SID.ir