فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸

بررسی ساختاری و فراساختاری جوانه زنی و رویش دانه گرده در تاتوره *Datura stramonium*

حسن قاسم پور[۱]، محبوبه علی اصغر پور[۲]، علی موافقی[۲]، محمد رضا داد پور[۳]، شهرزاد نصیری سمنانی[۴]

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان.

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

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

۴- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

عهده دارمکاتبات.Sh.nasiri 92 @ yahoo . com

چکیده

کلاله بخشی از مادگی است که دانه گرده در زمان گرده افشانی روی آن قرار می گیرد. کلاله در تاتوره (*Datura stramonium.*) مرطوب (از گروه ۳) با پوشش ترشحات چسبناک است. میان کنش بین گرده وسطح کلاله اساس جوانه زنی دانه گرده است. هدف از این پژوهش بررسی ساختار و فراساختار دانه و لوله گرده توسط میکروسکوپ فلورسانس و الکترونی عبوری وارتباط میان کنش کلاله و دانه گرده در رشد لوله گرده می باشد. طی مراحل نمو پاپی ها و سلول های بافت های زیرین آنها در کلاله فعالیت ترشحی داشتند. تراکم الکترونی زیاد ترکیبات ترشحی پس از تثبیت ثانویه توسط تترااکسید اسمیوم و رنگ پذیری آن ها توسط اورامین O ماهیت لیپیدی آنها را نشان داد. دانه های گرده به صورت کروی دندانه‌دار با یک گودی مشخص در وسط می‌باشند دیوارۀ خارجی دانه گرده (اگزین) دارای تزئیناتی است که به علت داشتن ترکیبات لیپیدی با فلوئورو کروم اورامینo کاملا فلوئوروسنت می‌شود. این لایه در اثرتثبیت باتتراکسیداسمیوم به صورت لایه اسمیوفیل با دانستیه الکتروفی بالا قابل مشاهده است دیوارۀ داخلی دانه گرده (انتین) دارای ضخامت زیادی است و در زیر میکروسکوپ الکترونی کاملا شفاف دیده می‌شوند در سیتوپلاسم دانه گرده تعداد زیادی میتوکندری قابل مشاهده است. شبکه آندوپلاسمی از نوع صاف و چندین دیکتیوزوم به همراه وزیکول های متعدد با محتوای روشن نشان دهنده سنتز فعال ترکیبات دیوارۀ لوله گرده است. پلاست به تعداد اندک با ماتریکس به شدت اسموفیلدارای دانه های نشاسته است، لوله گرده دارای دیوارۀ داخلی (انتین) در پیرامون لوله گرده است، میتوکندری های کوچک و به شکل مدور در درون آن قرار می گیرند، دیکتیوزوم های متعدد و به شدت فعال می باشند وزیکول های روشن و متعدد که بخش مهمی از حجم سیتوپلاسم را اشغال می کنند.

واژه های کلیدی: فرا ساختار، ساختار، لوله گرده، تاتوره.

مقدمه

کلاله بخشی از مادگی است که دانه گرده در زمان گرده افشانی روی آن قرار می گیرد. کلاله در تاتوره مرطوب (از گروه ۳) با ترشحات چسبناک سطحی است (۱). گرده گامتوفیت نر گیاهان عالی سیستم زیستی است که در تولید مثل جنسی نقش دارد (۳و۲). میان کنش

Archive of SID

www.SID.ir

بین گرده وسطح کلاله اساس جوانه زنی دانه گرده است .سطح کلاله یک گل پناهگاه تیپ های مختلفی از دانه گرده می باشد، ولی مکانیزم‌های فیزیولوژیکی وجود دارند که موجب می شود تنها دانه گرده درون گونه ای (Intra specific) موفقیت جوانه زدن راپیدا کرده ولوله گرده را برروی کلاله بوجود آورد، ماتریکس خارج سلولی کلاله وبافت خامه غنی از مواد ترشحی در مسیر حرکت لوله گرده می باشد(۷-۴) مدل عمومی شناسایی دانه گرده سازگار توسط پاپی های کلاله‌ای با واکنش های مولکولی بین مواد دیواره دانه گرده و روپوستک (Pellicle) و یا ترشحات کلاله ای صورت می گیرد هم چنین فاکتور های فیزیکی وشیمیایی برچه در رشد لوله گرده، موثر است(۱۰-۶). پژوهش های فراساختاری،سیتو شیمی(۱۳، ۱۲و۱۱) جزئیات میان کنش برچه و دانه گرده را نشان داده اند(۱۴، ۱۰ و۴).برطبق بررسی های اولیه ترشحات لیپیدی کلاله برخی از گونه ها نقشی در تغذیه لوله گرده نداشته ،بلکه پلی ساکارید درون سلولی بافت ترابنده در تغذیه نقش اساسی دارد(۱۵).آب گیری دانه گرده با کنترل آب گل که از کلاله وارد دانه گرده می شود تنظیم می شود (۱۶). دانه گرده سازگار در واکنش‌هایی با سلول های کلاله باعث بوجود آمدن سیگنال های جوانه زنی دانه های گرده می‌گردد. درکلاله های مرطوب ماتریکس های خارج سلولی (ECMs) سطح کلاله ای را پوشانده و لوله های گرده می توانند قبل از نفوذ در خامه در آن کمی رشد کنند.در همین راستا در گیاه توتون (Tabacco) ماتریکس خارج سلولی با ماهیت لیپیدی، گرادیان آب را در سطح کلاله این گیاه بوجود می آورد که باعث رشد لوله گرده در مسیر طبیعی و در جهت تخمدان می شود (۱۷). بررسی هایی از نظر غلظت مولکولی(۱۸)، سیتو شیمیایی(۱۹)، بیوشیمیایی(۹)،فیزیولوژی در شیشه(۸)، و در محیط(۲۰)،میان کنش بین برچه و گرده(۴)،اثر عوامل محیطی از جمله برخی مواد شیمیایی(۲۳، ۲۲، ۲۱و۱۰)،شوک حرارتی(۲۱)، کافئین (۲۴) ونیز ساختار برچه ای(۱۴) بر روی رشد لوله گرده انجام شده است.بررسی های ساختاری و فراساختاری لوله گرده در برخی از گونه های خانواده های سوسنیان (Liliaceae)، سیب زمینی(Solanaceae)،گل سرخیان (Rosaceae) انجام شده است(۲۷، ۲۶و۲۵).کار پژوهشی حاضر در ادامه مطالعات قبلی و در جهت تکمیل نتایج بدست آمده از پژوهش های پیشین انجام گردیده است. یکی از اهداف آن کسب دانش کافی در زمینه ساختار دانه گرده و کلاله است که در زمینه های تولید مثل و تکثیر این گونه مثمر ثمر خواهد بود.

مواد و روش ها

جمع آوری گل های تا توره در تاریخ ۱ / ۹ / ۸۱ و ۱ / ۴ / ۸۲ از پایه های رشد یافته در منطقه چای کنار تبریز انجام گردید. گل های جمع آوری شده در گلوتارآلدئید ۲/۵٪و پارافرمالدئید ۴٪ محلول در بافر فسفات به مدت ۲ ساعت به عنوان تثبیت کننده اولیه تثبیت شدند. پس از این مدت نمونه ها را با بافر فسفات به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده و درون تثبیت کننده ثانویه (تتراکسید اسمیوم ۱٪) تثبیت گردید. آب گیری به وسیله اتانل به ترتیب ۳۰ ٪ ، ۵۰٪ ، ۷۰٪ ، ۹۰٪ ، ۱۰۰٪ (دو مرتبه)هر مرحله ۲۰ دقیقه با سه مرتبه تکرارانجام شد.پس از شفاف سازی با اتانول ۱۰۰٪ + پروپیلن اکساید (۱ : ۱)، به مدت ۲۰ دقیقه برای قالب گیری درون سوپر رزین، درون مخلوط های اتانل/ رزین به ترتیب ۳:۱، ۲:۱، ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، سوپر رزین خالص کدام ۸ ساعت در دمای اتاق آغشته شد(۲۷).پس از قالب گیری نمونه برای پلی مریزاسیون در آون ۶۰ درجه به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفته شدند. بلوک های آماده شده با اولترا میکروتوم با ضخامت ۰/۵-۰/۳ میکرومتر برش گیری شده، جهت مشاهده برش های نیم نازک با میکروسکوپ نوری با متیلن آزور بلو ∏ (۲۸)و با میکرسکوپ الکترونی عبوری برش های ۵۰ تا ۶۰ نانومتری از یورانیل استات ٪۳ و سیترات سرب استفاده شد(۲۹).

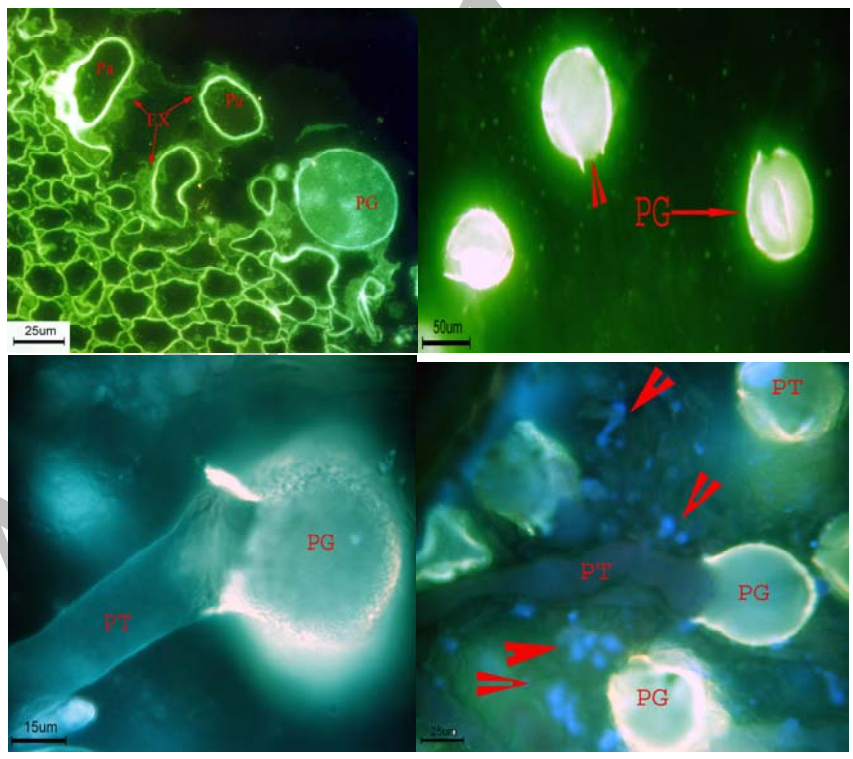
نتایج

بررسی دانه‌های گرده توسط میکروسکوپ فلوئوروسنت نشان می دهد که دانه گرده کروی شکل، دندانه دار با یک گودی مشخص (با ستاره نشان داده شده) در وسط است. فلوئورسانس دانه های گرده و لوله گرده بر روی کلاله (در طول موج‌های ۴۵۰ – ۳۸۰ نانومتر) پس از رنگ آمیزی با اورامین O، مشخص می کند که فلوئور سانس دانه گرده با لوله گرده متفاوت بوده و وجود ترکیبات لیپیدی بر روی دیواره خارجی دانه گرده باعث

Archive of SID

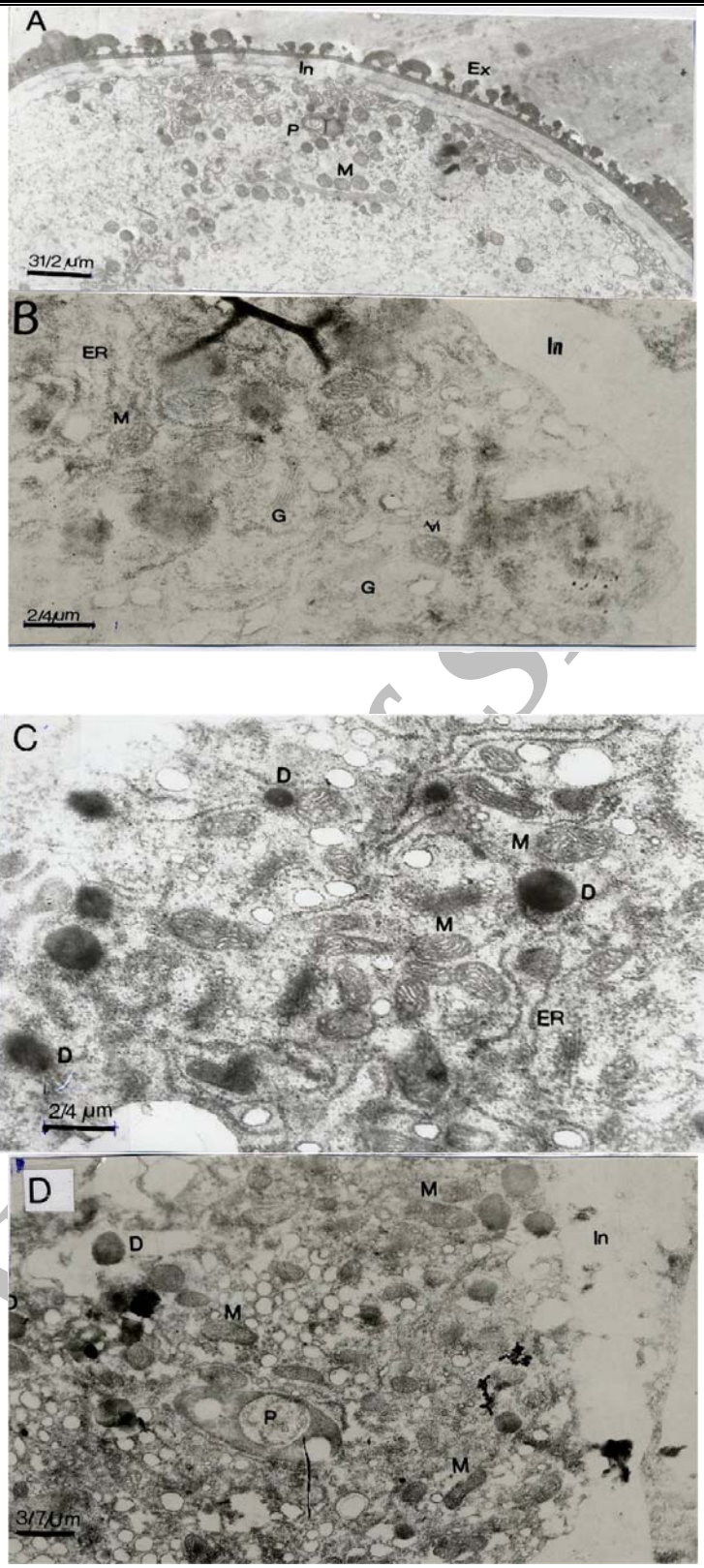
www.SID.ir

فلوئورسانس آن به رنگ سفید در طول موجها شده استدیوارۀ خارجی دانه گرده (اگزین) دارای تزئیناتی است که به علت داشتن ترکیبات لیپیدی با فلوئورو کروم اورامینo کاملا فلوئوروسنت و به صورت درخشان در آمده است (شکل ۱). لایه اگزین در اثرتثبیت باتتراکسیداسمیوم به صورت لایه اسمیوفیل با دانستیه الکترونی بالا قابل مشاهده است. دیوارۀ داخلی دانه گرده (انتین) دارای ضخامت زیادی است و در زیر میکروسکوپ الکترونی کاملا شفاف دیده می‌شوند (اشکال A ۲وB۲). در سیتوپلاسم دانه گرده تعداد زیادی میتوکندری قابل مشاهده است. شبکه آندوپلاسمی از نوع صاف و به صورت لوله‌های نسبتاً کوتاه است و گاهی قطعه قطعه شده به نظر می‌رسد. در کنار این مجموعه چندین دیکتیوزوم به همراه وزیکول‌های متعدد با محتوای روشن قابل مشاهده است (تصویر C ۲) که نشان دهنده سنتز فعال ترکیبات دیوارۀ لوله گرده است. وجود تعداد زیادی میتوکندری در کنار این مجموعه انرژی لازم برای سنتز و بسته بندی و ترشح ترکیبات پروتئینی و پلی ساکاریدی را تامین می کنند. پلاست به تعداد اندک در دانه های گرده، عموماً با ماتریکس به شدت اسموفیل وجود دارند و به نظر می‌رسند که از نوع آمیلوپلاست باشند، بررسی های انجام شده بر روی لوله گرده در برش های نیم نازک و برش های نازک در زیر میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان دهنده وجود دیوارۀ داخلی(انتین)در پیرامون لوله گرده است. میتوکندری های کم و در اندازه های کوچک و به شکل مدور در درون سیتوپلاسم قراردارد، دیکتیوزوم ها متعدد و به شدت فعال بوده و وزیکول ها روشن و متعدد که بخش مهمی از حجم سیتوپلاسم اشغال می کنند. به نظر می‌رسند که از فعالیت دستگاه گلژی حاصل مواد لازم برای سنتزدیواره لوله گرده را تامین می نمایند (اشکالC ۲و D ۲).



شکل ۱- دانه گرده و رشد لوله گرده رنگ آمیزی شده با اورامین O در طول موجهای ۴۹۰ – ۴۵۰ نانومتر(دو شکل بالا) و ۴۵۰ –۳۸۰ نانومتر دو شکل پائین)، محل جوانه زدن دانه گرده با سر فلش نشان داده شده است.PG - دانه گرده PT- لوله گرده

www.SID.ir



شکل ۲-فراساختار دانه گرده و لوله گرده

A- تزئینات دیواره خارجی دانه گرده (اگزین)

B و C و D - نمایی از لوله گرده

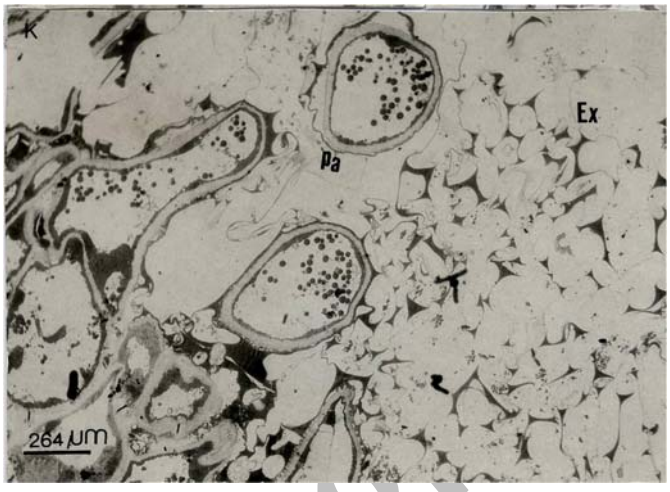
E.n- انتین G- دستگاه گلژی M- میتوکندری ER- شبکه آندوپلاسمی

ER- شبکه آندوپلاسمی M- میتوکندری P- پلاست

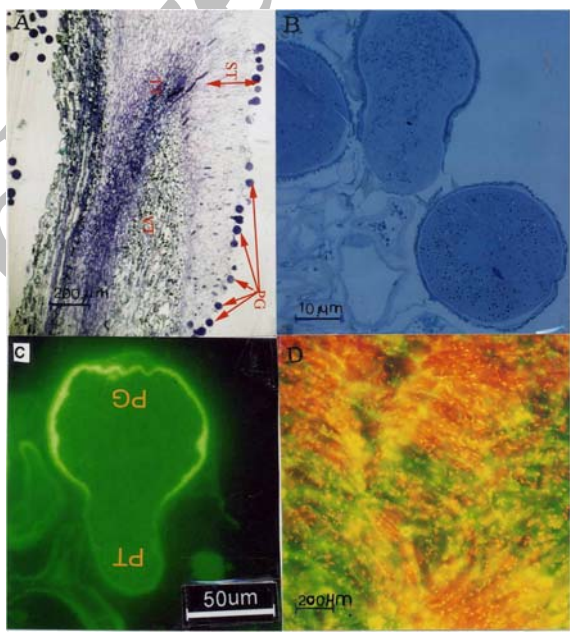
www.SID.ir

درفراساختار کلاله وسلول های پاپی قطرات با تراکم الکترونی زیاد در سیتوپلاسم و واکوئول وجود دارد. ماهیت لیپیدی قطرات (ترکیبات ترشحی) پس از تثبیت ثانویه توسط تترااکسید اسمیوم و رنگ پذیری آنها مشخص شد (شکل ۳).

بررسی ها بر روی کلاله تاتوره در مرحله بعد از گرده افشانی نشان داد که به هنگام رشد دانه گرده شکل طبیعی سلول های پاپی و بسیاری از سلول های زیرین آن از بین رفته(شکل **۴A**) و به صورت مچاله شده مشاهده می شود، در این زمان دانه گرده در داخل ترشحات سطح کلاله به دام افتاده است وجوانه می زند(شکل **۴B** و**C** ۴). قطرات پروتئوپلی فنلی قطعاً در رشد لوله های گرده بر روی کلاله نقش اساسی دارند(شکل**۴D**).



شکل ۳-فرا ساختار سلول های پاپی و ترشحات لیپیدی
Pa :پاپی Ex:ترشحات لیپیدی



شکل ۴-کلاله تاتوره را در مرحله بعد از گرده افشانی (غنچه های بزرگتر از ۶۰ میلی متری)
A-برش نیم نازک کلاله در غنچه های ۷۰ میلی متری با رنگ آمیزی تولوئیدین بلو ۲٪.
B- برش نیم نازک کلاله در غنچه های ۷۵ میلی متری رنگ آمیزی تولوئیدین بلو ۲٪.
C- برش نیم نازک سطح کلاله در غنچه های ۷۵ میلی متری با رنگ آمیزی اورامین O در طول موج‌های ۴۹۰ – ۴۵۰ نانومتر
D-فلوئورسانس ترشحات نمونه های تازه کلاله در غنچه های ۷۰ میلی متری با رنگ آمیزی اورامین O در طول موج‌های ۴۹۰ – ۴۵۰ نانومتر.
PG- دانه گرده PT- لوله گرده P.p- قطرات پروتئوپلی فنولی

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

کلاله اولین بافتی است که دانه گرده در گونه های خود سازگار بر روی آن قرار می گیرد. دانه های گرده برروی کلاله گل ها، چسبیده و جوانه می زنند و می توانند در کلاله و خامه نفوذ کنند(۳۰). بعد از این مرحله سلول رویشی لوله گرده را بوجود می آورد اگر چه این فرایند نیاز به سنتز فعال پروتئین دارد، به نظر می رسد که سنتز RNA ضرورت نداشته باشد زیرا که عقیده براین است که تمام ملزومات و عوامل سنتز کامل پروتئین از جمله mRNA در گرده رویش نیافته وجود دارد. واکنش بین کلاله و گرده زمانی شروع می شود که دانه گرده آب گیری کرده باشد. ارتباط فیزیولوژیکی بین دانه های گرده و گیرنده های گلیکوپروتئینی S و لکتین کلاله وجود دارد،نتیجه ای که از جمع مشاهدات می توان گرفت، این است که لیپیدهای پوسته دانه گرده و ترشحات کلاله ای نقش اساسی را در واکنش های بین کلاله ـ دانه گرده در مسیر رشد لوله گرده و ترشحات گرده بر عهده دارد. عمده ترشحات بین سلولی در کلاله تاتوره ماهیت لیپیدی دارد،هر چند جوانه زنی دانه گرده و رشد لوله گرده در ماتریکس پپتیدی صورت می گیرد و این ماده نرم ژله مانند دانه گرده را در برابر شرایط فیزیکی و شیمیایی حفظ کرده و برای جوانه زنی و رشد لوله گرده ضروری است (۳۱)در پامچال(Oenothera)سطح کلاله ای با ترشحات مایع پوشیده شده است، که دانه های گرده ناسازگار قادر به نفوذ در آن نیست بنابراین این لایه مایع قسمتی از سیستم شناسایی می باشد بافت های خامه گل اطلسی و توتون گلیکوپروتئین های را ترشح می نمایند که رشد درون شیشه ای (In-vitro) لوله های گرده را مهار می کند. امروزه مشخص شده که این گلیکوپروتئین ها حاصل محصولات ژن های S بوده و همچنین مشخص گردیده که در طرف مادگی مولکولهای RNA پیامبر برای این پروتئین ها تنها در بافت های خامه سنتز می گردد. اغلب بررسی های کنونی دربرخی ازگیاهان مشخص نموده است که لیپید ها مستقیما در رشد لوله گرده موثرمی‌باشد (۱۷)ترشحات لیپیدی سطح کلاله نه تنها همانند یک کوتیکول مایع عمل نموده و از تعرق جلوگیری می نماید (۳۲)، بلکه می تواند به عنوان یک لایه محافظت کننده در برابر تغییرات محیطی باشد (۳۳)، هم چنین در به دام انداختن دانه گرده،(۳۲)، و به عنوان ترکیب اتصال دهنده رشد لوله گرده نظر گرفت.ساندوز و لورد (۶)نشان دادند که در گرده افشانی سازگار اتصال لوله گرده و کلاله (بافت هدایت کننده خامه) در میان کنش بسیار موثر بوده و عامل موثر برای هدایت سلول های لوله گرده به سوی تخمدان می باشد(۳۴).بررسی های انجام شده در این پژوهش مشخص نموده است که ترشحات لیپیدی کلاله در فراهم کردن رطوبت کافی برای دانه گرده با تنظیم آب لازم برای دانه گرده جهت جوانه زنی لازم و ضروری است و این مطالب با موسکاتی مطابقت دارد(۵)،در مطالعه دیگری(۳۳) نقش گلیسرول و احتمالا سایر لیپید ها به عنوان ماده زمینه که باعث توزیع مولکول های آب می شود و یا باعث نفوذ پذیری غشا دانه گرده جهت تشکیل لوله گرده می گردد. مشاهدات کنونی با نتایج فراساختاری لوله گرده دیگر پژوهش گران مطابقت داشته و بر طبق کار های انجام شده منطقه راسی لوله گرده غنی از اندامک ها از جمله میتوکندری ، دیکتیوزوم ها وقطرات چربی می باشد. در تمام بخش های لوله گرده شبکه آندوپلاسمی صاف و خشن طرح ریزی شده است(۳۶)، وزیکول های کوچک از نمو کیسه های دیکتیوزوم به وجود می آیند در متابولیسم کربوهیدرات نقش دارد. قطرات چربی در تمام مناطق لوله گرده و بیشتر در راس لوله قابل مشاهده بوده و از آن جا که لوله گرده به درون کلاله و خامه حرکت می کند، گلیکو پروتئین ها و گلیکولیپید ها برای ساختن دیواره لوله گرده ضروری است. جذب مواد ضروری رشد لوله گرده از بافت خامه اطراف لوله صورت می گیرد.سیامپولینی و همکارانش فراساختار و نقش وزیکول های ترشحی در رشد لوله گرده را موثر در مکانیسم جذب مواد از بافت خامه اطراف لوله گرده دانسته اند(۱۱). ما بین رشد طولی لوله گرده و پراکنش اندامک ها رابطه مستقیمی وجود دارد. رشد لوله گرده با سیستم ترشحی شامل اندامک های شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی وابسته است(۳۷).

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Aliasgharpour M, Hekmat shoar H, Hossenyi M.S.(2000) Stigma of *Datura stramonium* L.(Solanaceae): Histogenesis,morphology and developmental anatomy. J.Sci.I.R.IRAN. 11(4) 267-276.
2. Cresti M, Blackmire S , Vanwent JL. (1992)Atlas of sexual plant reproduction in flowering plants. Springer-Verlag, Berlin. 75.
3. Lennon KA, Roy S, Hepler PK . Lord EM. (1998) The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. Sex Plant Reprod 11: 49–59.
4. Ferrari TE, Best V, More TA, Comstock P, Muhmmda ,Wallace DH. (1985) Intercellular adhesions in the pollen-stigma system: Pollen capture, grainbinding, and tube attachments. Amer J Bot 72: 1466–1474.
5. Moscatelli A , Cresti M. (2001)Pollen germination and pollen tube growth. In: BOJWANI SS AND SOH WY(Eds), Current trends in the embryology of angiosperms, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands,p. 33–65.
6. Lord E.M.(2003)Adhesion and guidance in compatible pollination. Journol of Experimental Botany. 54:47-54.
7. 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.
8. Dane F, Olgun G , DalgicO.(2004) *In vitro* pollen germination of some plant species in basic culture medium.J Cell Mol Biol (Halic Univ. Press, Turkey).3: 71–76.
9. Zonia L, Cordiro S, Tupy J , Feijo JA.(2002)Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. Plant Cell. 14: 2233–2249.
10. Kim S, Mollet JC, Donge J, Zhang K, Park S. Y, LordEM. (2003) Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism.Plant Biol .100: 16125–16130.
11. 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.
12. Ciampolini F, Shivanna K.R, Cresti M.(2001) Organization of the stigma and transmitting Tissue of Rice , *Oryza sativa* (L.). Plant biol. 3:149-155.
13. Mollet J.C, Park S.Y, Nothnagel E.A.(2000) A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to on *in vitro Stylar matrix*.The plant Cell. 12:1737-1749.
14. Herrero M, Arbelo A.(1989) Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). Amer J Bot .76: 1441–1447.
15. Goring D.R. (2000)The search for component of self- incompatibility signaling pathway(s)in *Brassica napus*. Annals of Botany. 85 (A): 171-179.
16. Mayfield J. A, Preuss D.(2000) Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin – domain protein GRP_{17}. Nature cell Biology. 2:128-130.
17. Wolter – Arts M, Lush W.M, Mariani, C.(1998) Lipids are required for directional pollen tube growth. Nature. 392:818-821.
18. Graaf BHJ, Cheung AY, Andreyeva T, Levasseur K, Kieliszexski M ,WU H. (2005) Rab11 GTPaseregulated membrane trafficking is crucial for tip-focused

Archive of SID

www.SID.ir

pollen tube growth in *tobacco*. Plant Cell 17: 2564–2579.
19. Georgieva ID. (1987)Cytochemical investigation of pollen and pollen tubes after γ -irradiation: II. Effect of the irradiation on quinine formation. Phytomorphology .37(2-3):159–163.
20. Unal M.(1986)A comperative cytological study on compatible and in-compatible pollen tubes of *Petunia hybrida*.Istanbul Univ Sci Fac J Series B. 51:1–12.
21. Kandasamy MK, Kristen U. (1987) Pentachlorophenol affects mitochondria and induces formation of golgi apparatus-endoplasmic reticulum hybrids in tobacco pollen tubes. Protoplasma .141(2-3): 112–120.
22. Roderer G, Reis HD.(1988) Different effects of inorganic and triethyl lead on growth and ultrastructure of lily pollen tubes. Protoplasma. 144(2-3): 101–109.
23. Sawidisand T , Reiss HD.(1995)Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. Protoplasma.185(3-4): 113–122.
24. Lancelle SA, Cresti M ,Hepler PK. (1997)Growth inhibition and recovery in freeze-substituted *Lilium longiflorum* pollen tubes: structural effects of caffeine. Protoplasma. 196(1-2): 21–33.
25. Shi-Yi H, Chun-Gui L ,Cheng Z. (1992) Ultrastructure of microfilaments in pollen and pollen tubes of *Hosta ventricosa* (*H. coerulea*). Zhíwùxué Bào .34: 8–14.
26. Rutten ALM.(1993)Organelle distribution and cytoskeleton in the cytoplasm of tobacco pollen tube. Ph.D. Thesis.Chap. 6. University of Nijmegen. The Netherlands.
27. Spurr A. R. (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research. 26, 31- 43.
28. Humphrey C. D, Pittmann F. E. (1974) A simple methylene blue-azure II basic fuchsin stain for epoxiembedde tissue sections. Stain Technology.49:9-14.
29. Venable J. H, Coggeshall R. (1965) A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy.Journal of Cell Biology.25: 407.
30. Dixit R, Rizzo C, Nasrallah, M,Nasrallah J.(2001)Recognizing self in the self incompatibility response. Plant physiology. 125:105-108.
31. Aliasgharpour M,Hecmatshoar H,Hosseyni M,Some-eh F.(2004)Lipids in the stigmatic secretion of Datur stramonium L.Iranian Journal of Science & Technology.28(1):19-29.
32. Konar R.N, Minskens H.F.(1966)The morphology and anotomy of the stigma of the *Petunia* hybrida. Planta. 71:356-371.
33. Makenzie C.J,Yoo Y.B, Seabrook J.E.A.(1990) Stigma of *Solanum tuberosum* CV shepody: orphology, Ultrastructure, and secretion. Amer. J.Bot .77(9):1111-1124.
34. 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.
35. Mariani C,Walters-Arts M.(2000) Complex waxes .Plant Cell.12:1495.
36. Uwate WJ,Lin J.(1980)Cytological zonation of *Prunus avium* L. pollen tubes *in vivo*. J Ultrastruct Re .71: 173–184.
37. Nuran E, K¨ic I, Feruzan D,Ksel O. (2009) Ultrastructural features of Mimulus aurantiacus (Scrophulariaceae) pollen tubes in vivo. Anais da Academia Brasileira de Ciências (2009) 81(1): 29-37.

Archive of SID

www.SID.ir