

بررسی بافت شناختی و سیتوشیمیایی مراحل مختلف رویانزایی گیاه قیچ

الهام محجل کاظمی^{۱*}، مینا کاظمیان^۱، فاطمه مجیدزاده^۱ و محبوبه علی اصغرپور^۱

^۱ ایران، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی گروه زیست گیاهی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۶



چکیده

شکل‌گیری دانه یکی از مراحل مهم تولید مثل در گیاهان دانه‌دار به شمار می‌رود. در این پژوهش بررسی تکوین تخمک، اندوسپرم و رویان زایی گیاه قیچ (*Zygophyllum fabago*) با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی مدنظر قرار گرفته است. نمونه‌ها از مراحل مختلف نمو جمع‌آوری و تثبیت گردیدند، سپس نمونه‌های تثبیت‌شده با روش‌های رنگ‌آمیزی مختلف هیستولوژیکی و سیتوشیمیایی مطالعه شدند. مشاهدات اولیه نشان داد که تخمک از نوع واژگون و دو پوسته‌ای است. پوشش خارجی تخمک در طی تکوین، به تزئینات پوسته دانه تبدیل می‌گردد؛ بنابراین دانه از نوع تستایی است. در دانه قیچ اندوسپرم ابتدا از نوع هسته‌ای می‌باشد؛ این امر ارتباط رویان با بافت اندوسپرم را سهولت می‌بخشد. با ادامه نمو دانه روند سلولی شدن اندوسپرم دیده می‌شود. اندوسپرم سلولی شده در این گیاه به تدریج به سمت فضاهای مرکزی کیسه جنینی توسعه پیدا می‌کند و کل فضای کیسه جنینی را اشغال می‌نماید. در واقع دانه از نوع اندوسپرم دار بوده و بافت اندوسپرم تا مرحله رویان بالغ باقی مانده و تحلیل نمی‌رود. همچنین مراحل رویان کروی، قلبی، اژدری و رویان بالغ به همراه بخش‌های مرستم انتهایی ریشه، هیپوکوتیل، مرستم انتهایی ساقه و لپه‌ها مشخص مشاهده شد. نتایج سیتوشیمیایی نشان داد که با رشد بیشتر دانه، تشکیل دانه‌های انبوه نشاسته و به دنبال آن ضخیم‌شدگی دیواره‌ها اتفاق می‌افتد که موجب کاهش شدید حفره‌های سلولی و نیز سخت شدن این بافت می‌گردد. از طرفی مشخص شد که فراوانی مواد ذخیره‌ای لیپیدی در بافت اندوسپرم نسبت به مواد پروتئینی بیشتر است. بر خلاف اندوسپرم، در بافت رویان بالغ مواد کربوهیدراتی با رنگ آمیزی PAS تشخیص داده نشد.

واژه‌های کلیدی: اندوسپرم هسته‌ای، دو پوسته‌ای، رویان، روش‌های بافت‌شناسی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۲۸۰۸۹۵۵، پست الکترونیکی: e.mohajelkazemi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

در مناطق مدیترانه‌ای رویش دارد. تعداد برچه‌های مادگی بین ۲ تا ۱۲ عدد در این تیره متغیر بوده و هر خانه‌ی تخمدان محتوی تخمک‌های غالباً واژگون با میوه کپسول است. *Z. fabago* (گیاه قیچ) گیاهی پایا و چندساله، علفی یا چوبی، به ارتفاع ۴۰ تا ۹۰ سانتی‌متر، تخمدان دارای ۴ تا ۵ خانه، محتوی دو یا چند تخمک و شامل دانه‌های سطح و ناصاف می‌باشد (۴).

فرآیند تشکیل دانه در گیاهان به عنوان یک مرحله مهم محسوب می‌گردد زیرا این فرآیند برای ایجاد گیاه جوان به طریق تولیدمثل جنسی و ادامه حیات گونه الزامی می‌باشد

تیره زیگوفیلایسه به ۵ زیرتیره تقسیم می‌شود و شامل ۲۷ جنس و ۲۸۵ گونه است که معمولاً گیاهان این تیره علفی و یا به صورت درختچه و درختی هستند (۲۹). یکی از بزرگترین زیر خانواده‌های این تیره، *Zygophilloideae* است که جنس‌های *Zygophyllum*، *Roeper*، *Augea*، *Fagonia*، *Melocarpum* و *Tetraena* را شامل می‌شود (۲)، هرچند همچنان مطالعات مولکولی در زمینه‌ی ارتباط فیلوژنتیکی و رده‌بندی این تیره وجود دارد (۱). جنس *Zygophyllum* متعلق به این تیره می‌باشد که دارای دو گونه *Z. album*، *Z. fabago* است و به‌طور گسترده‌ای

اندوسپرم گیاهان گل‌دار در نتیجه‌ی لقاح مضاعف و به دنبال الحاق هسته‌های قطبی سلول مرکزی کیسه رویانی با اسپرم حاصل شده است (۱۶). به‌طور معمول سلول‌های اندوسپرمی تریپلوئید و یا پلی پلوئید می‌باشند (۱۴). ساختار کیسه جنینی و فرایند لقاح مضاعف در تعیین درجه پلوئیدی اندوسپرم نقش دارند (۲۵) عموماً بر اساس روند تکوین، اندوسپرم به سه نوع تقسیم می‌شود: اندوسپرم هسته‌ای، اندوسپرم سلولی و اندوسپرم هلوبال. اندازه و ساختار اندوسپرم در دانه‌های بالغ تیره‌های مختلف گیاهی متفاوت است (۱۵).

با توجه به اهمیت بافت اندوسپرم به عنوان بافتی مغذی برای تغذیه رویان در گیاهان گلدار و نیز نحوه تقسیمات سلولی متفاوت این بافت، نحوه نمو و تغییراتی که در مراحل مختلف تکوینی آن اتفاق می‌افتند ضرورت مطالعه این بافت را تبیین می‌کنند. ناهمگنی در تیره زیگوفیلاسه زیاد بوده در نتیجه مطالعه هر یک از گونه‌ها از دیدگاه آناتومی می‌تواند بعدها در تفکیک جنس‌های این تیره کمک کند و این امر اهمیت مطالعه‌ی جنس‌های این تیره از لحاظ تاکسونومی را نشان می‌دهد. از آنجاییکه گیاه *Z. fabago* در نواحی شمال ایران، آذربایجان، خراسان و اطراف تهران می‌روید و گلدهی گیاه به مقدار فراوان در مدت زمان نسبتاً طولانی از سال (از اواخر بهار تا تقریباً اواخر تابستان) انجام می‌گیرد، همچنین هر تخمدان محتوی تعداد زیادی از دانه (حدود ۳۰ عدد) می‌باشد، در نتیجه موجب گردیده تا این گیاه به عنوان نمونه مطلوب در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گیرد. مطالعه تخمک، مراحل تکوینی اندوسپرم و رویان و همچنین تغییرات هیستولوژیکی و سیتولوژیکی آنها از اهداف این پژوهش به شمار می‌روند.

مواد و روشها

نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در مراحل مختلف نموی (مادگی غنچه‌های نشکفته تا دانه‌های بالغ)

(۶). دانه از تخمک لقاح یافته حاصل می‌شود و از سه بخش پوسته‌ی دانه، اندوسپرم و رویان تشکیل شده است (۲۵). پوسته دانه پوشش خارجی احاطه‌کننده‌ی رویان در گیاهان به شمار می‌آید که از پوشش یا پوشش‌های تخمک حاصل می‌گردد (۸). در اغلب دانه‌ها بافت‌های ساختمانی پوشش تخمک در طی نمو دانه تخریب شده و پوسته دانه صرفاً از بقایای پوشش‌های تخمک حاصل می‌شود (۱۹) و ممکن است این سلول‌ها با تغییرات مورفولوژیکی به تزئینات متفاوتی دست یابند (۹). در تکوین مادگی در ابتدا تخمک‌ها به شکل برجستگی کوچک در جدار تخمدان پدیدار می‌شوند. در رایج‌ترین نوع نمو تخمک، پس از شکل‌گیری تخمک‌ها به دنبال رشد سریع یکی از یاخته‌های خورش، یاخته مادر مگاسپور تمایز می‌یابد که با تقسیم میوزی موجب تشکیل تتراد می‌شود. یک سلول، به تقسیمات میتوزی ادامه می‌دهد و کیسه رویانی را می‌سازد که پس از تندش دانه‌گرده، لوله‌گرده روی کلاله نفوذ کرده و یکی از آن‌تروئیدها با تخمزا ترکیب شده و سلول تخم را تشکیل می‌دهند (۸). در نهایت با ادامه تقسیمات رویان شانزده سلولی و کروی شکل می‌گیرد. مرحله‌ی رویان کروی با تشکیل لپه‌ها در دو طرف مرستم رأسی ساقه، رویان قلبی را ایجاد کرده و پس از تمایزات سلولی رویان اژدری و در انتها رویان لپه‌ای پدیدار می‌گردد (۸).

شاخص‌های مربوط به دانه مانند مورفولوژی، رنگ و اندازه دانه، ساختار و ترکیبات پوسته دانه، شکل رویان، نوع ذخایر دانه و وجود یا فقدان اندوسپرم دارای ارزش تاکسونومیک به ویژه در سطح جنس می‌باشند (۱۰). این شاخص‌ها به خصوص با کاهش ویژگی‌های رویشی و کاهش گل که تعیین روابط فیلوژنتیکی را مشکل می‌نماید، مورد توجه قرار می‌گیرند (۱۳). در حال حاضر از الگوهای تکوینی دانه جهت اهداف مختلفی استفاده می‌شود: حل مشکلات رده‌بندی، ایجاد رابطه خویشاوندی تکاملی و کاربرد آن به عنوان مارکرهای ژنتیکی جهت تعیین ژنوتیپ (۲۸).

جهت شناسایی لیپیدها با روش (Gahan 1984)، لامها پس از طی مراحل پارافین زدایی و آبدهی، با Sudan Black B رنگ آمیزی شدند. شناسایی پروتئین‌ها با روش کوماسی برلیانت بلو (Gahan 1984) انجام شد.

نتایج

تکوین تخمک و اندوسپرم: برش‌های تهیه شده از تخمدان‌های گل‌های گرده‌افشانی نشده (غنچه‌های ۳ میلی-متری)، ویژگی‌های تخمک و ژاگون گیاه *Zygophyllum fabago* را آشکار نمود. تخمک در این گیاه دارای دو پوشش است (شکل ۱- A, B) که در داخل سلول‌های ردیف دوم پوشش خارجی تخمک، با انجام تست سیتوشیمیایی PAS دانه‌های متعدد نشاسته مشخص گردید (شکل ۱- C).

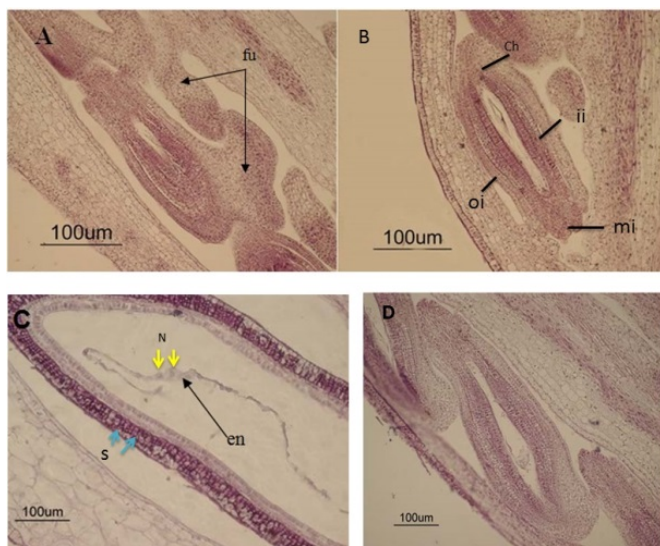
پوشش داخلی تخمک از سه تا چهار ردیف سلول تشکیل شده است و در ایجاد میکروپیل نقش دارند. لایه سلول اپیدرم و یک تا دو ردیف سلول پارانشیمی در فاصله میان آنها قرار دارد که همگی دورتا دور کیسه رویانی را احاطه کرده اند. دانه‌های نشاسته در سلول‌های اپیدرم خارجی به مقدار فراوان وجود دارد که با فلش مشخص شده است (شکل ۱- C).

جهت بررسی های بافت شناسی، سیتوشیمیایی و تکوینی از محوطه دانشگاه تبریز جمع آوری شدند.

تهیه نمونه های Whole mount: به منظور مطالعه مقدار فضای اشغال شده توسط جنین در دانه، ابتدا دانه ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۰٫۵ درصد ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد از زایل شدن رنگ آنها بلافاصله به داخل آب مقطر منتقل شدند، برای شفاف شدن ابتدا ۱۵ دقیقه در داخل الکل ۹۷ درصد قرار گرفته و سپس به داخل محلول الکل-گزیلول منتقل شدند و با لوپ مناسب مطالعه و عکس برداری گردیدند (۷).

مطالعه بافت شناسی: نمونه‌ها پس از تثبیت در فیکساتور (FAA) و فرمال کلسیم (جهت شناسایی ترکیبات فنولی و لیپیدها)، گذراندن مراحل آب‌گیری با درجات رو به افزایش الکل، شفاف سازی با گزیلول، قالب گیری در پارافین، برش گیری با میکروتوم و درنهایت نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و سافرانین-فست گرین برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شدند (۷).

مطالعه سیتوشیمیایی: شناسایی پلی ساکارید ها به روش Periodic Acid Schiff (PAS) با رنگ آمیزی هماتوکسیلین، لایت گرین و تولوئیدین بلو ۲ درصد (۷) صورت گرفت.



شکل ۱- برش طولی تخمک رنگ‌آمیزی شده با روش هماتوکسیلین. A, B: پوشش داخلی و خارجی تخمک. C: هسته‌های آزاد اندوسپرم که هسته‌ها

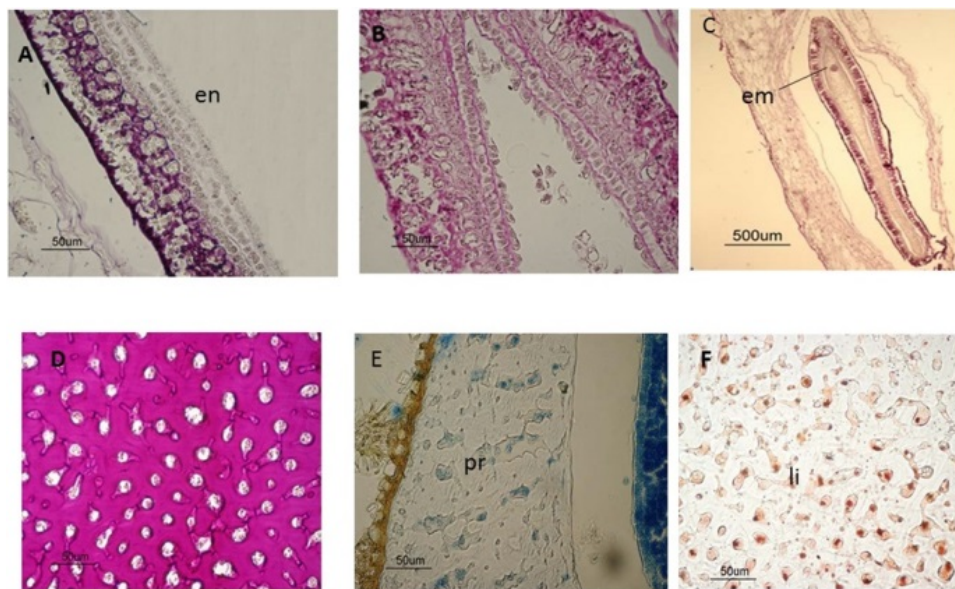
با فلش زرد رنگ و دانه‌های نشاسته با فلش آبی مشخص شده است. D: شروع تقسیمات آندوسپرم قبل از نمو رویان. mi: میکروپیل، fu: فونیکول، ii: پوشش داخلی تخمک، Oi: پوشش خارجی تخمک، ch: شالاز، en: آندوسپرم، N: هسته، S: نشانسته.

در مرحله بعد، در فضای کیسه جنینی دیواره‌های متعددی مابین هسته‌های آزاد تشکیل می‌گردد (شکل ۲-B) و آندوسپرم به تدریج از سمت قطب میکروپیلی، سلولی می‌شود. در نهایت در مرحله رویان کروی، فضای کیسه جنینی به‌طور کامل با سلول‌های آندوسپرم پر می‌گردد (شکل ۲-C و شکل ۳-A). نتایج نشان می‌دهد که بافت آندوسپرم تا مراحل پایانی تکوین دانه تحلیل نمی‌رود، در نتیجه دانه از نوع آندوسپرم دار معرفی می‌گردد (شکل ۳-C, D).

با ادامه رشد جنین تا رسیدن به مرحله لپه‌ای شکل، دانه‌های نشاسته در سلول‌های آندوسپرم تجزیه می‌شوند (شکل ۳-E). زمانیکه دانه زرد رنگ است، ضخیم‌شدگی دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم به حداکثر میزان خود می‌رسد (شکل ۲-D). تست‌های سیتوشیمیایی نشان داد که ذخایر سلول در دانه بالغ، بیشتر لیپیدی است (شکل ۲-E و F).

با رشد بیشتر تخمدان، اندازه تخمک‌ها نیز بزرگتر می‌شود. در طول این مراحل و تکوین آندوسپرم، به تدریج لایه‌های پوشش تخمک دچار تغییر می‌گردد. به گونه‌ای که کیسه جنینی با سلول‌های آندوسپرم پر می‌شود (شکل ۲-B, C).

با توجه به نمونه‌های مطالعه شده، بعد از لقاح در فضای کیسه جنینی هسته‌های آزاد آندوسپرم قابل مشاهده می‌باشد. در این مرحله هیچ‌گونه دیواره‌ای در اطراف هسته‌ها دیده نمی‌شود و تنها مقداری سیتوپلاسم اطراف هسته‌های آزاد را فراگرفته است. بنابراین آندوسپرم تشکیل یافته در این گیاه در این مرحله از نوع آندوسپرم هسته‌ای می‌باشد. این هسته‌ها به شکل رشته‌ای در فضای کیسه جنینی قرار می‌گیرند که با فلش نمایش داده شده است (شکل ۱-C). در واقع هرچند تقسیم هسته‌های آزاد آندوسپرم نسبت به سلول تخم سریعتر آغاز می‌شود اما به نظر می‌رسد فرآیند سیتوکینز به کندی ادامه پیدا می‌کند. سپس هسته‌ها به حاشیه کیسه جنینی نقل مکان می‌کنند و به صورت منظم در ردیفی قرار می‌گیرند (شکل ۲-A).



شکل ۲- تکوین آندوسپرم و مواد ذخیره‌ای آن در گیاه قیچ. A: مهاجرت هسته‌های آزاد به حاشیه کیسه جنینی. B: سلولی شدن آندوسپرم (en) در بخش میکروپیلی. C: نمای کلی تخمک حاوی رویان کروی (em) که کامل شدن مرحله سلولی آندوسپرم را نیز نشان می‌دهد. D: افزایش ضخیم

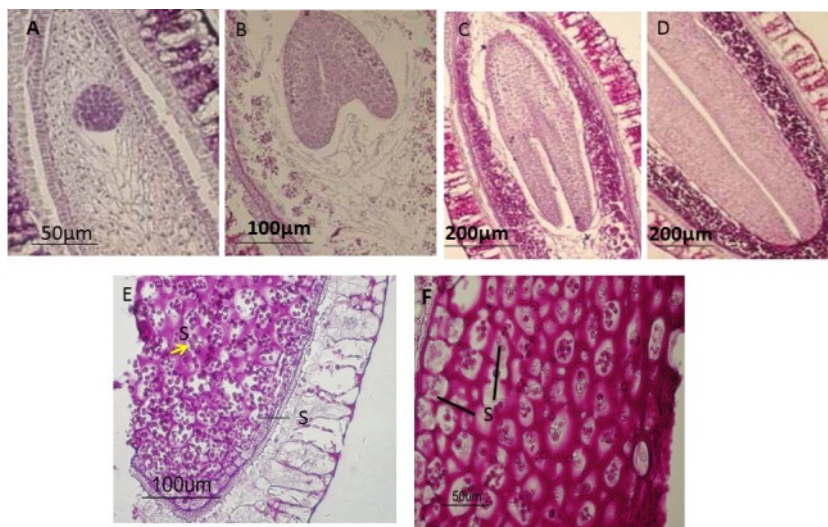
شدگی دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم رنگ‌آمیزی شده با روش E,F.PAS: وجود ذرات پروتئینی (pr) و ذرات لیپیدی (li) در آندوسپرم.

رویوان زایی: از تغییرات دانه طی رویوان زایی می‌توان به سلولی شدن آندوسپرم در مرحله رویوان کروی اشاره کرد (شکل ۳-A). همچنین در مرحله رویوان قلبی سلول‌های ردیف اول آندوسپرم نسبت به سایر سلول‌های بافت آندوسپرم کوچک‌ترند و این حالت تا پایان رشد دانه حفظ می‌گردد (شکل ۳-B). سپس با ادامه رشد رویوان و رسیدن به مرحله اژدری شکل، دانه‌های نشاسته در سلول‌های آندوسپرم در حاشیه کیسه جنینی اندازه کوچک‌تری نسبت به دانه‌های نشاسته سلول‌های سایر بخش‌های بافت آندوسپرم دارند (شکل ۳-C). در ادامه نمو رویوان، با تشکیل لپه‌های کشیده، محور جنینی کامل می‌شود. سلول‌های درشت مرکزی بافت آندوسپرم توسط لپه‌های رشد یافته جنین جایگزین شده و بافت آندوسپرم به‌طور یکنواخت، به صورت ۵-۶ لایه فشرده اطراف جنین را احاطه می‌کنند. بنابراین رویوان بخش اعظم فضای کیسه جنینی را اشغال می‌کند اما آندوسپرم به مقدار کمی تحلیل می‌رود و تا انتهای تکوین دانه باقی می‌ماند (شکل ۳-C,D).

در واقع به طور کلی مراحل تکوین آندوسپرم گیاه قیچ در چند مرحله مشخص به شرح زیر است:

۱- تقسیمات اولیه آندوسپرم و تشکیل آندوسپرم هسته‌ای،
۲- سلولی شدن آندوسپرم،
۳- ظهور دانه‌های نشاسته در بافت آندوسپرم،
۴- هیدرولیز دانه‌های نشاسته،
۵- ضخیم‌شدگی غیریکنواخت دیواره‌های سلول‌های بافت آندوسپرم و در نتیجه ایجاد حفره‌های سلولی کوچک یا نامنظم در این بافت (شکل ۲-D)،
۴- ذخیره‌شدن مواد لیپیدی و پروتئینی در بافت آندوسپرم.

در آندوسپرم قیچ از آنجایی که در طول نمو رویوان، کاهش دانه‌های نشاسته دیده نمی‌شود، به نظر می‌رسد در گیاه قیچ دانه‌های نشاسته در تغذیه رویوانی نقش ندارند. از طرف دیگر با کاهش تدریجی آنها در اواخر مرحله رویوانی، که همزمان با ضخیم شدن دیواره سلول‌های آندوسپرم می‌باشد، به نظر می‌رسد که این دانه‌ها در جهت ضخیم شدن دیواره‌ها به مصرف می‌رسند (شکل ۳-F). شاهد برای این امر مشاهده دانه‌های نشاسته‌ای است که بخش‌هایی از آن به‌مصرف رسیده است. دیواره‌های ضخیم آندوسپرم، حتی پس از بلوغ نیز باقی می‌مانند (شکل ۳-D).



شکل ۳- رویان گیاه قیچ. A: رویان کروی شکل. B: رویان قلبی شکل. C: رویان اژدری. D: رشد و گسترش لپه‌ها. E: آغاز ضخیم شدن دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم و وجود دانه‌های نشاسته بزرگتر (فلش زرد) در مرکز و دانه نشاسته کوچکتر در حاشیه بافت آندوسپرم (فلش مشکی). F: افزایش

هیدرولیز دانه‌های نشاسته و ضخیم شدن دیواره‌های سلول‌های آندوسپرم همراه با نمو رویان. S: دانه نشاسته.

قرار گرفته، اندازه درشتی نسبت به سلول‌های پروتودرمی داشته و بیشترین ذخایر را دارا می‌باشند.

۳- دسته سوم سلول‌های پروکامبیومی می‌باشند که سلول‌هایی کشیده و باریک می‌باشند. مجموعه سلول‌های پروکامبیومی در برش‌های طولی به صورت استوانه‌ای یا در حقیقت محوری در هیپوکوتیل و در هر کدام از لپه‌ها دیده می‌شوند، که تا راس لپه کشیده می‌شوند.

شکل ۴-D رویان گیاه قیچ را که با روش کوماسی برلیانت بلو رنگ آمیزی شده اند نشان می‌دهد. دانه‌های پروتئینی به رنگ آبی در شکل دیده می‌شوند. سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی با تراکم بیشتر می‌باشند، در حالیکه در سلول‌های پروتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر دیده می‌شوند. سلول‌های مریستم انتهایی ساقه نیز فاقد اجسام پروتئینی می‌باشند (شکل ۴-D). شکل ۴-E مربوط به رویان بالغ است که با معرف سودان سیاه رنگ آمیزی شده است. این معرف علاوه بر لپیده‌های ذخیره‌ای، غشاها و لایه کوتیکول را نیز مشخص می‌نماید. با توجه به شکل مشخص می‌شود رویان بالغ در گیاه مورد مطالعه فاقد ذخایر لیپیدی می‌باشد. در بررسی مقاطع طولی رنگ آمیزی شده با روش PAS، هیچ نوع انباشتگی از دانه‌های نشاسته در بافت‌های ساختاری جنین اعم از پروتودرم، پارانشیم و پروکامبیوم مشاهده نشد (شکل ۴-F). یکی از ویژگی‌های دانه موقعیت رویان در داخل آن است. مطالعه دانه‌های روشن سازی شده نشان داد که در این گیاه دانه از نوع قاشقکی بوده و رویان با اندازه ۴ میلی‌متری، حدود ۳:۴ دانه را اشغال می‌کند که از این جهت جزء دانه‌های غالب تقسیم بندی می‌شوند (شکل ۴-G).

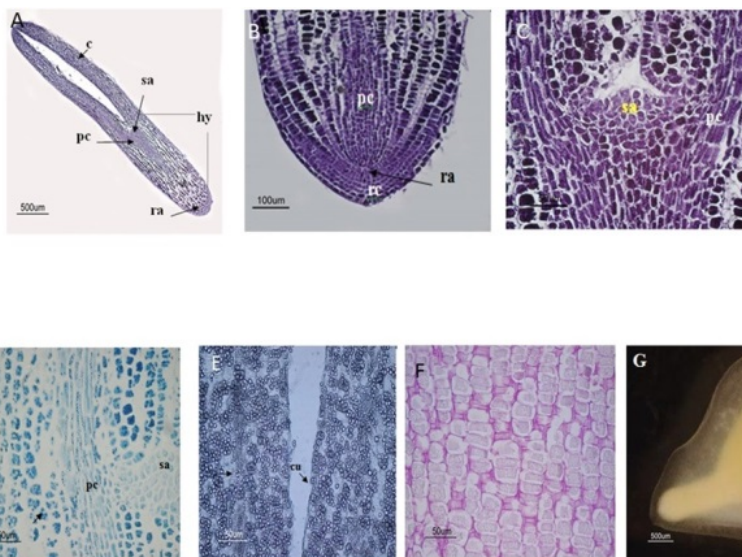
بحث و نتیجه گیری

با مشخص شدن ویژگی‌های دانه، بسیاری از جنس‌های گیاهی در خانواده‌ی جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند (۲۲).

تمامی سلول‌ها هنوز مملو از دانه‌های نشاسته می‌باشند و اندازه این دانه‌ها نیز نسبت به مرحله جنین اژدری شکل درشت‌تر شده است. رویان بالغ در این گیاه دارای هیپوکوتیل نسبتاً طویل بوده و لپه‌ها اندازه بزرگی دارند (شکل ۴-A).

شکل ۴ رویان بالغ را در گیاه قیچ نشان می‌دهد که تمام بخش‌های آن شامل مریستم انتهایی ریشه، هیپوکوتیل، مریستم انتهایی ساقه و لپه‌ها مشخص می‌باشد. مریستم راسی ریشه در قطب میکروپیلی رویان قرار گرفته و مریستم راسی ساقه درست در مقابل مریستم ریشه واقع شده است. مریستم راسی ریشه در این گیاه مریستمی فعال می‌باشد که چندین لایه سلول کلاهک ریشه تولید کرده است. این سلول‌ها در نتیجه تقسیمات مماسی مریستم ریشه حاصل شده‌اند. سلول‌های کلاهک در اندازه کوچک و بسیار منظم در زیر مریستم راسی ریشه دیده می‌شوند (شکل ۴-B). همچنین سلول‌های پروکامبیومی در بخش محوری میانی قابل مشاهده می‌باشند. این سلول‌ها درست از محل مریستم راسی ریشه شروع شده و تا انتهای لپه‌ها امتداد می‌یابند. مریستم راسی ساقه در این گیاه گنبدی شکل، فاقد ساختار لایه لایه (تونیکا) و منطقه بندی شده است. مریستم انتهایی ساقه در این گیاه فعالیت نکرده زیرا آغازه‌های برگی مشاهده نمی‌شوند (شکل ۴-C). همچنین سطوح خارجی پروتودرم را در تمام قسمت‌های رویان، لایه کوتیکول پوشانده است که بعد از رنگ آمیزی با معرف سودان سیاه قابل تشخیص است (شکل ۴-E). به طور کلی در هیپوکوتیل و لپه‌ها سه دسته سلول قابل تشخیص است که عبارتند از:

- ۱- سلول‌های پروتودرمی که این سلول‌ها اندازه کوچک داشته، در یک ردیف قرار گرفته‌اند.
- ۲- سلول‌های پارانشیمی که در زیر سلول‌های پروتودرمی



شکل ۴- مرحله رویان لپه‌ای و ذخایر آن. A: رویان لپه‌ای. B: مریستم راس ریشه. C: مریستم راس ساقه. D: اجسام پروتئینی در بافت رویان، رنگ آمیزی شده با روش کوماسی برلیانت بلو، فلش‌ها اجسام پروتئینی را نشان می‌دهند. E: فلش‌ها اجسام پروتئینی را نشان می‌دهند که دارای غشای لیپیدی می‌باشند. لایه کوتیکول سطح رویان را پوشانده است. F: بافت رویان رنگ آمیزی شده با روش PAS، دانه‌های شفاف اجسام پروتئینی هستند که با معرف پلی ساکاریداها رنگ آمیزی نشده‌اند. G: موقعیت رویان در دانه شفاف شده قیچ و حجم اشغال شده توسط آن. Em: رویان، sa: مریستم راسی ساقه، pc: پروکامبیوم، ra: مریستم ریشه، tc: کلاهک ریشه، c: لپه، hy: هیپوکوتیل، cu: لایه کوتیکول.

چگونگی نمو آندوسپرم هسته‌ای به طور گسترده‌ای در گیاهان مختلف بررسی شده است. در غلات نمو آندوسپرم هسته‌ای به ۴ مرحله شامل مرحله سنوسیتی، مرحله سلولی شدن، مرحله تمایز یابی و بلوغ، و مرحله مرگ سلولی برنامه ریزی شده تقسیم می‌شود. در آرآبیدوپسیس نمو آندوسپرم به گونه دیگری است. کمی بعد از سلولی شدن، آندوسپرم از بین می‌رود و تنها یک لایه آندوسپرم اطراف جنین بالغ باقی می‌ماند (۱۸).

بر اساس مطالعه حاضر نمو آندوسپرم در قیچ ابتدا از نوع هسته‌ای می‌باشد و سپس به نوع سلولی تبدیل می‌گردد. در واقع در گیاه قیچ سلولی شدن از بخش میکروپیلی و حاشیه‌های کیسه رویانی شروع شده و به تدریج پر شدن سلول‌ها به طرف مرکز کیسه رویانی ادامه می‌یابد. زمانی که سلول تخم در مرحله استراحت قرار گرفته است، سلول مادر آندوسپرم تقسیمات میتوزی سریعی را انجام می‌دهد و تعدادی هسته آزاد در سیتوپلاسم سلول مرکزی تولید می‌شود (۱۱).

همچنین روشن شدن این اطلاعات در مقایسه‌ی فیلوژنی گیاهان نیز مؤثر است (۲۰). دانه قیچ با شکل بیضی-لوزی مانند و برآمدگی‌هایی که تریبانات پوسته دانه را ایجاد می‌کنند، شناخته می‌شود (۱۷). شروع شکل‌گیری پوسته دانه به لقاح بستگی دارد، زیرا سیگنال‌هایی از محصول لقاح ارسال می‌شوند که برای تکوین پوسته دانه مورد نیاز هستند (۵). همچنین تکوین آندوسپرم نیز با تکوین پوسته دانه مرتبط است، به طوری که سیگنال‌های آغاز کننده‌ی تکوین پوسته دانه توسط سلول‌های مرکزی لقاح یافته/ آندوسپرم ایجاد می‌شود (۲۴). نقش تنظیم کننده‌های رشد نیز در شکل‌گیری پوسته تخمک و در نهایت پوسته دانه مؤثر بوده و موجب رشد و گسترش سلول‌ها می‌گردند، علاوه بر این با تنظیم مولکولی منجر به کنترل سیگنال‌های تکوین پوسته‌ی دانه می‌شوند (۱۲). مطالعات نشان داد که پوسته‌ی تخمک سیگنال‌هایی (از جمله اکسین) را از آندوسپرم دریافت می‌کند که بر ضخیم شدن دیواره سلولی آن تأثیر می‌گذارند، احتمالاً ضخیم شدن دیواره پوسته دانه قیچ با این امر قابل توجیه می‌باشد (۳).

شدید فضای درون سلولی می‌شود. همچنین دانه از نوع اندوسپرم دار معرفی می‌گردد و بافت اندوسپرم تا مراحل پایانی تکوین دانه باقی می‌ماند.

مطالعات سیتوشیمیایی بافت اندوسپرم نشان داده که پروتئین ماده مهم ذخیره‌ای به شمار می‌رود که در اندوسپرم یافت می‌شود (۲۶ و ۲۴). از دیگر مواد ذخیره‌ای در اندوسپرم لیپیدها می‌باشند که غالب مواد ذخیره‌ای دانه‌های روغنی را به خود اختصاص داده‌اند (۱۸). این اجسام به وسیله نیم غشای فسفولیپیدی احاطه شده‌اند. علاوه بر این ترکیبات که جزو مواد مهم ذخیره‌ای به شمار می‌روند، مواد معدنی و کاروتنوئیدها هم در اندوسپرم انباشته می‌شوند (۱۱). این بافت همانند سوسپانور رویان دارای زندگی کوتاهی است (۲۱) و می‌تواند تغییراتی را متحمل شده و نقش‌های متعددی از جمله تغذیه جنین در حال رشد، مشارکت فعال در جوانه زنی و تحمیل خفتگی بر رویان از طریق عوامل فیزیکی و شیمیایی ایفا کند (۱۸). در واقع اجسام پروتئینی از متداولترین مواد ذخیره‌ای دانه‌ها محسوب می‌شود که هم در رویان و هم در اندوسپرم بسیاری از تیره‌های گیاهی مشاهده می‌شود. از نظر ساختاری اجسام پروتئینی از بخشی تحت عنوان ماتریکس پروتئینی و بخش دیگری به نام گلوبوئید یا کریستالوئید تشکیل شده‌اند که بخش ماتریکس منبع ذخیره‌کننده نیتروژن برای گیاه محسوب شده و بخش گلوبوئیدی منبع ذخیره‌کننده عناصر می‌باشد. این اجسام بوسیله غشای فسفولیپیدی احاطه شده‌اند و در برخی از گیاهان به وسیله دانه‌های لیپیدی محصور می‌شوند (۲۱). با توجه به نتایج این تحقیق، در رویان بالغ سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی با تراکم بیشتر می‌باشند، در حالیکه در سلول‌های پروتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر دیده می‌شوند. سلول‌های مرستم انتهایی ساقه نیز فاقد اجسام پروتئینی می‌باشند. در حالیکه مشخص شد رویان در گیاه مورد مطالعه فاقد ذخایر لیپیدی می‌باشد.

بررسی‌های بافت‌شناسی در رابطه با نمو آندوسپرم قیچ نیز نشان داد که اولین هسته‌های آزاد در بخش مرکزی کیسه جنینی تشکیل می‌گردد. پس از انتقال این هسته‌ها به حاشیه کیسه جنینی، اولین دیواره‌ها در بین هسته‌های بخش میکروویلی تشکیل می‌شود. تشکیل اولین دیواره‌ها در این گیاه قابل مقایسه با سلولی‌شدن می‌باشد. مطالعات نشان داده که آندوسپرم هسته‌ای بعدها با تشکیل دیواره بین هسته‌های آزاد سلولی می‌گردد، که این امر حالت خاصی از تکوین آندوسپرم است و می‌تواند به‌عنوان نوعی سازش دو مرحله‌ای و مناسب با توجه به نقش تغذیه‌ای آن در جهت نمو رویان، محسوب گردد (۱۶). در واقع زمانی که آندوسپرم در فاز هسته‌ای می‌باشد، مواد مغذی که از طریق بافت‌های مادری کسب می‌گردد، بدون گذر از دیواره‌های سلولی به سرعت به داخل بافت آندوسپرم وارد می‌شود و در اختیار رویان جوان و در حال رشد قرار می‌گیرد. در مراحل بعد که رویان رشد یافته، تخریب فیزیکی و آنزیمی آندوسپرم به وسیله رویان می‌تواند اتفاق بیافتد و بنابراین در هنگام رشد رویان بین هسته‌های آزاد دیواره تشکیل می‌گردد و آندوسپرم به سلول‌هایی انفرادی تبدیل می‌شود تا از تجزیه و تخریب بی‌رویه توسط رویان درامان بماند (۱۱). وجود آندوسپرم هسته‌ای یا حداقل ایجاد این مرحله قبل از سلولی‌شدن آندوسپرم، در مواردی که سلولی‌شدن پس از تکمیل مراحل از نمو رویان (که نیاز به مواد غذایی بسیار بالاست)، احتمالاً به این دلیل است که انتقال مواد مغذی به رویان در این مراحل بسیار سریع می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد هسته‌های آزاد آندوسپرم در این مراحل به‌عنوان یک واسطه برای انتقال مواد غذایی به جنین عمل می‌کنند (۱۸).

دانه‌ها بر اساس وجود و یا عدم وجود آندوسپرم به دو دسته دانه‌های دارای آندوسپرم و دانه‌های فاقد آندوسپرم تقسیم می‌شوند (۲۱). با توجه به نتایج مشخص شده که آندوسپرم در این گیاه از سلول‌هایی با دیواره ضخیم تشکیل شده است. ضخیم‌شدگی دیواره موجب کاهش

اندوسپرم با تکوین رویان قیچ نشان داد که مراحل اولیه نمو بافت‌های همراه رویان، بسیار سریع‌تر اتفاق می‌افتد و رشد رویان به سرعت کامل می‌شود. درحالی‌که نمو اندوسپرم از مرحله گل‌های گرده‌افشانی شده آغاز می‌شود اما به کندی ادامه می‌یابد. آندوسپرم سلولی شده در این گیاه به تدریج در کیسه جنینی توسعه پیدا می‌کند و کل فضای کیسه جنینی را اشغال می‌نماید. درواقع دانه از نوع اندوسپرم دار بوده و بافت اندوسپرم تا مرحله رویان بالغ باقی مانده و تحلیل نمی‌رود. درواقع از مرحله رویان کروی که اندوسپرم شروع به سلولی شدن می‌کند، تا پایان رشد لپه‌ها و بلوغ جنین، تنها رویداد مهمی که در اندوسپرم اتفاق می‌افتد، تشکیل دانه‌های نشاسته و تا حدودی افزایش حجم این دانه‌ها می‌باشد که به نظر می‌رسد توسط جنین درحال رشد مصرف می‌گردند. درعین‌حال در سلول‌های اپیدرم خارجی نیز تنها افزایش حجم این سلول‌ها و تحلیل رفتن دانه‌های نشاسته در این سلول‌ها اتفاق می‌افتد. در پایان رشد رویان، که درواقع اساسی‌ترین مراحل تکوین بافت‌های همراه رویان می‌باشد، رویان متحمل تغییر چشمگیری نمی‌گردد. در این مراحل در سلول‌های اندوسپرم، ضخیم شدن دیواره‌ها و ذخیره شدن مواد لیپیدی و پروتئینی اتفاق می‌افتد. در رویان بالغ گیاه قیچ تمام بخش‌ها شامل مریستم انتهایی ریشه، هیپوکوتیل، مریستم انتهایی ساقه و لپه‌ها قابل تشخیص می‌باشد. رویان بالغ در این گیاه دارای هیپوکوتیل نسبتاً طویل بوده و لپه‌ها اندازه بزرگی دارند. همچنین بررسی سیتوشیمی رویان بالغ نشان داد که تمامی سلول‌ها مملو از دانه‌های نشاسته می‌باشند، سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی با تراکم بیشتری در حالیکه در سلول‌های پرتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر دیده می‌شوند. برخلاف اندوسپرم، در بافت رویان بالغ مواد کربوهیدراتی تشخیص داده نشد.

در انتها بررسی تزئینات سطحی و تغییرات مورفولوژیکی

در مورد دانه قیچ نیز این فرضیه که دانه‌های نشاسته پیش ساز پلی‌ساکاریدهای دیواره هستند می‌تواند صحیح باشد زیرا انطباق زمانی نزدیکی بین تخریب دانه‌های نشاسته و تشکیل دیواره‌های اولیه توسعه‌یافته در سلول‌های اپیدرم خارجی وجود دارد. فرضیه دیگری که مطرح می‌شود جذب ترکیبات حاصل از هیدرولیز دانه‌های نشاسته توسط جنین و اندوسپرم درحال نمو می‌باشد، زیرا متابولیسم مواد قندی یکی از مکانیسم‌های کنترل نمو جنین می‌باشد. نقش این ذخایر پلی‌ساکاریدی به عنوان تأمین‌کننده مواد غذایی جنین در حال نمو پیشنهاد شده است (۲۳). در این گیاه با توجه به ویژگی‌های نمودی جنین و اندوسپرم به نظر می‌رسد دانه‌های نشاسته پوسسته نقشی در کنترل نمو جنین ایفا نمی‌کنند.

در بافت اندوسپرم مواد ذخیره‌ای به شیوه‌های مختلفی به‌عنوان مثال از بخش حاشیه‌ای به سمت مرکز (مانند گیاه *Z. fabago*) و از قسمت میکروپیل به سمت شالاز شروع به انباشته شدن می‌کند. در گندم سنتز نشاسته ابتدا در سلول‌های بخش مرکزی اتفاق می‌افتد و درنهایت نیز تجمع نشاسته در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های حاشیه‌ای بیشتر است (۲۷). در اندوسپرم قیچ از آنجایی‌که در طول نمو جنین، کاهش دانه‌های نشاسته دیده نمی‌شود، به نظر می‌رسد در گیاه قیچ دانه‌های نشاسته در تغذیه جنین نقش کمتری دارند. از طرف دیگر با کاهش تدریجی آنها هم‌زمان با ضخیم شدن دیواره‌های نازک سلول‌های اندوسپرم، به نظر می‌رسد که این دانه‌ها در جهت ضخیم شدن دیواره‌ها به مصرف می‌رسند. دیواره‌های ضخیم اندوسپرم، حتی پس از بلوغ نیز باقی می‌مانند، بنابراین به نظر می‌رسد این دیواره‌ها پس از جوانه زنی دانه هیدرولیز شده و به مصرف دانه‌رست جوان می‌رسند، نتایج فوق با Figueiredo and Kohler (۲۰۱۶) مطابقت دارد.

به طور کلی مطالعه دانه‌ی قیچ مشخص کرده است که تخمک از نوع واژگون و دو پوسسته‌ای است. مقایسه تکوین

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مسئولان آزمایشگاه سلولی تکوین گیاهی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

سلول‌های اپیدرم خارجی پوسته دانه با جریان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در مراحل مختلف نمو به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره جهت تکمیل مطالعات تکوینی و روشن شدن ویژگی‌های سیتولوژیکی پیشنهاد می‌شود.

منابع

- Behnke, H.D., Hummel, E., Hillmer, S., Sauer-Gurth, H., Gonzalez, J., Wink, M. 2013. A revision of African Velloziaceae based on leaf anatomy characters and *rbcL* nucleotide sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172, 22–94.
- Bellstedt, D.U., Van-Zyl, L., Marais, E.M., Bytebier, B., De-Villiers, C.A., Makwavela, A.M., Dreyer, L.L. 2008. Phylogenetic relationships, character evolution and biogeography of southern African members of *Zygophyllum* (Zygophyllaceae) based on three plastid regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 932-949.
- Creff, A., Brocard, L., Ingram, G. 2015. A mechanically sensitive cell layer regulates the physical properties of the Arabidopsis seed coat. *Nature Communications* 6, 63-82.
- Erdemoglu N, Kusmenoglu S. 2003. Fatty Acid composition of *Zygophyllum fabago* seeds. *Chemistry of Natural compounds* 39, 595-596.
- Figueiredo, DD., Batista, RA., Roszak, P.J., Kohler, C. 2015. Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nature Plants* 1, 15184.
- Figueiredo, DD., Kohler, C. 2016. Bridging the generation gap: communication between maternal sporophyte, female gametophyte and fertilization products. *Current Opinion in Plant Biology* 29, 16–20.
- Gahan, P.B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry *Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction*. Academic Press, London.
- Galek, R., Kozak, B., Biela, A., Zalewskid, D., Sawickasienkiewize, E., Spychala, K., Stawinski, S. 2016. Seed Coat Thickness Differentiation and Genetic polymorphism for *Lupinus mutabilis* Sweet breeding. *Turkish Journal of Field Crops* 21, 305-312.
- Ghazanfar, Sh., Osborne, J. 2015. Typification of *Zygophyllum propinquum* Decne. and *Z. coccineum*. (Zygophyllaceae) and a key to *Tetraena* in SW Asia. *Kew bulletin* 70, 1-9.
- Jensen, W.A. 1962. *Botanical histochemistry*. Freeman, W.H. and Company.
- Lersten, N. R. 2004. *Flowering Plant embryology*. Blackwell publishing, New Jersey.
- Liao, CY., Smet, W., Brunoud, G., Yoshida, S., Vernoux, T., Weijers, D. 2015. Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature Methods* 12, 207–210.
- Patil, P., Malik, S.K., Sutar, S., Yadav, S.R., John, J., Bhat, K.V. 2015. Taxonomic Importance of Seed Macro- and Micro-Morphology in *Abelmoschus* (Malvaceae). *Nordic Journal Botany* 33, 696–707.
- Queiroz, R.T., De, A.M., Tozzi, G.A., Lewis, G. P. 2013. Seed morphology: An addition to the taxonomy of *Tephrosia* (Leguminosae Papilionoideae, Millettieae) from South America. *Plant Systematics and Evolution* 299, 459 – 470.
- Schenk, J.J., Hodgson, W., Hufford, L. 2013. *Mentzelia canyonensis* sp. nov.: a new species endemic to the Grand Canyon, Arizona, U.S.A. *Brittonia* 65, 408–416.
- Schenk, J.J., Sullivan, M., Washburn, G., Franta, R., Chambers, M. 2016. Allometric Relationships Better Explain Seed Coat Microsculpture Traits In *Mentzella* Section *Bartonia* (loasaceae) Than Ecology Or Dispersal. *International journal of plant science* 177, 263–276.
- Semerdjieva, IB., Yankova-Tsvetkova, E. 2017. Pollen and seed morphology of *Zygophyllum fabago* and *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) from Bulgaria. *Phyton* 86, 318-324.
- Sousa-Baena, M., De Menezes, N. 2014. Seed Coat Development In Velloziaceae: Primary Homology assessment and Insight On Seed Coat evolution. *American Journal of Botany* 101 (9): 1409 – 1422.

19. Szkudlarz, P., Celka, z. 2016. Morphological Characters Of The Seed Coat In Selected Species Of The Genus *Hypericum* L. And Their Taxonomic Value. *Biodiversity Research and Conservation* 44, 1-9.
20. Takahashi, Y., Somta, P., Muto, C., Iseki, K., Naito, K., Pandiyan, M., Natesan, S., Tomooka N. 2016. Novel Genetic Resources in the Genus *Vigna* Unveiled from Gene Bank Accessions. *PLoS ONE* 11, e0147568.
21. Terziyski, D. 1981. SEM microscopy-problems, application, prospects for development in the biological sciences in the country. *Scientific Works Agricultural Institute, Plovdiv* 26, 115-121.
22. Umdale, S.D., Aitawade, M.M., Gaikwad, N.B., Madhavan, L., Yadav, S.R., Rao, S.R., Bhat, K.V. 2017. Pollen Morphology of Asian *Vigna* Species (Genus *Vigna*; Subgenus *Ceratotropis*) from India and Its Taxonomic Implications. *Turkish Journal of Botany* 41, 75-81.
23. Voiniciuc, c., Yang, B., Heinrich-Wilhelm Schmidt, M., Günl, M., Usadel, B. 2015. Starting to Gel: How *Arabidopsis* Seed Coat Epidermal Cells Produce Specialized Secondary Cell Walls. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 3452-3473.
24. Weijers, D., Wagner, D. 2016. Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annual Review of Plant Biology* 67, 539-574.
25. Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J., Lyoid, A.L. 2000. *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The plant journal* 22, 483-493.
26. Wu, Sh., Lin, L., Li, H., Yu, Sh., Zhang, L., Wang, W. 2015. Evolution of Asian Interior Arid-Zone Biota: Evidence from the Diversification of Asian *Zygophyllum* (*Zygophyllaceae*). *PLoS ONE* 10, 1-17.
27. Xu, X.Y., Fan, R., Zheng, R., Li, C.M., Yu, D.Y. 2011. Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans. *Journal of Zhejiang University Science* 12, 507-517.
28. Zeng, C.L., Wu, X.M., Wang, J.B. 2006. Seed Coat Development And Its Evolutionary Implication in Diploid And Amphidiploid Brassica Species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48, 15-22.
29. Zhang, F., Fu, P.Ch., Gao, C.B., Chen, Sh.L. 2013. Comparative study on plant seed morphological characteristics of *Zygophyl* *Zygophyllaceae* and two new families separated from it. *Plant Diversity and Resources* 35, 280-284.

Histological and Cytochemical Study of Embryogenesis stages in *Zygophyllum fabago*

Mohajel Kazemi E., Kazemian M., Majidzadeh F. and Aliasgharpour M.

Dept. of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

The formation of the seed is part of the process of reproduction in seed plants. The study of the ontogeny of endosperm and embryogenesis was considered in current research using microscopic techniques. The samples were collected from different developmental stages. Then, the fixed samples were studied by different histochemical methods. The observations indicated that the ovule was of the anatropous and bitegmic type. The outer layers were removed in the early stages. Thus, the seeds of *Z. fabago* were categorized of testal type. During the early developmental stages, the endosperm was of nuclear type and then changed into the cellular type. This makes it easier for the embryo to connect with endosperm tissue in early stages. The endosperm develops gradually toward the central spaces and occupies the entire space of the embryo sac. In fact, the endosperm tissue remains until mature embryo stage and was not degenerated. Also globular, heart-shaped, torpedo-shaped and mature embryo stages along with the RAM, hypocotyl, and SAM were observed. Cytochemical tests indicated that in the later stage of seed development, the formation of starch grains and the strongly thickening of cell walls were occurred, causing considerable reduction of cell cavities as well as hardening of this tissue. In the other hand, the cell storage in the endosperm tissue was more lipid-based than proteinaceous compounds. But in mature embryo no carbohydrate was detected.

Key words: bitegmic, embryo, histological techniques, nuclear endosperm.