فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۲ ص. ۱۰-۱

**مقاله پژوهشی**

# مطالعه بافت‌شناسی مراحل تکوین دانه در گیاه خارخسک (*Tribulus terrestris* L.) خانواده اسپند

**فهیمه مختاری[۱]، الهام محجل کاظمی[۱]، مینا کاظمیان[۱*]، محبوبه علی اصغر پور[۱]، علی موافقی[۱]**

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

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): mina.kazemian69@gmail.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.5.5 DOI:10.30495/JDB.2022.1958006.1302

## چکیده

مطالعه تکوین جنین و نمو آندوسپرم در گونه‌های مختلف گیاهی از دیدگاه فیلوژنتیکی و سیستماتیکی حائز اهمیت است. هدف تحقیق حاضر، بررسی بافت‌شناختی مراحل تکوین دانه در خارخسک (*Tribulus terrestris* L.) توسط مطالعات میکروسکوپی می‌باشد. نمونه‌ها در مراحل مختلف تکوینی پس از تثبیت، با روش‌های مختلف بافت‌شناختی مطالعه شدند. نتایج نشان داد که تخمک‌ها از نوع واژگون، دو پوششی و دارای تمکن محوری هستند. بر اساس بررسی‌های بافت‌شناختی، آندوسپرم در مراحل اولیه از نوع هسته‌ای مشاهده شد که در طی تکوین جنین به نوع سلولی تغییر یافت. در مرحله جنین بالغ، بقایایی از آندوسپرم به صورت ساختار تور مانند در پیرامون لپه‌ها مشاهده شد. با توجه به مطالعات بافت‌شناختی تقسیمات در سلول قاعده‌ای حاصل از سلول تخم، سریع‌تر از سلول راسی اتفاق افتاد. سوسپانسور در مرحله جنین اژدری شکل کاملا از بین رفت. با توجه به مطالعات سیتوشیمیایی، تجمع دانه‌های نشاسته در پوسته دانه در مراحل اولیه تکوین جنین مشاهده شد. همچنین در جنین بالغ ماده ذخیره‌ای سلول‌ها حاوی اجسام پروتئینی و ترکیبات لیپیدی بودند. پوسته دانه از سطح صاف و دو لایه سلول تشکیل شده است که لایه بیرونی واجد بلورهای اگزالات کلسیم می‌باشد. مطالعات میکروسکوپ فلوروسنت نشان داد که در دانه تجمعی از موم‌ها با ماهیت لیپیدی مشاهده شد. به نظر می‌رسد که با توجه به تفاوت ساختاری میان گونه‌های این خانواده، مطالعه ویژگی‌هایی مانند الگوی شکل‌گیری اندام‌ها در گیاه خارخاسک می‌تواند در درک ناهمگنی بین جنس‌های خانواده اسپندیان موثر باشد.

**کلیدواژه‌ها:** آندوسپرم، تمکن محوری، سلول راسی، مطالعات سیتوشیمیایی، میکروسکوپ فلوروسنت.

## مقدمه

خانواده اسپندیان (Zygophyllaceae) متعلق به جداگلبرگان دولپه‌ای می‌باشد که شامل ۲۴ جنس و ۲۴۰ گونه است [۱]. گیاهان این تیره علفی، یکساله یا به صورت بوته‌های پایا و درختچه یا درختی و اغلب خشکی‌پسند هستند. گل‌ها به صورت دو جنس، منظم و شامل ۴ یا ۵ کاسبرگ و گلبرگ هستند. نافه معمولاً دارای ۱۰- ۸ پرچم است اما تعداد پرچم‌ها در برخی از جنس‌ها تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد [۲]. جنس *Tribulus* حدود ۲۵ گونه دارد که معروف‌ترین آن خارخسک (*Tribulus terrestris* L) می‌باشد. مطالعات مختلف بر گیاه خارخسک،

تاثیر قابل توجه موقعیت جغرافیایی رویش را بر میزان مواد موثره آن نشان داده است [۳]. جنس خارخسک شامل گیاهانی یکساله، با انشعابات گسترده بر سطح خاک، برگ‌های مرکب و غالباً متقابل است. گل‌ها زرد، کوچک، منفرد، دارای ۵ کاسبرگ و ۵ گلبرگ و ۱۰ پرچم هستند [۴]. خامه ساده، کلاکه ۵ شاخه، میوه به صورت مجموعه‌ای شیزوکارپ نا شکوفا که در موقع رسیدن قسمت‌های پنجگانه آن (مریکارپ‌ها) از هم جدا و پراکنده می‌شوند [۴]. به عبارتی نحوه پراکندگی گیاه به این صورت است که وقتی میوه‌ها از گیاه مادر جدا می‌شوند، هر کدام از مریکارپ‌های آن در جهت‌های مختلف قرار می‌گیرند. هر مریکارپ شامل ۲ عدد خار بزرگ و چندین خار کوچک می‌باشد، مریکارپ‌ها از طریق خارها به پشم یا موی جانوران، لباس یا کفش انسان متصل شده و به این ترتیب احتمال پراکندگی وسیع این گیاه را فراهم می‌آورد [۳].

چرخه زندگی تمامی گیاهان از الگوی تناوب بین دو مرحله اسپوروفیتی و گامتوفیتی پیروی می‌کند [۵]. پس از نفوذ لوله گرده و ترکیب یکی از آنتروزوئیدها با تخمزا، سلول تخم تشکیل می‌شود. درنهایت با ادامه تقسیمات سلول تخم، جنین تشکیل می‌شود [۶].

اندوسپرم گیاهان گل‌دار درنتیجه‌ی لقاح مضاعف و به دنبال الحاق هسته‌های قطبی سلول مرکزی کیسه رویانی با اسپرم حاصل شده است [۷]. اساس نموی و ژنتیکی تشکیل آندوسپرم در گیاهان گلدار متفاوت از سایر گیاهان دانه‌دار است [۸]. عموماً بافت اندوسپرم به سه نوع دسته‌بندی می‌شود: اندوسپرم هسته‌ای، اندوسپرم سلولی و اندوسپرم هلوبیال. ساختار و اندازه اندوسپرم در دانه‌های بالغ جنس‌های مختلف گیاهی متفاوت است [۹]. درواقع مطالعات جنینی به دوره نموی اطلاق می‌شود که در آن سلول تخم تحت تاثیر مجموعه‌ای از تغییرات سلولی و مورفولوژیکی، در نهایت به جنین بالغ تبدیل می‌گردد [۱۰]. کاربرد ویژگی‌های تکوینی از جمله آناتومی پوسته دانه، چگونگی نمو تخمک، ویژگی‌های کیسه جنینی، نوع جنین و نوع آندوسپرم در مطالعات سیستماتیکی و بررسی‌های فیلوژنتیکی و نیز ضرورت مطالعه نمو جنین برای پیشرفت در زمینه ژنتیک و سایر علوم، اهمیت مطالعات تکوینی اندام ماده را آشکار می‌کند [۱۰].

صفات جنین‌زایی می‌توانند دلیل محکم و منطقی برای افزایش اطلاعات مربوط به گونه خاص در علوم گیاهی فراهم آورند [۱۱]. همچنین جنین‌زایی نقش کلیدی و اصلی در چرخه زندگی گیاهان گلدار ایفا می‌کند [۱۱]. در این تحقیق مراحل نمو جنین و آندوسپرم در گونه خارخسک در شرایط طبیعی و داخل بافت مادری مورد بررسی قرار گرفت. از آنجاییکه ناهمگنی در خانواده Zygophyllaceae دیده می‌شود، بنابراین بررسی هر یک از گونه‌ها از دیدگاه تشریحی و تکوینی می‌تواند در تفکیک بهتر گیاهان این تیره کمک کند و این امر اهمیت مطالعه‌ی جنس‌های خانواده Zygophyllaceae را از لحاظ رده‌بندی نشان می‌دهد. ازین رو مطالعه تکوین جنین از دیدگاه بافت‌شناسی و سیتوشیمیایی به وسیله میکروسکوپ نوری و بررسی تغییرات بافت‌شناسی آندوسپرم در طی نمو جنین از اهداف این پژوهش به شمار می‌رود.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش در مراحل مختلف نموی جهت بررسی‌های تکوینی و سیتوشیمیایی از استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شدند.

به منظور مطالعه مقدار فضای اشغال شده توسط جنین در دانه، ابتدا دانه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (دمای ۶۰ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند و پس از تغییر رنگ آنها به آب مقطر منتقل شدند. جهت شفاف‌سازی ابتدا ۱۵ دقیقه در الکل ۹۷ درصد قرار گرفتند و سپس به محلول الکل-گزیلول منتقل شدند. در نهایت نمونه‌ها با استرئو میکروسکوپ عکس‌برداری شدند [۱۲]. جهت مطالعه میکروسکوپی ساختاری و فراساختاری، نمونه‌ها پس از تثبیت در فیکساتور (۹۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد: ۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال: ۵ میلی‌لیتر فرمالدهید ۳۷ درصد) به مدت ۲۴ ساعت و فرمال کلسیم (جهت شناسایی ترکیبات لیپیدی) به مدت ۱۸ ساعت، آب‌گیری با درجات رو به افزایش الکل، شفاف‌سازی با گزیلول، قالب گیری در پارافین، با میکروتوم R-Jung-Heidelberg (ضخامت ۸-۱۰ میکرومتر) برش‌گیری شدند. درنهایت نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شدند [۱۳]. مقاطع تهیه شده پس از طی مراحل

پارافین‌زدایی و آبدهی، داخل محلول بافر فسفات ۰/۰۲ مولار قرار گرفتند و بلافاصله مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت Nikon Eclipse E1000 انجام گرفت. بررسی فراساختار دانه با میکروسکوپ الکترونی نگاره نیز با دستگاه Zeiss LEO 435VP SEM، انجام شد [۱۲].

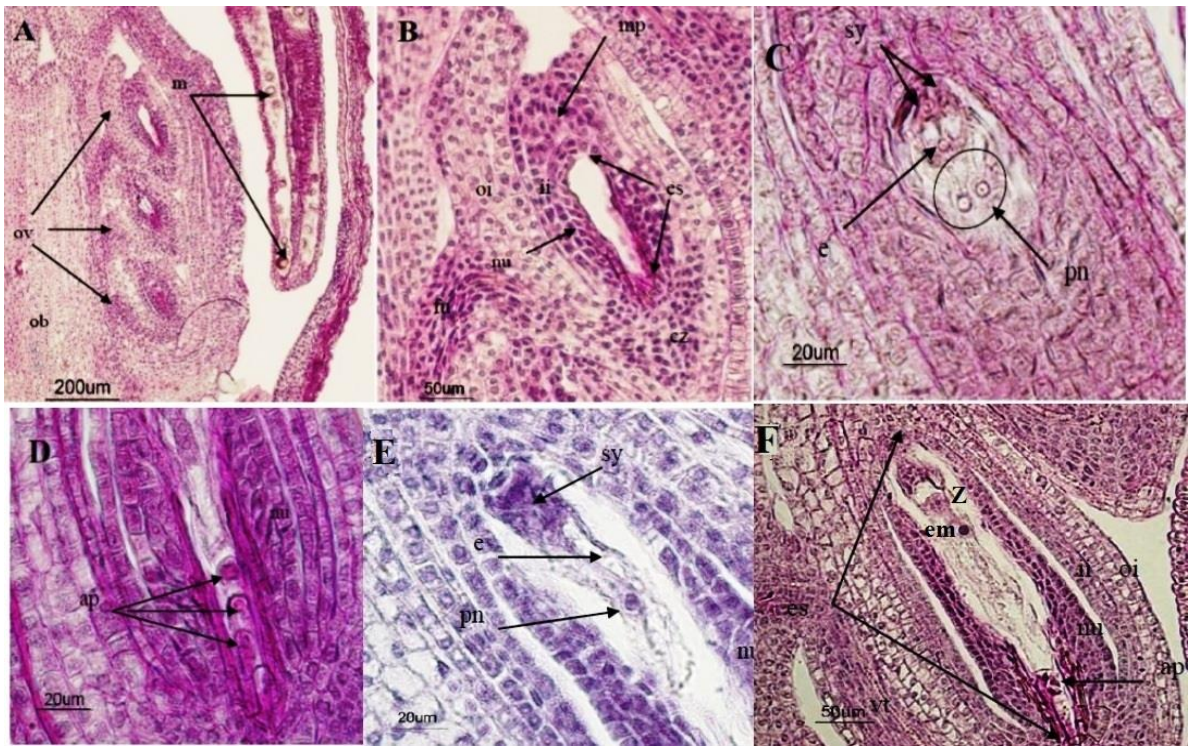
شناسایی پلی ساکاریدها به روش Periodic Acid Schiff (PAS) صورت گرفت [۱۲]. جهت شناسایی لیپیدها با روش Gahan (1984)، لامها پس از طی مراحل پارافین زدایی و آبدهی، با سودان سیاه B رنگ آمیزی شدند. شناسایی پروتئین‌ها با روش کوماسی برلیانت بلو Gahan (1984) انجام شد.

## نتایج

### بررسی تخمک و کیسه رویانی

مطالعه ساختاری بوسیله میکروسکوپ نوری نشان داد که تخمدان گیاه خارخسک پنج برچه‌ای با دو تا چهار تخمک در داخل هر برچه می‌باشد (شکل ۱-A). تخمک‌ها از نوع واژگون، دو پوششی و دارای تمکن محوری هستند. پوشش داخلی از دو لایه سلول تشکیل شده است که در منطقه میکروپیلی تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد و میکروپیل توسط این سلول‌ها احاطه می‌شود (شکل ۱-B). با توجه به شکل ۱-B از ویژگی‌های تخمک خارخسک، عدم وجود فاصله بین بافت نوسل با پوشش داخلی و بین دو پوشش تخمک، می‌باشد. همچنین عدم مشارکت پوشش خارجی در تشکیل میکروپیل در شکل مشخص است (شکل ۱-B).

سازمان‌یابی کیسه جنینی نشان داد که سلول تخمزا و سینرژیدها در قطب میکروپیلی و متقاطرها در قطب شالازی قرار گرفته‌اند (شکل ۱-C، D). برش‌های تهیه شده از مادگی نشان داد که ادغام هسته‌های قطبی با هم و بقایای یکی از سینرژیدها در مرحله بعدی مشاهده می‌شوند (شکل ۱-E). مرحله پس از لقاح را نشان می‌دهد که در آن سلول تخم ایجاد شده است. علاوه براین سلول مادر آندوسپرم (سلول تخم ضمیمه) نیز قابل تشخیص است (شکل ۱-F).

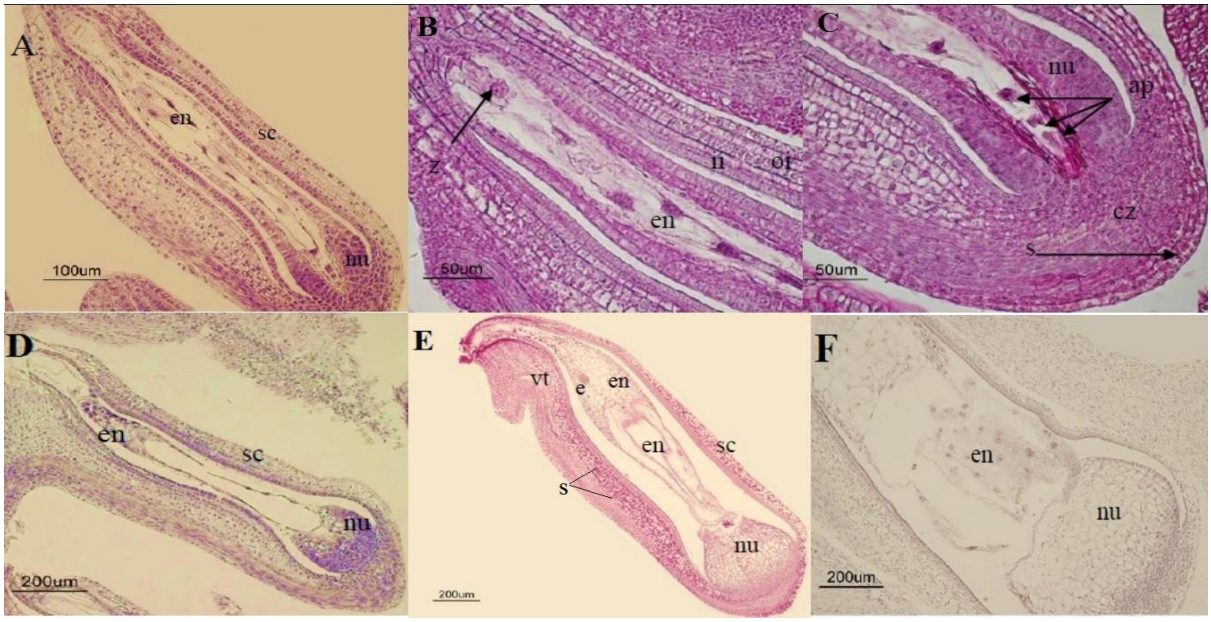



**شکل ۱:** بررسی تخمک و کیسه رویانی خارخسک رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلن. A: ساختمان تخمدان و نحوه قرارگیری تخمک‌ها در هر برچه را نشان می‌دهد. B: ساختار تخمک واژگون. C,D: ساختار کیسه جنینی که شامل سلول تخمزا، متقاطرها و سینرژیدها می باشند. دایره هسته‌های قطبی را نشان می‌دهد. E: سلول تخمزا، ادغام هسته‌های قطبی و بقایای یکی از سینرژیدها را نشان می‌دهد. F: تشکیل سلول تخم و سلول مادر آندوسپرم. ap: متقاطرها، cz: منطقه شالازی، e: سلول تخمزا، em : سلول مادر اندوسپرم، es: کیسه جنینی، fu: بند، ii: پوسته داخلی، m: میکروسپور، mp: میکروپیل، nu: خورش، ob:پایه تخمدان، oi: پوسته بیرونی، ov: تخمک، pn: هسته های قطبی، sy: سینرژید، Z: سلول تخم.

**تکوین آندوسپرم**

تقسیمات میتوزی در آندوسپرم قبل از تقسیم سلول تخم شروع شده است (شکل ۲-A). وجود هسته‌های آزاد نشان می‌دهد که سلول مادر آندوسپرم تقسیمات میتوزی بدون تشکیل دیواره جداکننده را انجام داده اس (شکل۲-B). همچنین سلول تخم در این مرحله نسبت به قبل (شکل ۱-F)، کشیده‌تر به نظر می‌رسد (شکل ۲-B). ویژگی قابل مشاهده دیگر در این مرحله، آغاز تجمع دانه‌های نشاسته در شالاز و در پوسته بیرونی می‌باشد که تا پایان جنین‌زائی تجمع دانه‌های نشاسته در این سلول‌ها مشاهده می‌شود (شکل ۲-C). برش‌ها نشان داد که پوسته درونی فاقد دانه‌های نشاسته است (شکل ۲-C). در این مرحله سلول‌های نوسل در قسمت شالازی مشخص است که افزایش حجم چندانی در آنها دیده نمی‌شود و همچنین سلول‌های متقاطر همچنان حضور دارند (شکل ۲-C). بتدریج دیواره سلولی در اطراف هسته‌های آزاد آندوسپرم از قطب میکروپیلی به طرف قطب شالازی تشکیل می‌شود و تشکیل دیواره در این سمت توسعه می‌یابد، از طرفی سلول‌های نوسل نیز قابل روئیت هستند (شکل ۲-D).

بتدریج با رشد مریکارپ‌ها و شکل‌گیری پیش‌رویان، تشکیل دیواره هسته‌های آزاد آندوسپرم بویژه در اطراف رویان گسترش می‌یابد (شکل ۲-D). سلول‌های واکوئلیزه نوسل در اطراف کیسه جنینی محتویات خود را از دست می‌دهند، همچنین سلول‌های آندوسپرم در قطب میکروپیلی دارای سیتوپلاسم متراکم می‌باشند اما سلول‌ها در قطب شالازی از تراکم سیتوپلاسمشان کاسته می‌شود (شکل ۲-D). توسعه آندوسپرم بسیار سریع اتفاق افتاده است ولی هنوز آندوسپرم کاملا تکمیل نشده است و در بخش شالازی در حال شکل‌گیری است (شکل ۲-E). همچنین تجمع دانه‌های نشاسته در پوسته دانه کاملا مشهود است (شکل ۲-E). سلول‌های آندوسپرم در اطراف جنین درشت و فشرده هستند در حالیکه به سمت پیرامون کیسه جنینی فشردگی کمتر دارند (شکل ۲-F). مطالعه بافت آندوسپرم در دانه بالغ نشان می‌دهد، تمام سلول‌های آندوسپرم در این مرحله محتویات خود را از دست داده‌اند و فقط دیواره‌های نازک سلول‌های آندوسپرمی مشاهده می‌شود (شکل ۳-J). آندوسپرم در این مرحله به صورت ساختار تور مانند و بسیار ظریف، که در قطب شالازی توسعه بیشتری دارد و به صورت رشته باریکی در دو طرف لپه‌ها و فاصله میان لپه‌ها کشیده شده‌اند (شکل ۳-J).




**شکل ۲:** نمو آندوسپرم در خارخسک. A: تقسیمات میتوزی در آندوسپرم قبل از تقسیم سلول تخم را نشان می‌دهد. B: هسته‌های آزاد آندوسپرم. C: آغاز تجمع دانه‌های نشاسته. D: گسترش تشکیل دیواره در اطراف هسته‌های آزاد آندوسپرم در قطب میکروپیلی و همچنین توسعه نوسل مشخص است. E: ادامه گسترش تشکیل دیواره هسته‌های آندوسپرم در قطب میکروپیلی در مرحله پیش‌رویان را نشان می‌دهد. F: گسترش آندوسپرم در قطب شالازی. ap: متقاطر، en: آندوسپرم هسته‌ای، nu: نوسل، sc: پوسته دانه، vt: دستجات آوندی.

**جنین‌زایی**

در مراحل اولیه تکوین آندوسپرم (تولید هسته‌های آزاد)، هسته سلول تخم نیز وارد مرحله میتوز شده است (شکل ۳-A) و سلول‌های نوسل در قسمت پیرامونی کیسه جنینی در حال گسترش می‌باشند. نهایتاً اولین تقسیم سلول تخم با دیواره‌بندی افقی اتفاق می‌افتد و سلول راسی کوچک و سلول قاعده‌ای بزرگ تولید می‌شوند (شکل ۳-A). از لحاظ سیتولوژیکی سلول راسی به شدت متراکم و سلول قاعده‌ای دارای واکوئلی درشت مرکزی می‌باشد (شکل ۳-A). بتدریج دیواره سلولی در اطراف هسته های آزاد آندوسپرم از قطب میکروپیلی به طرف قطب شالازی تشکیل می‌شود (شکل ۳-B). تقسیمات در سلول قاعده‌ای زودتر از سلول راسی اتفاق می‌افتد و سلول‌هایی را بوجود می‌آورد که سوسپانسور را تشکیل می‌دهند (شکل ۳-C). با توجه به شکل، سلول قاعده‌ای سوسپانسور به شدت واکوئلیزه و درشت می‌باشد (شکل ۳-C).

در مرحله بعد اولین تقسیم در سلول راسی با دیواره‌بندی طولی اتفاق می‌افتد و سلول راسی به دو سلول تقسیم می‌شود (شکل ۳-D). همچنین سوسپانسور دارای پنج سلول می‌باشد و توسعه آندوسپرم سلولی در اطراف جنین به وضوح مشاهده می‌شود (شکل ۳-D). علاوه بر گسترش آندوسپرم، با ادامه تقسیمات سلول راسی پیش‌رویان در حال شکل‌گیری است و همچنان در این مرحله سوسپانسور حضور دارد (شکل ۳-E). شکل ۳- F، گسترش تجمع دانه‌های نشاسته را در پوسته دانه را در مرحله اولیه رویان‌زایی را نشان می‌دهد.

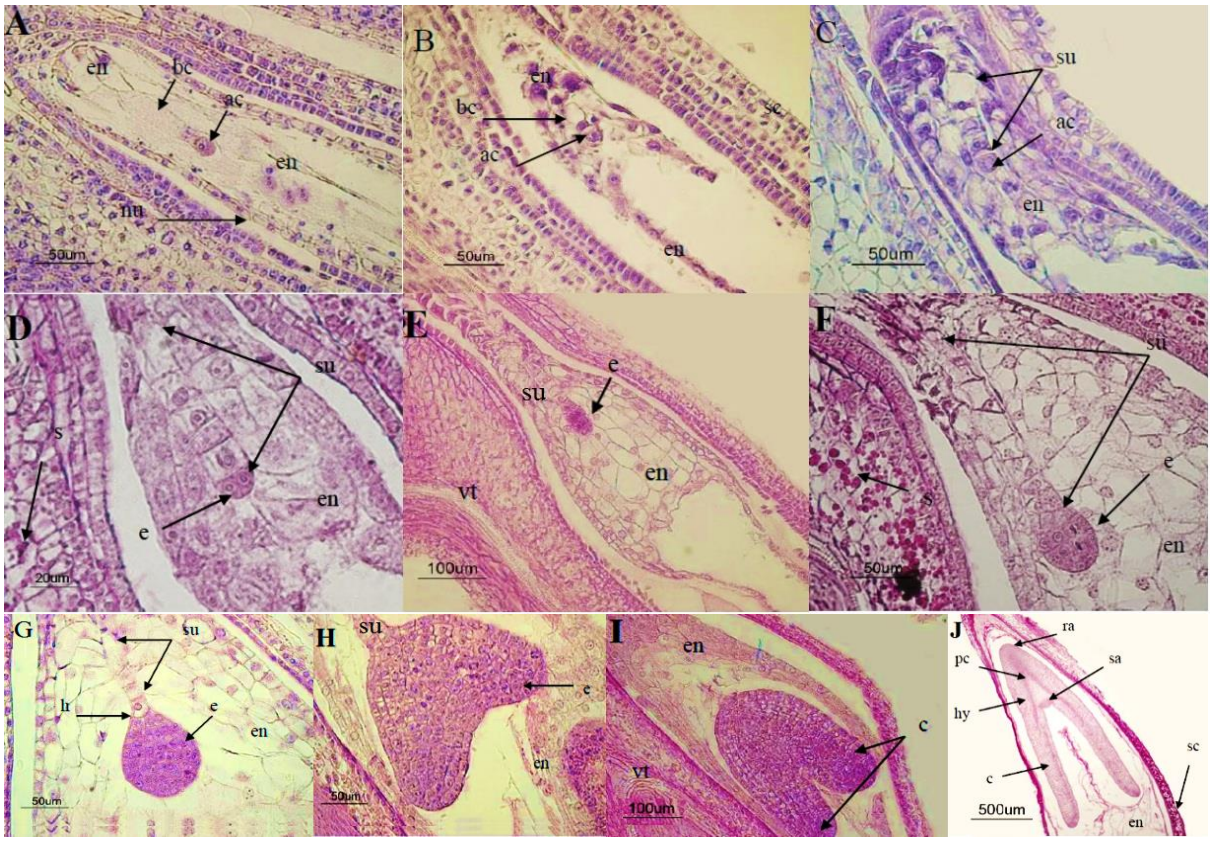
تقسیمات در پیش‌رویان با سرعت زیاد انجام می‌گیرد و نتیجه این تقسیمات افزایش تعداد سلول‌ها و شکل‌گیری جنین کروی می‌باشد (شکل ۳- G). سلول سوسپانسوری که در مجاورت جنین است سلول هیپوفیز می باشد (شکل ۳- G). به سرعت به دنبال تقسیمات سریع در دو گوشه جنین، جنین قلبی شکل تشکیل می‌شود (شکل ۳- H). دو برجستگی که در جنین قلبی شکل ظاهر می‌شود، بعدها محل تشکیل پریموردیوم لپه‌ها است. در این مرحله سوسپانسور به تدریج تحلیل می‌رود (شکل ۳-H). در مرحله بعدی ادامه تقسیمات در جنین قلبی شکل باعث افزایش طول جنین، بزرگ‌تر شدن برجستگی‌ها و تشکیل لپه‌ها می‌شود و جنین اژدری شکل تشکیل می‌گردد (شکل ۳- I). لازم به ذکر است در این مرحله سلول‌های سوسپانسور تا حدود زیادی تحلیل رفته‌اند و ارتباط جنین با بافت مادری از طریق سوسپانسور قطع می‌شود (شکل ۳- I). رنگ‌پذیری بالای لپه‌ها با رنگ‌آمیزی PAS که وجود ترکیبات نشاسته را تائید می‌کند. نتایج نشان داد رشد اندام‌های جنینی و بافت‌های تمایز یافته به سرعت در دانه اتفاق می‌افتد و مریستم انتهایی ریشه و ساقه سازمان می‌یابد (شکل ۳-J). سلول‌های آندوسپرم نیز محتویات خود را از دست می‌دهند ولی هنوز برخی سلول‌ها، در قسمت پیرامونی کیسه جنینی حضور دارند (شکل ۳- J). از طرفی حضور دانه‌های نشاسته نیز همچنان مشهود استو سوسپانسور به طور کامل تحلیل رفته است.

جنین بالغ خارخسک دارای هیپوکوتیل، مریستم راسی ساقه و مریستم راسی ریشه می‌باشد. مریستم انتهایی ریشه در قطب میکروپیلی جنین قرار گرفته و مریستم انتهایی ساقه در سمت مقابل مریستم ریشه واقع شده است. مجموعه سلول‌های پروکامبیومی در برش طولی به صورت استوانه‌ای، در بخش محوری هیپوکوتیل در هر کدام از لپه‌ها دیده می‌شوند که تا نزدیک راس لپه کشیده شده‌اند.

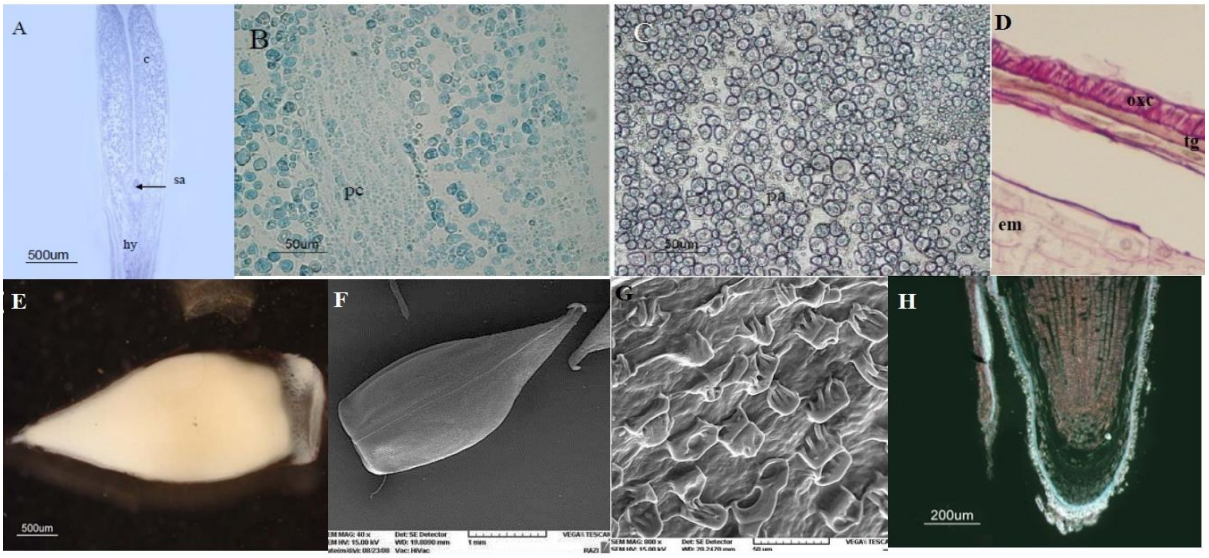
**بررسی دانه بالغ**

اندازه جنین بالغ در خارخسک در حدود ۳/۵ میلی‌متر می‌باشد (شکل ۴- A). مطالعه دانه شفاف شده نشان داد که در خارخسک جنین تقریبا تمام حجم دانه را اشغال می‌کند (شکل ۴- E). با رشد لپه‌ها تجمع مواد ذخیره‌ای از نوع نشاسته در جنین آغاز می‌شود که این مواد در جنین بالغ توسط اجسام پروتئینی جایگزین می‌گردند و جنین بالغ دارای اجسام پروتئینی بسیار درشت و مواد ذخیره‌ای لیپیدی می‌باشد (شکل ۴- A). با توجه به تفاوت شدت رنگ در اندام های متفاوت جنین مشخص می‌شود که لپه‌ها بیشترین انباشتگی پروتئین را دارند. در حالیکه در محدوده سلول‌های پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر و اندازه کوچکتر دیده می‌شوند (شکل ۴- B). در بافت جنینی ذخایر لیپیدی پس از رنگ آمیزی با سودان سیاه قابل تشخیص است (شکل ۴-C).

مطالعه پوسته دانه‌ها نشان داد که دانه این گیاه پوسته‌ای نرم و نازک دارد. پوسته در این گیاه از دو لایه سلول تشکیل شده است




**شکل ۳:** تقسیم سلول تخم و تشکیل رویان در گیاه خارخسک (رنگ‌آمیزی با PAS). A: اولین تقسیم سلول تخم و شکل‌گیری سلول راسی و قاعده‌ای. B: تشکیل دیواره در اطراف هسته‌های آزاد آندوسپرم بویژه در اطراف جنین. C: تقسیمات سلول قاعده‌ای و تشکیل سوسپانسور. D: تقسیم سلول راسی و گسترش آندوسپرم اطراف جنین. E: شکل‌گیری پیش رویان. F: گسترش تجمع دانه‌های نشاسته در پوسته دانه. G: مرحله رویان کروی. H: مرحله رویان قلبی، سوسپانسور تا حدودی تحلیل رفته است. I: مرحله رویان اژدری‌شکل، رنگ‌پذیری بالای لپه‌ها با رنگ‌آمیزی PAS که وجود ترکیبات نشاسته را تائید می‌کند. J: مرحله رویان لپه‌ای که آندوسپرم تحلیل رفته و به شکل تورمانند درآمده است. ac: سلول راسی، bc: سلول قاعده‌ای، c: لپه، en: آندوسپرم، h: هیپوفیز، hy: هیپوکوتیل، nu: نوسل، pc: پروکامبیوم، ra: مریستم ریشه، s: دانه‌های نشاسته، sa: مریستم ساقه، sc: پوسته دانه، vt: دستجات آوندی.




**شکل ۴:** بررسی دانه بالغ و پوسته. A–B: تجمع اجسام پروتئینی در جنین بالغ را نشان می دهند. C: ذخایر لیپیدی رویان از رنگ آمیزی با سودان سیاه. E: دانه روشن سازی شده خارخسک. F: فرا ساختار دانه خارخسک. G: تزئینات موم در سطح دانه. H: مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت و حضور ترکیبات فلوروسنت مومی. c: لپه، em: جنین، hy: هیپوکوتیل، oxc : سلول‌های واجد اگزالات کلسیم tg: لایه داخلی، pa: پارانشیم، pc: پروکامبیوم، sa: مریستم ساقه.

که شامل یک لایه بیرونی متشکل از یک ردیف سلولهای نسبتا کوچک اپیدرمی واجد بلورهای اگزالات کلسیم با اندازه بسیار کوچک مشاهده می‌شود (شکل ۴-D). لایه داخلی که از تغییر و تحول پوسته داخلی تخمک حاصل می‌شود متشکل از سلول‌های کوچک به شدت فشرده به هم می‌باشد. مطالعه سطحی دانه در این گیاه سطح صاف و بدون لعاب را نشان داد (شکل ۴-F). در دانه تجمعی از موم‌ها دیده می‌شود که در نمای نزدیکتر اشکال متنوعی را از خود نشان می‌دهند (شکل ۴-G). ماهیت لیپیدی این تزئینات در مشاهدات انجام گرفته با میکروسکوپ فلوروسنت به اثبات رسیده است (شکل ۴-H).

## بحث

فرایندهای منجر به تشکیل و نمو گونه گیاهی از مسائل مهم زیستی است و گسترش این علم بدون اطلاع از مراحل اولیه تکوینی گیاه ممکن نیست [۱۴]. در این پژوهش به مطالعه مراحل تکوین جنین و دانه خارخسک پرداخته شده است. نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که در گیاه خارخسک تخمک‌ها از نوع واژگون، دو پوششی و دارای تمکن محوری هستند. 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.

آندوسپرم هسته‌ای رایج‌ترین نوع آندوسپرم می‌باشد که در بیشتر تیره‌های گیاهی از جمله غلات و آرابیدوپسیس دیده می‌شود [۱۵]. آندوسپرم ممکن است ذخیره‌ای باشد یا فاقد هر گونه ماده ذخیره‌ای باشد [۷]. مطالعات خانواده اسپندیان نشان داد که در گونه‌های اسپند رومی معمولا آندوسپرم سریع‌تر شروع به رشد می‌کند و قبل از تقسیم سلول تخم تکثیر می‌یابد اما در گیاه قیچ تقریبا همزمان با تقسیم تخم، آندوسپرم نیز تقسیماتش را آغاز می‌کند [۱۶]. با تقسیم سلول تخم بتدریج دیواره سلولی در اطراف هسته‌های آزاد آندوسپرم در قطب میکروپیلی تشکیل می‌شود و به طرف قطب شالازی توسعه می‌یابد [۱۱]. بتدریج با رشد لپه‌ها سلول‌های آندوسپرم بشدت کشیده شده و واکوئلیزه می‌شوند و محتویات خود را از دست می‌دهند [۱۷].

جنین‌زایی نقش کلیدی در چرخه زندگی گیاهان گلدار ایفا می‌کند. این فرایند در گیاهان عالی به سه مرحله ریخت‌زایی، بلوغ جنین و مرحله خواب تقسیم می‌شود [۱۸]. نتایج نشان داد که در مراحل اولیه نمو جنین گیاه خارخسک، سلول تخم به دوره استراحت وارد شد. همچنین کشیدگی سلول تخم نیز در گیاه خارخسک طی دوره استراحت قابل مشاهده است. در بسیاری از گونه‌های تیره اسپند سلول تخم بلافاصله بعد از لقاح تقسیم نمی‌شود و بر حسب گونه، دوره استراحت طولانی مدت یا کوتاه مدت دارد [۱۹]. مدت زمان این دوره در گیاهان مختلف متفاوت است که در طی این دوره تغییرات درون سلولی مهمی در سلول تخم از جمله پدیده قطبیت اتفاق می‌افتد. علاوه بر این، سلول تخم در طی این دوره ممکن است در اندازه ثابتی باقی بماند، کاهش حجم بیابد یا رشد کند و به صورت کشیده قابل رونیت گردد [۲۰]. پس از طی دوره استراحت اولین تقسیم سلول تخم اتفاق می‌افتد و سلول تخم با دیواره‌بندی افقی به دو سلول راسی و قاعده‌ای تقسیم می‌شود [۲۰].

با توجه به پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد که در گیاه خارخسک تقسیمات سلولی در سلول قاعده‌ای سریع‌تر از سلول راسی اتفاق می‌افتد و سوسپانسور سه سلولی تولید می‌شود در حالیکه سلول راسی هنوز تقسیم نشده است. اولین تقسیم سلول راسی زمانی اتفاق می‌افتد که سوسپانسور دارای پنج عدد سلول است. همچنین مطالعه بافت شناسی سوسپانسور در خارخسک نشان داد این ساختار در مرحله جنین اژدری شکل از بین می‌رود و در هنگام رشد لپه‌ها جنین فاقد سوسپانسور است. نتایج فوق با نتایج Zhang و همکاران (۲۰۱۳) در خانواده اسپندیان هم‌خوانی دارد.

ارتباط جنین و بافت مادری در مراحل اول جنین‌زائی از طریق بافت سوسپانسور صورت می‌گیرد. در بیشتر گونه‌های خانواده اسپندیان (اسپند، اسپند رومی، قیچ) سوسپانسور در اواسط مرحله جنین قلبی شکل در نتیجه‌ی مرگ سلولی برنامه ریزی شده (که از پایه‌ی سوسپانسور شروع می‌شود) از بین می رود [۱۹]؛ در حالیکه پژوهش حاضر مشخص کرد که در گونه خارخسک سوسپانسور در مرحله اژدری ازبین رفت. البته در برخی گیاهان سوسپانسور تا زمان پراکندگی دانه نیز حفظ می‌شود[۲۱].

مواد ذخیره‌ای موجود در جنین در گونه‌های مختلف گیاهی خانواده اسپندیان تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. بر اساس نوع اندوخته‌های لپه‌ای، جنین‌ها به سه دسته، جنین‌های روغنی،

جنین‌های پروتئینی و جنین‌های دارای نشاسته تقسیم می‌شوند [۲۲]. بررسی‌های سیتوشیمیایی جنین در خارخسک نشان داد که پس از مرحله جنین اژدری شکل تجمع دانه‌های نشاسته در لپه‌های در حال رشد آغاز می‌شود ولی این مواد در جنین بالغ توسط مواد پروتئینی جایگزین می‌شوند. احتمالا دانه‌های نشاسته در طول رشد لپه‌ها توسط آنها مصرف می‌شوند. نتایج فوق با نتایج Bellstedt و همکاران (۲۰۰۸) در خانواده Zygophyllaceae هم‌خوانی دارد. در حالیکه در گونه قیچ از این خانواده، مواد کربوهیدراتی بیشترین میزان در رویان بالغ به خود اختصاص داد. هرچند که مواد پروتئینی هم در رویان بالغ گزارش شده است [۱۲].

معمولا اجسام پروتئینی از متداولترین مواد ذخیره‌ای دانه‌ها محسوب می‌شود که در جنین و آندوسپرم بسیاری از تیره‌های گیاهی مشاهده می‌شود [۲۴]. از نظر ساختاری اجسام پروتئینی از ماتریکس پروتئینی و بخش دیگری به نام گلوبوئید و یا کریستالوئید تشکیل شده اند که منبع ذخیره کننده نیتروژن برای گیاه محسوب می‌شود و قسمت گلوبوئیدی، منبع ذخیره کننده عناصر یه شمار می‌رود [۲۴]. این اجسام به وسیله یک غشا فسفولیپیدی احاطه شده‌اند و در برخی از گیاهان توسط دانه‌های لیپیدی احاطه می‌شوند [۲۵]. در خانواده Zygophyllaceae معمولا لپه‌ها بیشترین انباشتگی پروتئین را دارند. سلول‌های پارانشیمی دارای اجسام پروتئینی بزرگتر و با تراکم بیشتر می‌باشند. در حالیکه در سلول‌های پروتودرمی و پروکامبیومی اجسام پروتئینی با تعداد کمتر و اندازه کوچکتر دیده می‌شوند [۹].

در گونه‌های مختلف سطح دانه ممکن است دارای ویژگی‌ها و خصوصیاتی باشد که در رده‌بندی آنها موثر باشد [۲۶]. طی تغییر شکل لایه‌های سلولی پوشش تخمک به بافت‌های مکانیکی، دیواره‌های سلولی توسط موادی با ماهیت‌های متفاوت پوشانده می‌شوند. در برخی گونه‌های خانواده اسپندیان (گیاه قیچ و اسپند)، لیگنین ترکیب اصلی پوسته دانه است اما ترکیبات دیگری از جمله ترکیبات فنلی و تانن‌ها و سوبرین نیز در این تیره گزارش شده است [۱۶]. در حالیکه در تحقیق حاضر جنس خارخسک، دانه صاف و پوسته نازک و غیرچوبی دارد. همچنین سلول‌های محتوی کریستال در برخی دانه‌ها وجود دارد. اگزالات کلسیم در نهاندانگان به طور معمول در اندام‌های مختلف نظیر ریشه، برگ، ساقه، گل و دانه دیده می‌شود [۲۷]. عملکرد احتمالی بلورهای اگزالات کلسیم عبارتند از: حفاظت گیاه در برابر حشرات و حیوانات گیاهخوار، استحکام بخشی به بافتها، ذخیره کلسیم، اتصال اگزالات به کلسیم و جلوگیری از سمیت اگزالات در گیاهان، جمع آوری و بازتابش نور و نقش در تنش شوری [۲۸]. بلورهای اگزالات کلسیم در گونه خارخسک نیز به تعداد کمتر و در اندازه‌های کوچکتر نسبت به گونه قیچ و اسپند رومی از تیره اسپند قابل مشاهده است که می‌تواند در ارتباط با فاصله کم تاکسونومیکی این جنس‌ها با یکدیگر باشد [۱۲].

ممکن است در سطح بافت اپیدرم و همچنین در بخش‌های دیگر پوسته دانه لایه کوتیکول تشکیل شود [۲۶]. تزئینات‌سطحی پوسته دانه در سه سطح نخستین، دومین و سومین مورد بررسی قرار می‌گیرد. تزئینات سطحی اولیه مربوط به شکل سلول‌های اپیدرمی پوسته دانه می‌باشد. انواع مختلف مواد کوتیکولی سلول‌های اپیدرمی تشکیل تزئینات سطحی دومین را می‌دهند تزئینات سطحی موجود در دانه [۶]. شکل ساختاری موم بر روی کوتیکول و ویژگی‌های اختصاصی رسوب آن، تزئینات سطحی سومین را تشکیل می‌دهند [۲۹]. حداقل سه کوتیکول با جایگاه‌های متفاوت در پوسته دانه‌ها شناسایی شده است: سطح اپیدرم خارجی، مابین دو پوسته داخلی و خارجی و ما بین پوسته داخلی و بقایای نوسل یا آندوسپرم [۲۹]. در پژوهش حاضر مشخص شد که در دانه خارخسک تجمعی از موم‌ها دیده می‌شود که در نمای نزدیکتر اشکال متنوعی را از خود نشان دادند.

## نتیجه‌گیری

بر اساس بررسی‌های بافت‌شناختی خارخسک، بافت آندوسپرم در مراحل اولیه تکوینی از نوع هسته‌ای بود که در مراحل بعدی به نوع سلولی تغییر یافت. همچنین نتایج نشان داد که تقسیم سلول تخم پس از مرحله آندوسپرم هسته‌ای رخ داد و سلول تخم کشیده‌تر از مراحل اولیه مشاهده شد. بررسی دانه بالغ شفاف شده مشخص کرد که حجم زیادی از دانه توسط جنین اشغال شده است. با توجه به مطالعات سیتوشیمیایی در جنین بالغ، ماده ذخیره‌ای سلول‌ها حاوی اجسام پروتئینی و ترکیبات لیپیدی بودند که جایگزین ترکیبات نشاسته‌ای شدند. همچنین نتایج نشان داد

که پوسته صاف دانه خارخسک واجد بلورهای اگزالات کلسیم می‌باشد و سطح دانه از مواد لیپیدی (موم) پوشیده شده است. تفاوت‌های مورفولوژیکی قابل توجه بین جنس‌های تیره اسپند، سبب ایجاد تردید برای قرار دادن تمام این جنس‌ها در یک تیره شده است. اگرچه بررسی انجام گرفته در این تحقیق به تنهایی نمی‌تواند برای تعیین جایگاه تاکسونومیکی جنس خارخسک مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین همراه شدن این تحقیق با بررسی‌های گسترده تر صفات مورفولوژیکی و آناتومیکی، برای تعیین محدوده تاکسونومیکی و سایر مطالعات فیلوژنتیکی مربوط به این جنس در خانواده اسپندیان پیشنهاد می‌گردد.

## منابع


[1] Ma Y, Guo Z, Wang X. *Tribulus terrestris* extracts alleviate muscle damage and promote anaerobic performance of trained male boxers and its mechanisms: Roles of androgen, IGF-1, and IGF binding protein-3. J Sport Health Sci, 2017; 6(4):474-481.

[2] Aslani MR, Movassaghi AR, Ebrahim-pour V, Mohebi A.N. Experimental *tribulus terrestris* poisoning in goats. Small Ruminant Res, 2004; 5(4):261-267.

[3] Kianbakht S, Jahanian F. Evaluation of Antibacterial Activiy of *Tribulus terrestris* L. Growing in Iran. IJPT, 2003; 2(4): 22-24.

[4] Stefanescu R, Tero-Vescan A, Negroiu A, Aurică E, Vari CE. A Comprehensive Review of the Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Properties of *Tribulus terrestris* L. Biomolecules, 2020; 10(5):752.

[5] Higashiama T. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. Plant Res, 2002; 115(4):149-160.

[6] Galek R. Kozak B. Biela A. Zalewskid D. Sawickasienkiewize E. Spychala K. Stawinski S. Seed Coat Thickness Differentiation and Geneticpolymorphism for *Lupinus mutabilis* Sweet breeding. Turkish J F Crop, 2016; 21(4):305-312.

[7] Figueiredo DD. Batista RA. Roszak P.J. Kohler C. Auxin production couples endosperm development to fertilization. Nat Plant, 2015; (4):15184.

[8] Olsen O.A. Nuclear Endosperm Development in Cereals and Arabidopsis Thaliana. Plant Cell, 2001; 16 (2): 214-227.

[9] Ghazanfar Sh, Osborne J. Typification of Zygophyllum propinquum Decne. and Z. *coccineum*. (Zygophyllaceae) and a key to Tetraena in SW Asia. Kew bul, 2015; 70(2): 1-9.

[10] Laux T, Rschum TW, Breuninger H. Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. Plant Cell, 2004; 16(3): 190-202.

[11] Lersten N.R. Flowering plant embryology. Black pub, 2004; 7(3): 2-12.

[12] Kazemi E, Kazemian M, Majidzadeh F, Aliasgharpour M, Movafeghi A. Study of seed coat microsculpture organization during seed development in Zygophyllum fabago (Zygophyllaceae). Turkish J Bot, 2019; 43 (5): 634-644.

[13] Gahan PB. Plant histochemistry and cytochemistry. Harcourt brace J publ, 1984; 7(4):12-18.

[14] Umdale SD, Aitawade MM, Gaikwad NB, Madhavan L, Yadav SR, Rao SR, Bhat KV. Pollen Morphology of Asian Vigna Species (Genus Vigna; Subgenus Ceratotropis) from India and Its Taxonomic Implications. Turkish J Bot, 2017; 41(4): 75–81.

[15] Baroux C, Grossnikaus U. Evelutionary origins of the endosperm in flowering plants. Genome bio, 2002; 9: 326-332.

[16] Yankova-Tsvetkova E, Semerdjieva I, Baldjiev G, Yurukova-Grancharova P. On the Reproductive Biology of *Tribulus Terrestris* L. (Zygophyllaceae): Embryological Features; Pollen and Seed Viability, Biotech & Biotech Equip, 2011; 25(4): 2383-2387.

[17] Zhang F, Fu PCh, Gao CB, Chen ShL. Comparative study on plant seed morphological characteristics of *Zygophyl* Zygophyllaceae and two new families separated from it. Plant Dev and Res, 2013; 35, 280-284.

[18] Patil P, Malik SK, Sutar S, Yadav SR, John J, Bhat KV. Taxonomic Importance of Seed Macro- and Micro-Morphology in Abelmoschus (Malvaceae). Nordic J Bot, 2015; 33(4): 696–707.

[19] Kadry N, Abdel Khalik K. A numerical taxonomic study of the family Zygophyllaceae from Egypt. Acta Bot. Bras, 2012; 26 (1): 1-10.

[20] Liee YI, Yeung EC, Lee N. Chung M.C. Embryo Development in the Lady's Slipper Orchid, Paphiopedilum delenatii, with Emphasis on the Ultrastructure of the Suspensor. Annals Bot, 2006; 98: 1311-1319.

[21] Umehara M, Kamada H. Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. Plant Biotech. 2005; 22(4): 253–260.

[22] Prego I, Maldonad S, Otegui M. Seed structure and Location of Reserves in Chenopodium quinoa. Annals Bot, 1998; 82: 481-488.

[23] Bellstedt DU, Van-Zyl L, Marais E.M, Bytebier B, De-Villiers CA, Makwarela AM,

Dreyer LL. Phylogenetic relationships, character evolution and biogeography of southern African members of *Zygophyllum* (Zygophyllaceae) based on three plastid regions. Mol Phylogen and Evo, 2008; 47(4): 932-949.

[24] Creff A, Brocard L, Ingram G. A mechanically sensitive cell layer regulates the physical properties of the Arabidopsis seed coat. Nat Com, 2015; 6(4): 63-82.

[25] Dourado F. Vasco P. Gama F.M. Coimbra M.A. Motal M. 2000. Characterization of Rosa Mosqueta seed: cell wall polysaccharide composition and light microscopy observations. J Sci food and Agri, 2000; 80(4):1859-1865.

[26] Moise JA, Han S, Gudynate-Savitch L, Johnson DA, Miki BLA. Seed Coats: Structure, Development, Composition and Biotechnology. In vitro Cell Dev Biol-Plant, 2005; 41(4): 620-644.

[27] Tsou CH, Mori SA. Seed Coat Anatomy and its Relatinship to Seed Dispersal Subfamily Lecythidoideae of the Lecythidaceae (The Brazil Nut Family). Bot bul Aca Sinica, 2002; 43: 37-56.

[28] Zona S. Raphides in Palm Embryos and their Systematic Distribution. Annals Bot, 2004; 93(4): 415-421.

[29] Briggs CL, Morris EC, Ashford AE. Investigations into Seed Dormancy in *Grevillea linearifolia*, G. buxifolia and G. sericea: Anatomy and Histochemistry of the Seed Coat. Annals Bot, 2005; 96(1): 965-980.

# Histological study of seed development in *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae)

**Mokhtari F.[1], Mohajel Kazemi E.[1], Kazemian M.[1*], Aliasgharpour M.[1], Movafeghi A.[1]**

[1] Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

* (Corresponding author): mina.kazemian69@gmail.com

DOI:10.30495/JDB.2022.1958006.1302 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.5.5

Received: May 2022 Accepted: Julay.2022

## Abstract

The study of embryonic and endosperm development in different plant species is important from a phylogenetic and systematic point of view. The aim of the present study was to investigate the histological evaluation of seed development in *Tribulus terrestris* L. by microscopic analysis. Samples were studied at different developmental stages after fixation by different histological techniques. The results showed that the ovules were anatropous, bilayer and axially placentation. Endosperm was observed in the early stages, which was a nuclear type that changed to a cell type during embryonic development. In the latest stages, remnants of the endosperm were observed as a net-like structure around the cotyledons. According to histological studies, divisions occurred faster in the basal cell than in the apical cell. The suspender was completely degenerated during the torpedo embryo stage. According to cyto-chemical studies, accumulation of starch grains in the seed coat was observed in the early stages of embryonic development. Moreover in the mature embryo, storage components contained protein bodies and lipid compounds. The seed coat consists of two layers, the outer layer of which contains calcium oxalate crystals. Fluorescent microscopic analysis showed that a cumulative lipid nature of waxes was observed in the grain. It seems that the study of features such as the pattern of organ formation in this plant can be effective in understanding the heterogeneity between species of the Zygophyllaceae family.

**Keywords:** Endosperm, Axial placentation, Apical cell, Phytochemical studies, Fluorescent microscope.