فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هفتم، شماره ۲، بهار ۱۳۹۴

بررسی مراحل تکوین کیسه رویانی در بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* L.)

زینب فلاحی[۱]، احمد مجد[۱،۲*]، سعید آیریان[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

E-mail: ahmad_majd2005@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۳

چکیده

بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* L) یکی از گونه‌های مهم خانواده روزاسه (Rosaceae) است که از خواص دارویی و آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای برخوردار است. جنس *Amygdalus* از نظر صفات ریخت شناختی از تنوع زیادی برخوردار است؛ به گونه‌ای که با اتکا به این صفات، در موارد بسیاری، قادر به شناسایی گونه‌ها نخواهیم بود. با توجه به اهمیت شناخت مراحل تکوینی گیاهان در گسترش دانش زیست‌شناسی، در این پژوهش، بادام کوهی که از ارزش غذایی، دارویی و اقتصادی بالایی برخوردار است، به عنوان نمونه مورد آزمایش انتخاب شد. مراحل مختلف تکوینی در اندام زایشی به منظور روشن کردن مراحل جنین زایی در این گونه و با استفاده از روش‌های سلول – بافت شناختی (سیتولوژیکی) مورد بررسی قرار گرفت. پس از قرار گرفتن نمونه‌ها درفیکساتور مناسب، از آن‌ها برش‌های میکروتومی تهیه شد و پس از آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین، نمونه‌های مورد نظر بر روی لام شیشه‌ای سوار شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. برش‌های تهیه شده از گل‌ها در مراحل تکوینی مختلف نشان می‌دهد که گل‌های بادام از نوع گل‌های کامل و مادگی گل‌ها پری ژنی (پیرامونی) است. جام گل پیوسته بوده که از ۵ کاسبرگ، ۵ گلبرگ و ۱۰ الی ۴۰ پرچم و مادگی با تخمدان فوقانی تک خانه‌ای تک برچه‌ای تشکیل شده است که حاوی دوتخمک واژگون (anatrope) است. معمولا از دو تخمک، فقط یکی تلقیح می‌یابد. مراحل نموی کیسه رویانی و رویان‌زایی شامل رویان کروی، قلبی، آژدری و لپه‌ای شکل در بادام کوهی در برش‌های به دست آمده قابل مشاهده است. نتایج نشان می‌دهد که مراحل نموی کیسه رویانی و رویان زایی در بادام کوهی، الگویی مشابه با دولپه‌ای‌ها و دیگر گیاهان تیره Rosaceae را دارا هستند.

کلیدواژه‌ها: *Amygdalus scoparia. L*، بادام کوهی، رویانزایی

مقدمه

بادام یکی از جنس‌های خانواده Rosaceae است که طبقه‌بندی این جنس مانند بسیاری از جنس‌های دیگر در این خانواده، به دلیل درجه بالایی از تنوع مورفولوژیکی، همواره با مشکلات زیادی روبه‌رو بوده است [۲]. اخیرا گونه‌های بادام وحشی به عنوان یکی از ذخایر درختچه‌ای در ایران مورد توجه زیادی قرار گرفته است. ارزش اقتصادی بالا، مقاومت به خشکی، باد، گرما و خاک شور از مهم‌ترین ویژگی‌های زیست محیطی این‌گونه گیاهی است [۹]. به دلیل مقاومت

بالای آن به خشکی ترویج کشت آن در مناطق خشک و نیمه خشکی مثل ایران بسیار مهم است. تکثیر بادام عموما از طریق روش‌های جنسی صورت می‌گیرد که در نتیجه آن ژنوتیپ‌های متنوعی از این‌گونه در کشور ما به وجود آمده است. در واقع ایران را می‌توان به عنوان یک خزانه ژنی با ارزش در برنامه‌های به نژادی بادام در نظر گرفت [۳].

در بادام کوهی، معمولا گل انگیزی در سال قبل از شکوفایی گل‌ها در ماه‌های اردیبهشت و خرداد اتفاق می‌افتد. تشکیل اجزای گل به صورت جنینی در داخل جوانه گل در مرداد اتفاق می‌افتد و در اوایل پاییز، اجزای اولیه گل در داخل جوانه گل ظاهر می‌شوند. تشکیل دانه گرده در طول زمستان (دی و بهمن) اتفاق می‌افتد درحالی که بلوغ تخمدان قبل از گلدهی رخ می‌دهد. گل‌ها قبل از برگ‌ها در اواخر زمستان یا اوایل بهار ظاهر می‌شوند. جوانه‌های گل بادام به صورت منفرد، برون برگ و همیشه در وضعیت جانبی روی شاخه قرار می‌گیرند [۱]. برگ‌های بادام کوهی به صورت خطی-سرنیزه‌ای، خطی- قاشقی با لبه گنگره‌ای- دندانه‌ای، با قاعده ممتد، نوکی سیخک‌دار، سبز رنگ، بدون کرک مشاهده می‌شوند [۷]. جوانه‌های گل در بادام به صورت جانبی روی محور برگ در روی شاخه‌های بلند و سیخک‌های کوتاه به وجود می‌آیند. بادام جزو نخستین درختان خزان‌دار است که به دلیل نیاز سرمایی کم در زمستان و واکنش سریع به دمای گرم رشد در فصل بهار، زودتر از سایر درختان شکوفه می‌کند. بادام به طور طبیعی گیاهی خود ناسازگار است. از نظر باغبانی میوه بادام در گروه میوه‌های خشک طبقه‌بندی می‌شود که در آن بذر، محصولی تجاری محسوب می‌شود. مغز شامل یک جنین، آندوسپرم و بافت است [٤].

با بررسی منابع موجود مشخص شد که اطلاعات کافی و دقیقی در مورد ساختار تکوینی و تشریحی بادام کوهی وجود ندارد؛ از این رو، مطالعه حاضر به منظور روشن کردن ویژگی‌های سیتولوژیکی و جنین زایی در بادام کوهی به عنوان یکی از ذخایر ژنتیکی درختچه‌های ایران صورت گرفت. از آنجا که کسب اطلاعات بیشتر در زمینه زیست‌شناسی تولیدمثل در خانواده Rosaceae تنها زمانی میسر می‌شود که روابط تکاملی در این خانواده به طور کامل روشن شود؛ لزوم بررسی مراحل تکوینی نمو کیسه رویانی در بادام کوهی که تاکنون انجام نشده، روشن بوده و می‌توان این پژوهش را به عنوان یک تلاش موثر در این زمینه در نظر گرفت. همچنین بررسی ساختار تکوینی – تشریحی گونه‌های وحشی دیگری از این قبیل بسیار لازم و ضروری، به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی مورد آزمایش بادام‌کوهی (Amygdalus scoparia .L) از منطقه تنگ خوش در ٤٥ کیلومتری شهرستان مرودشت در ساعات اولیه صبح (۱۲-۹) که بیشتر تقسیمات سلولی به طور معمول در این ساعات صورت می‌گیرد، جمع‌آوری شدند. برداشت نمونه‌ها از شروع متورم شدن جوانه‌ها تا مرحله اتمام گل‌دهی، هر ۲ روز یک بار انجام شد. فصل گل‌دهی این گیاه از ماه بهمن تا اردیبهشت است. پس از حذف فلس‌های پوششی قهوه‌ای رنگ، جهت جلوگیری از هر گونه تغییر ساختاری در بخش زایشی (گل و میوه) از فیکساتور FAA به مدت ۷۲-٤۸ ساعت استفاده شد (برای تهیه‌ی این محلول از اتانول ۹٦ درصد، تثبیت کننده FAA فرمالین تجاری ۳۷ درصد خنثی شده با کلرید کلسیم و اسید استیک خالص (گلاسیال) با نسبت‌های

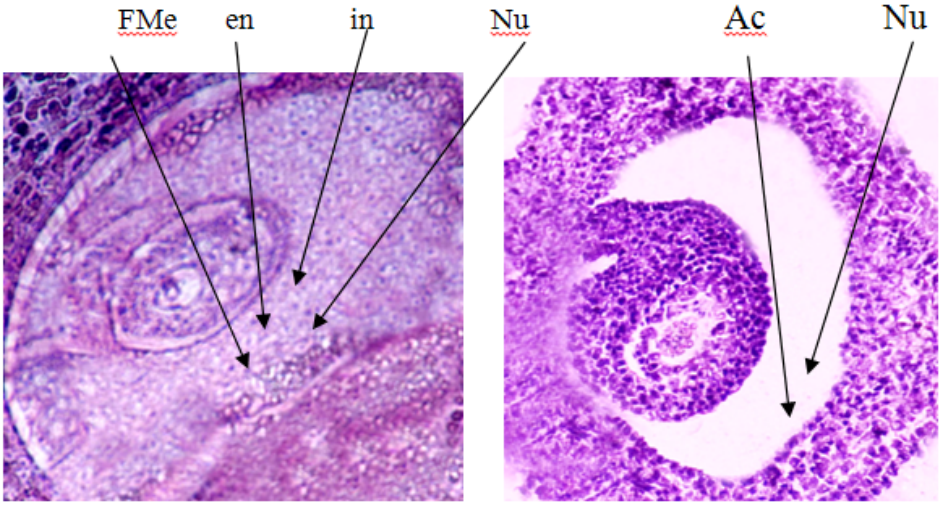
حجمی به ترتیب ۲، ۱۷، ۰/۵ تا ۸٪میلی لیتر استفاده شد.). برای بررسی مراحل تکوینی، روش برش‌های میکروتومی مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ابتدا جوانه‌های مورد نیاز را از الکل ۷۰ درصد خارج کرده و به مدت ٢٤ ساعت در مسیر آب جاری قرار داده تا کاملا شسته شود و الکل و مواد تثبیت‌کننده از بافت خارج شود. در مرحله بعد برای خارج کردن آب درون بافت‌ها، جوانه‌ها را از غلظت‌های مختلف الکل وتولوئن و الکل+تولوئن و تولوئن خالص و هر مرحله به مدت یک روز عبور داده و سپس برای خارج کردن تولوئن و نفوذ پارافین در داخل بافت‌ها، نمونه‌ها را به مدت یک روز در مخلوط تولوئن+پارافین و به مدت پنج روز در پارافین۱، ۲، ۳، ٤، و ٥ و در داخل انکوباتور با دمای ٦٠ قرار داده تا جایگزینی این دو بخوبی صورت گیرد و برش‌های کامل‌تری از آنها به دست آید. به طور کلی مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها شامل شستشو، آبگیری با درجات افزایشی الکل، شفاف‌سازی در نسبت‌های مختلف الکل/تولوئن، پارافین دهی، قالب‌گیری، آرایش بلوک‌های پارافینی و سوار کردن بلوک‌ها است. بعد از گذشت این مدت زمان، از نمونه‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شده و با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های عرضی به ضخامت ۱۲-۱۰ میکرون و برش‌های طولی با ضخامت ۱۰-۸ میکرون گرفته شد. برش‌ها را با استفاده از چسب سیتولوژیکی یا چسب‌هاپت روی لام‌های شیشه‌ای سوار کرده و در نهایت با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. پس از چسباندن لامل، برش‌ها مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند [۸].

نتایج و بحث

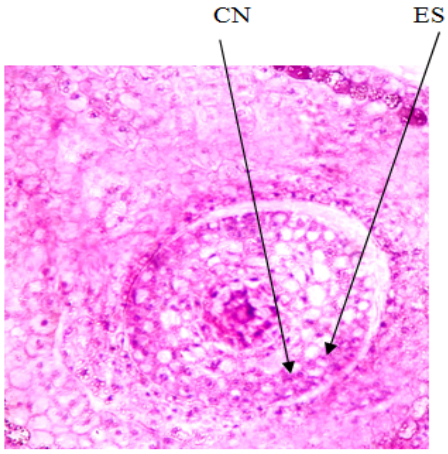
نموکیسه رویانی

در این پژوهش مراحل مختلف رویان‌زایی در بادام کوهی مورد بررسی قرار گرفت. توسعه تخمک در جوانه‌های این گونه گیاهی در پایان مرحله خفتگی تسریع شد. تخمک در بادام کوهی از نوع واژگون بود، به طوری که جسم تخمک روی پایه خود برگشته و میکروپیل در مجاور سفت قرار می‌گیرد. مشاهدات انجام شده در رابطه با جسم تخمک با مشاهدات صورت گرفته توسط Pimienta و Polito در سال‌های ۱۹۸۲ و ۱۹۸۳ و سایر Prunusها مانند آلبالو مطابقت داشت [١٤]. همان‌طور که می‌دانیم تخمک توسط بافت خورش احاطه می‌شود. در مراحل اولیه نمو، تمام یاخته‌های بافت خورش یکسان و یکدست بودند (شکل 1b). به زودی (زمانی که گل‌ها اندازه‌ای حدود ۱ میلی‌متر دارند.) یکی از این یاخته‌ها نسبت به سایر یاخته‌های اطراف خود بزرگ‌تر شده و پروتوپلاسم آن متراکم‌تر می‌شود که بدین ترتیب سلول آرکئوسپوری به وجود آمده که با تقسیمات پی‌درپی، سلول‌های مادرمگاسپور را تشکیل می‌دهد (شکل 1a). پس از دو تقسیم متوالی در مگاسپوروسیت، تترادهای خطی در مگاسپور بادام کوهی ایجاد شدند. درکیسه رویانی یا گامتوفیت ماده بالغ، سلول‌های تخم‌زا و سینرژیدی در قطب مجاور به سفت، هسته‌های قطبی در بخش میانی کیسه رویانی و سلول‌های پابنی در قطب شالازی کیسه رویانی مشاهده شدند (شکل۳). ایجاد هشت سلول در کیسه رویانی بالغ توسط محققان زیادی از قبیل Mikatadze و Pantsulaya در سال ۱۹۸۵ [۱۲] و همچنین Egea و Burgos در سال ١٩٩٤ نیز مشاهده شده است [٥] که با نتایج به دست آمده در این پژوهش هم‌خوانی دارد. الگوی نموی مشاهده شده در گامتوفیت ماده بالغ (شکل ۲) که از نوع پلی گونوم یا علف هفت بند است توسط محققان زیادی از

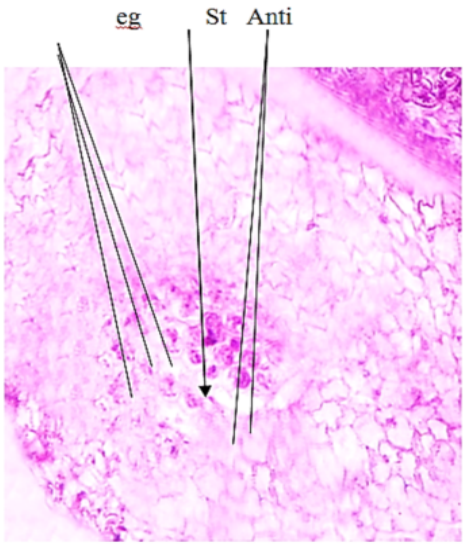
جمله Pimienta و Polito در سال ۱۹۸۳ [۱٤] Oukabli و همکاران در سال ۲۰۰۱ [۱۳] و Pantsulaya و Mikatadze در سال ۱۹۸۵ گزارش شده است [۱۲]. قبل از انجام لقاح، کیسه رویانی در بادام به صورت بیضی شکل دیده می‌شود که در مراحل بعدی پس از لقاح حالت کشیده پیدا می‌کند. در واقع قبل از لقاح، سلول‌های سینرژیدی کیسه رویانی تجزیه شده، کیسه رویانی نیز گسترش یافته، کشیده می‌شود و در نهایت آماده باروری می‌شود [۱۰]. همان‌طور که می‌دانیم یکی از آنتروزئیدها با دو هسته ثانویه (هسته قطبی) ترکیب می‌شود و تخم آلبومن را به وجود می‌آورد که با تحولاتش بافت آندوسپرم را می‌سازد. آنتروزئید دیگر نیز با سلول تخم‌زا ترکیب شده و تخم رویانی را به وجود می‌آورد که بند، هیپوفیز و رویان را تشکیل می‌دهد. با رشد و نمو رویان، آندوسپرم به عنوان بافت ذخیره‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد.



شکل ۱. a. تصویر یک تخمک در گیاه بادام کوهی که در آن یاخته‌های مادر مگاسپور (FMe) در مرحله پروفاز میوز دیده می‌شود. FMe: سلول مادر مگاسپور؛ es: کیسه رویانی؛ en: اندوتلیوم؛ in: پوسته تخمک. شکل ۱. b. مراحل اولیه تکوین کیسه جنینی در گیاه بادام کوهی. AC: سلول آرکئوسپوری چند سلولی؛ Nu: خورش (obj×40) .



شکل ۲. تصویرگامتوفیت ماده بالغ در گیاه بادام کوهی. ES: کیسه رویانی؛ C: منطقه مرکزی



شکل ۳. تصویرکیسه جنینی هشت هسته‌ای در گیاه بادام کوهی. سلول‌های پابنی: anti؛ مجموعه سلول تخم‌زا و سلول هم‌گراد: eg؛ سلول قطبی: st.(obj× 40)

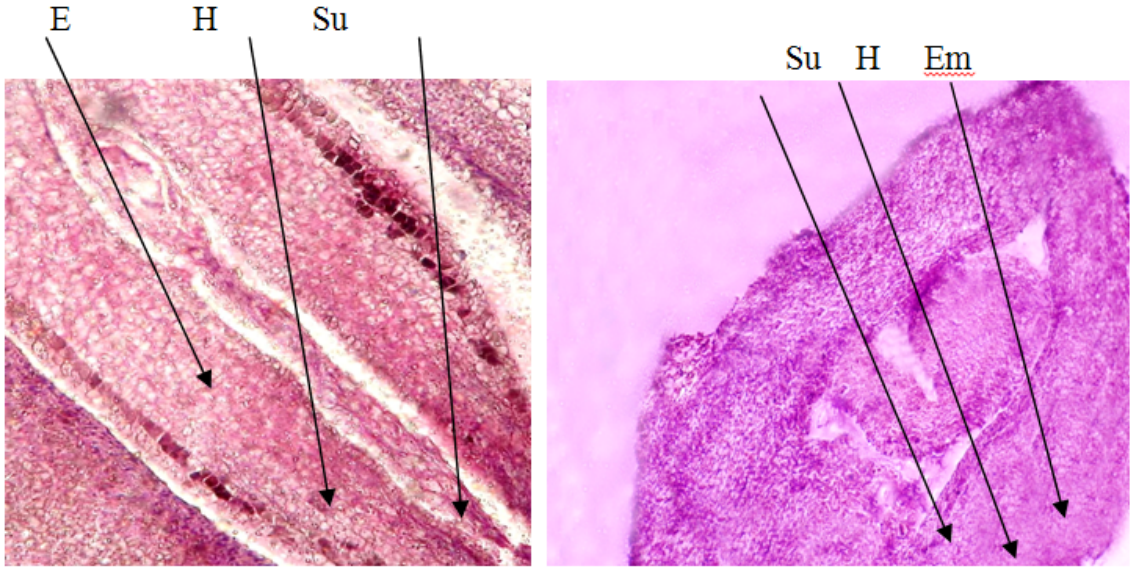
مراحل نمو رویان واندوسپرم در بادام کوهی

در مراحل ابتدایی رویان‌زایی در میوه‌هایی به طول ٤ میلی‌متر، پیش‌رویان در کیسه رویانی استوانه‌ای و طویل‌شده مشاهده شد (شکل ٤a). کمی بعدتر رویان شروع به رشد و نمو کرده و پس از انجام چند تقسیم میتوزی رویان کروی را به وجود می‌آورد که در شکل ٤b قابل مشاهده است. در برش طولی از گل بادام در ناحیه تخمک، رویان کروی شکل با سوسپانسور کوتاه به همراه آندوسپرم در پیرامون آن که از توده‌های پریاخته با ساختار نسبتا پیچیده تشکیل شده است، دیده شد. در این مرحله، تشخیص طرح اولیه لپه‌ها هنوز غیرممکن است. همان‌طور که می‌دانیم نزدیک‌ترین سلول بند یا سوسپانسور به رویان، هیپوفیز[1] نام دارد که در تشکیل بخشی از مریستم ریشه نقش دارد. رویان کروی با تقسیمات و دیواره‌بندی‌های جدید به رویان چماقی شکل تبدیل شد و با ادامه فرآیند کوتاه شدن سوسپانسور در رویان گویچه‌ای و طی مراحل گذر، رویان قلبی شکل (در میوه‌های ٦-٥ میلی‌متری) به وجود آمد (شکل ٥). در این بخش آندوسپرم سلولی نیز مشاهده شد. در واقع لایه درونی آندوسپرم در اطراف رویان تجزیه می‌شود و صرف تغذیه رویان می‌شود. در مرحله بعد با ادامه رشد لپه‌ها، رویان اژدری شکل به وجود آمد (شکل ٦). رویان اژدری نیز یک سری مراحل گذر را طی می‌کند و لپه‌ها حالت کشیده پیدا می‌کنند که به تدریج با تشکیل ریشه چه و مریستم رأسی ریشه سوسپانسور تجزیه می‌شود. این نشان دهنده توانایی رویان در جذب مواد غذایی توسط آندوسپرم است با ادامه رشد لپه‌ها و بلندتر شدن آنها حالت خمیدگی در آنها ایجاد می‌شود تا در درون کیسه رویانی قرار گیرند. آخرین مرحله رویان‌زایی تشکیل رویان لپه‌ای است که در شکل۸ به وضوح قابل مشاهده است. در مرحله گذر از رویان اژدری به رویان لپه‌ای بخش‌های زیر مشاهده شد: مریستم رأسی ساقه[2] (SAM)، مریستم رأس ریشه (RAM)[3] و لپه‌ها؛ (Cot) اندوسپرم نیز در اطراف

[1] Hypophysis

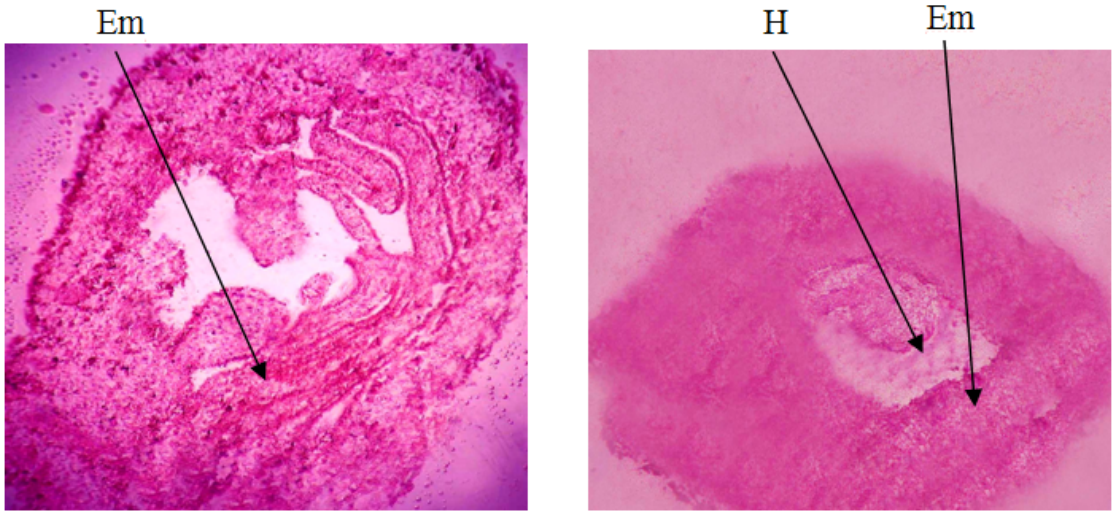
[2] Shoot Apical Meristem
[3] Root Apical Meristem

رویان مشخص است. (شکل ۷). نتایج حاصل از پژوهش Pimienta و Polito در سال ۱۹۸۳ نشان می‌دهد که بی‌نظمی موجود در توسعه طبیعی کیسه جنین، در نهایت باعث سقط جنین در بادام می‌شود. در گونه‌های مختلف Prunus، از جمله بادام، این بی‌نظمی شامل تأخیر در تمایز سلول مادر، فقدان تلفیقی هسته قطبی، فقدان کیسه جنینی، افزایش طولی آندوسپرم و عدم وجود آندوسپرم است. [۱٤] مشاهدات ما در رابطه با مراحل رویانزایی و نمو کیسه رویانی در بادام کوهی با مراحل رویان زایی در Arabidopsis که توسط Lindsey و Souter در سال ۲۰۰۰ [۱۵]، Dumas و Mogense در سال ۱۹۹۳ [٤] و Goodner و Quatrano در سال ۱۹۹۳ [٦] و Lersten در سال ۲۰۰٤ مطابقت دارد. [۱۱]



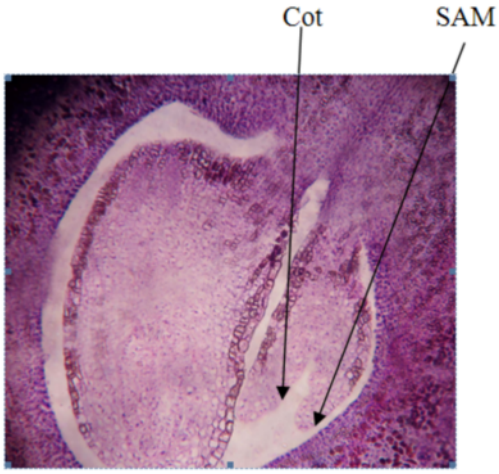
a b

شکل ٤. a. تشکیل رویان. (رویان: Em؛ Su: بند؛ H: هیپوفیز) (10 ×obj). شکل٤. b. برش طولی از بذر (رویان کروی) (em: رویان کروی؛ Su: بند؛ H: هیپوفیز)(40 ×obj)

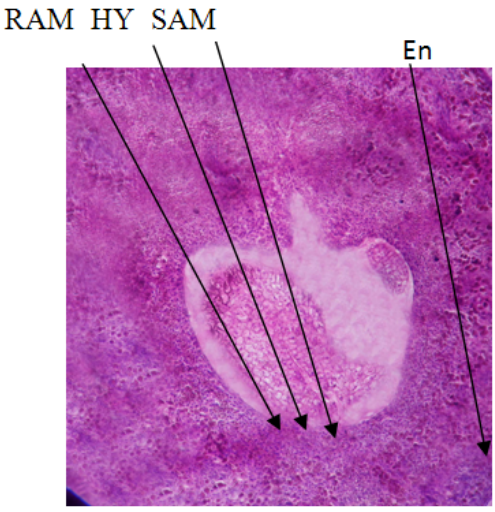


b a

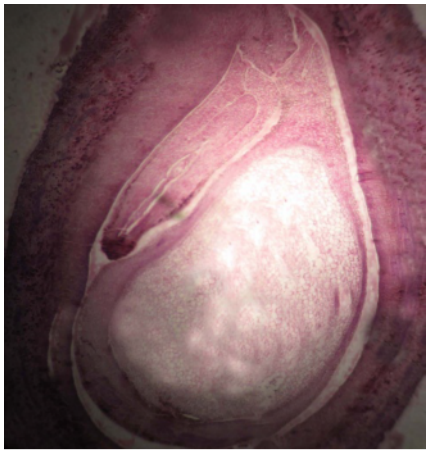
شکل ٥. تصویر مرحله گذر به سوی رویان قلبی شکل در گیاه بادام کوهی (4 ×obj).



شکل ٦. تصویر برش طولی از بذر رویان اژدری شکل در گیاه بادام کوهی. مریستم راسی ساقه: SAM؛ لپه‌ها: Cot. (obj×10)



شکل۷. تصویر مراحل گذر از رویان آژدری بسوی رویان لپه‌ای شکل در گیاه بادام کوهی: مریستم راسی ساقه (SAM) ،مریستم راس ریشه (RAM) و(Cot) لپه‌ها، Hy هیپوکوتیل ،(En)آندوسپرم در حال تجزیه (obj×10)



شکل ۸. تصویر رویان لپه‌ای شکل در گیاه بادام کوهی (obj× 10)

منابع:

[۱] تهرانی‌فر، ع، کافی، م، عدلی، م، ۱۳۷۷، پرورش بادام، انتشارات دانشگاهی مشهد.

[۲] خاتم‌ساز، محبوبه، ۱۳۷۱، تیره گل‌سرخ Rosaceae، فلور ایران، شماره٦ ، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

[۳] طلایی، ایمانی، ع، ۱۳۷٦، معرفی دو رقم بادام جدید دیرگل و پربار و بررسی خصوصیات مورفولوژی و پومولوژی آنها، رساله دوره دکترا.

[4] Dumas, C., Mogensen, H.L., 1993, Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants, Plant Cell. 5: 1337-48.

[5] Egea, J., Burgos, L., 2000, Ovule differences between singlekernelled and double-kernelled fruits in almond (Prunus dulcis). Ann. Appl. Biol. 136: 291–295.

[6] Goodner, B., Quatrano, R.S., 1993, Fucus embryogenesis: a model to study the establishment of polarity, Plant Cell. 5: 1471-81.

[7] Hedge, I. C., Amygdalus L., 1968, (In Flora Iranica, K.H. Rechinger, ed.), Akademische Druck-u.Verlagsandstalt, Graz) 69: 160-184.

[8] Imain, A., 1997, Effect of biological and physiological characteristics on the selected almond varieties these PhD Tarbiat Moddares University of Tehran Iran, 256.

[9] Irannejad Parizi, M., 1374, Ecologic survey of Amygdalus schoparia natural types societies in Kerman province, forestry Msc thesis, natural resources college, Tarbiat modarres university, 145.

[10] Jakovlev, M.A., 1985, Sravitel'naja embryologija cvetkovych rastenij, Nauka, Leningrad. 133.

[11] Lersten, N., 2004, Flowering plant Embryology, Blackwell publishing.

[12] Mikatadze-Pantsulaya, T. A., 1985, A study of the development of the female generative sphere of some species of Amygdalus, L. Soobscheniya Akademii Nauk Gruzinskoi, SSR 117: 577–58.

[13] Oukabli, A., Lansari, A., Wallali, D. L., Abousalim, A., Egea, J., Michaux-Ferriere, N., 2002, Self and cross pollination effects on pollen tube growth and fertilization in self-compatible almond Prunus dulcis cv, "Tuono". J. Hortic. Sci. Biotech. 75: 739–744.

[14] Pimienta, E., Polito, V. S., 1983, Embryo sac development in almond [Prunus dulcis (Mill.), D.A.Webb] as affected by cross-, self- and non-pollination, Ann. Bot. 51: 469–479.

[15] Souter, M., Lindsey, K., 2000, Polarity and signaling in plant embryogenesis, Journal of experimental Botany, 347, 971-983.