فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هفتم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۴

مطالعه مراحل تکوین دانه گرده در *Alcea aucheri* (Boiss) Alef.

آزاده خواجوئی و فرخنده رضانژاد*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

E-mail: frezanejad@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۲۰

چکیده

در این پژوهش تکوین بساک و میکروسپورزایی گیاه ختمی جنوبی (*Alcea aucheri*) متعلق به تیره Malvaceae با روش‌های متداول برش‌گیری و توسط میکروسکوپ نوری مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. گل‌ها وغنچه‌های این گیاه در مراحل مختلف نمو برداشت شده، در FAA تثبیت و سپس در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و قالب‌گیری در پارافین، با میکروتوم برش‌گیری گردید. رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین انجام گرفت. براساس نتایج حاصل از این بررسی تکوین دیواره بساک از نوع دولپه‌ای است و از یک لایه اپیدرم، لایه مکانیکی، یک لایه میانی و یک لایه تغذیه‌کننده (تاپی) تشکیل شده است. تاپی از نوع آمیبی است، میوز با سیتوکینز همزمان دنبال می‌شود و بطور غالب تترادهای چهار وجهی تولید می‌شود.

کلیدواژه‌ها: بساک، دانه گرده، میکروسپورزایی، *Alcea aucheri*، Malvaceae

مقدمه

تیره مالواسه خانواده گسترده‌ای از گیاهان بوته‌ای، علفی و درختی است که بطور عمده در مناطق گرمسیری پراکنده هستند و شامل تقریباً ۱۱۰ جنس و بیش از ۲۰۰۰ گونه می‌باشد [3].

جنس آلسه‌آ، عضوی از تیره Malvaceae است و حدود ۷۵ گونه دارد که در سراسر جهان بخصوص جنوب غربی آسیا پراکنده‌اند که از میان آن‌ها ۳۳ گونه در ایران رشد می‌کند در حالی‌که ۱۶ گونه بومی کشور می‌باشند [8].

ختمی جنوبی یا *Alcea aucheri* (Boiss) Alef. با نام محلی ختمی پاگداری از تیره پنیرک (Malvaceae) [1] گیاهی پایا با ارتفاع ۳۰ تا ۵۰ سانتی‌متر است که توسط کرک‌های بسیار زیادی پوشیده شده است. گل‌های آن صورتی و سفید هستند و بین خرداد تا تیر ظاهر می‌شوند و تا اولین سرمای سخت در پاییز دوام می‌آورند [8]. در ایران پراکنش آن در مناطق مرکزی و جنوبی است. همچنین این گیاه درافغانستان نیز پراکنش دارد [2].

گیاهان جنس آلسهآ بدلیل خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و فعالیت‌های سیتوتوکسیکی مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند که این خصوصیات بویژه مربوط به فلاونوییدها و سایر ترکیبات فنولی آن‌ها می‌باشد [۵]. گل‌های گیاه *Alcea aucheri* ملین هستند و در درمان سرماخوردگی و آلرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند [1].

هدف پژوهش حاضر نمو دیواره بساک و میکروسپورزایی دانه گرده است، نظر به این‌که در این رابطه تابحال هیچ مطالعه‌ی منتشر شده‌ای در این گونه‌ها دیده نشد.

مواد و روش‌ها

جوانه‌ها و گل‌های *A. aucheri* در بهار و تابستان ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در ساعات اولیه صبح از محوطه دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع‌آوری و در فیکساتور FAA (فرمالدئید تجارتی ۳۷ درصد، اسیداستیک خالص و اتانول ۷۰ درصد با نسبت ۱: ۱: ۱۸)، برای تهیه برش‌های میکروتومی قرار داده شدند. سپس مراحل آبگیری با استفاده از درجات رو به افزایش اتانول، شفاف‌سازی (جانشین‌سازی اتانول توسط گزیلن با بکارگیری محلول‌های اتانول– گزیلن) و پارافین‌دهی توسط مخلوط‌های گزیلن- پارافین و در آخر، پارافین خالص، انجام شد تا تهیه‌ی بلوک‌های پارافینی حاوی نمونه‌های مورد نظر، امکان‌پذیر شود. برش‌گیری نمونه‌ها توسط میکروتوم چرخان با ضخامت ۷-۵ میکرومتر انجام گرفت و برش‌های حاصل پس از پارافین‌زدایی، با هماتوکسیلین و ائوزین الکلی رنگ‌آمیزی شدند [7]. مطالعه‌ی لام‌های تهیه شده، با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS BH-2)، و عکس‌برداری از نمونه‌های مناسب، توسط دوربین دیجیتال Sony، انجام شد.

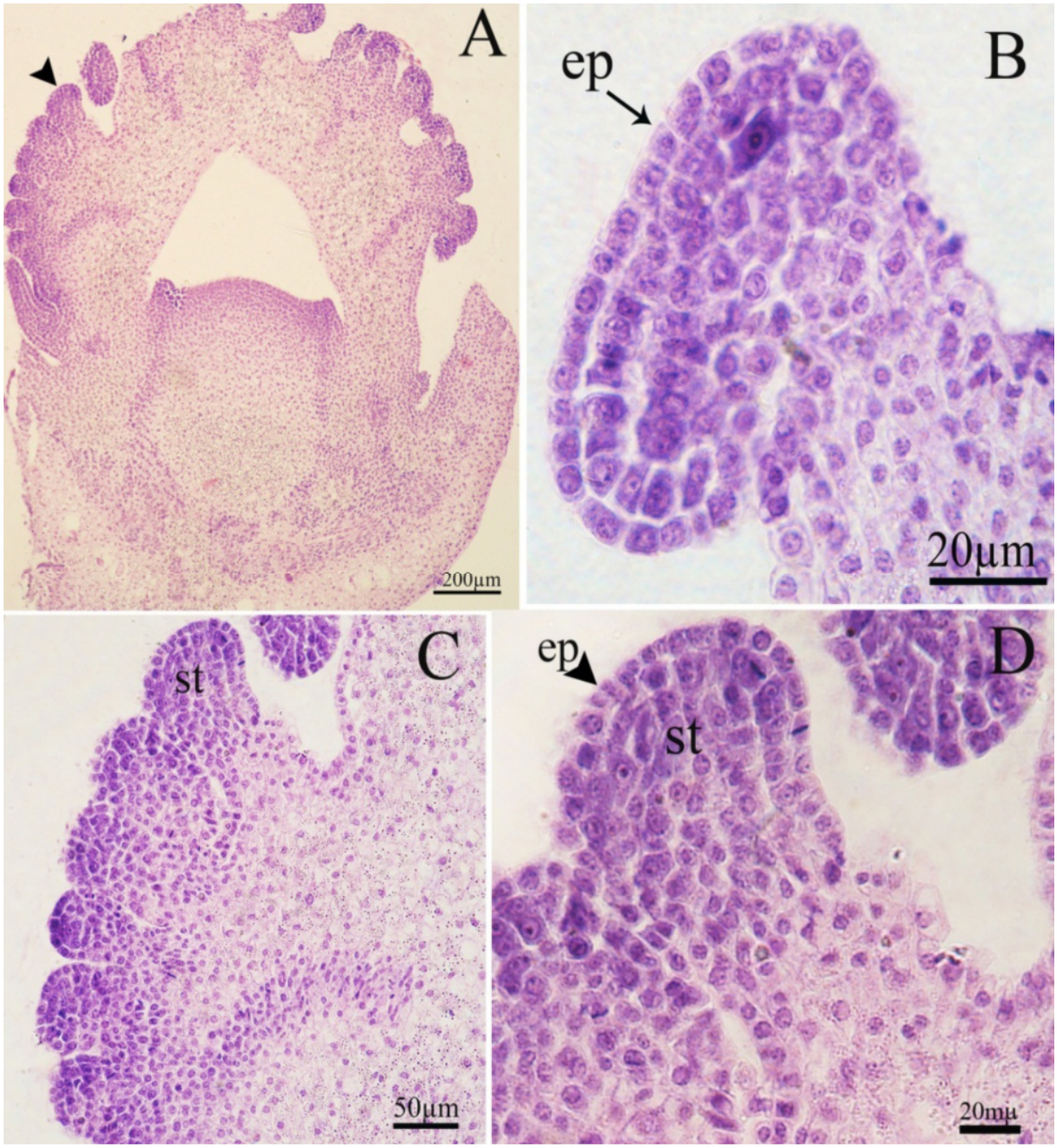
نتایج

بساک‌ها در مراحل اولیه نمو بصورت توده‌هایی از سلول‌های مریستمی بدون تمایز احاطه شده در اپیدرم مشاهده می‌شوند (شکل A ۱). سپس یک یا چند سلول زیر اپیدرمی به سلول‌های آرکئوسپوری تمایز می‌یابند که سلول‌های آرکئوسپوری ضمن تقسیمات مماسی بافت هاگزا و لایه‌ی کناری را ایجاد می‌کند (شکل B ۱) که این سلول‌ها منشأ تشکیل لایه‌های مختلف دیواره‌ی بساک و همچنین بافت هاگزا (شکل C, D ۱) هستند. ویژگی سلول‌های بافت هاگزا، رنگ پذیری بالا، سیتوپلاسم متراکم و هسته‌های به‌نسبت حجیم است. سلول‌های این بافت در اثر تقسیمات میتوزی پی‌درپی و در نهایت در اثر تمایز به سلول‌های مادر میکروسپور تبدیل می‌شوند. سلول‌های مادر میکروسپور هسته‌ای حجیم با یک هستک واضح و سیتوپلاسم متراکم دارند که آمادگی آن‌ها برای شروع تقسیم میوز بمنظور تولید میکروسپورها را نشان می‌دهد (شکل A-F ۲). تعداد سلول‌ها در هر کیسه گرده کم و اندازه آن‌ها بزرگ است و همان‌گونه که در شکل A ۲ مشخص است در برش طولی تنها یک ردیف سلولی قابل مشاهده است. در مرحله سلول مادر میکروسپور چهار لایه‌ی سازنده دیواره شامل اپیدرم، لایه مکانیکی، یک لایه میانی و لایه مغذی با سلول‌های تک هسته‌ای شکل گرفته‌اند اما تمایز چندانی میان سلول‌های تشکیل دهنده‌ی این لایه‌ها دیده نمی‌شود (شکل C, D ۲). بتدریج و با ورود سلول‌های مادر میکروسپور به میوز، سلول‌های لایه مغذی متمایز گشته و بصورت سلول‌هایی بزرگ با سیتوپلاسم متراکم دیده می‌شوند، اما در سه لایه دیگر

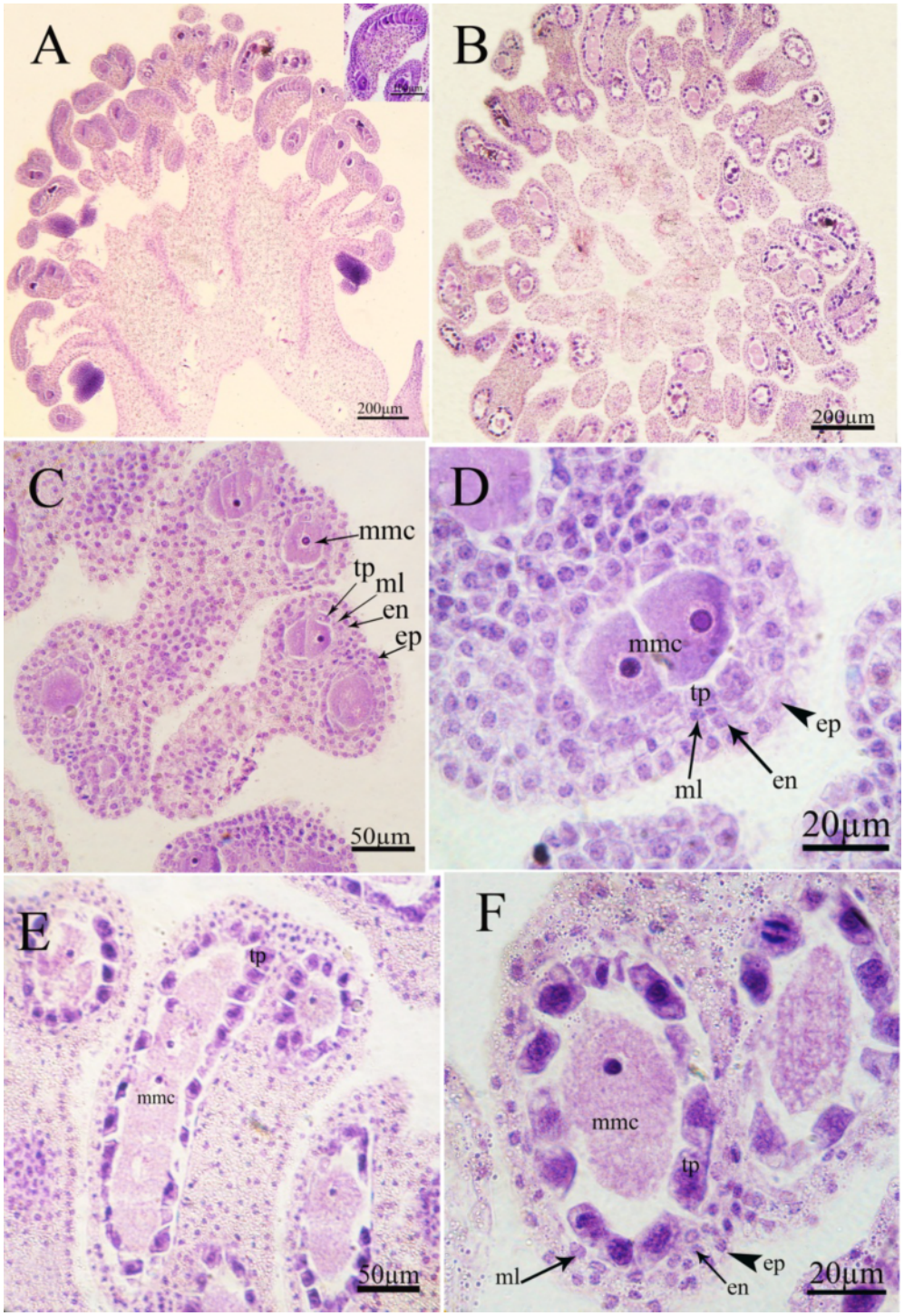
تغییری دیده نمی‌شود و این لایه‌ها همچنان بدون تمایز و مشابه یکدیگرند. در این مرحله سلول‌های لایه مغذی از سلول‌های مادر میکروسپور و نیز از لایه‌های دیگر دیواره فاصله می‌گیرند. همزمان با میوز I دیواره‌های کالوزی اطراف سلول‌های مادر میکروسپور ایجاد می‌شوند، این دیواره‌ها سلول‌های مادر میکروسپور را طی میوز از یکدیگر جدا نگه می‌دارند (شکل ۲ E, F).

میوز در سلول‌های مادر میکروسپور با سیتوکینز همزمان دنبال می‌شود (شکل ۳ A). شکل تترادهای حاصل بطور غالب از نوع چهار وجهی است، اما بندرت تترادهای چهارگوشه و چلیپایی نیز دیده می‌شوند. چهار سلول احاطه شده در تتراد توسط دیواره‌های کالوزی شفاف و ضخیمی احاطه شده‌اند، این دیواره‌های کالوزی در حد فاصل بین میکروسپورهای موجود در تتراد هم مشاهده می‌شوند (شکل ۳ B-D).

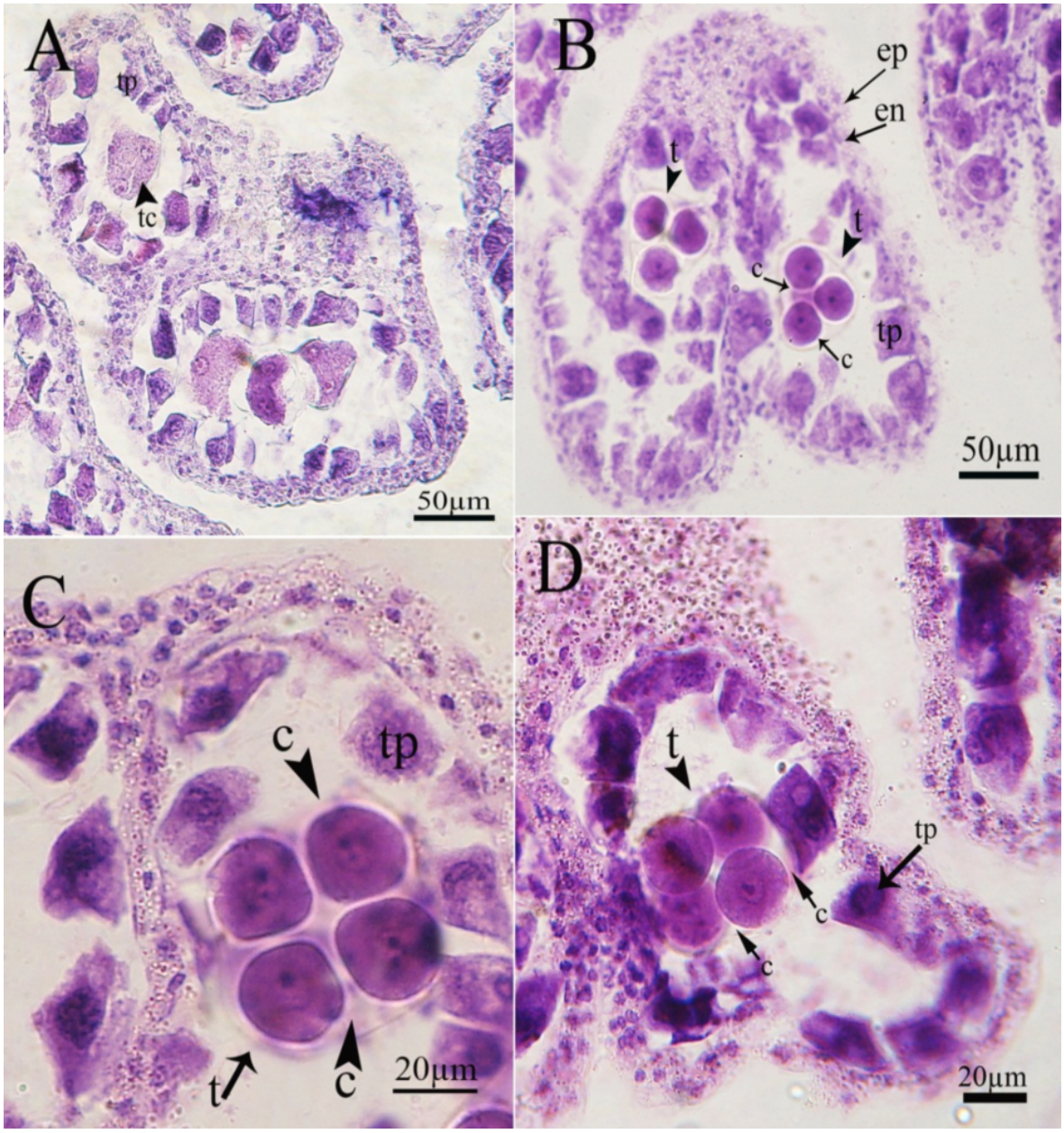
هنگامی‌که دیواره کالوزی متلاشی شد، میکروسپورها از تتراد رها می‌شوند. در مرحله میکروسپور نابالغ تمایز لایه مغذی کامل شده، لایه میانی تجزیه می‌شود و اثری از آن دیده نمی‌شود (شکل ٤ A). اگزین این میکروسپورهای تک هسته‌ای در مراحل اولیه صاف است اما در مراحل بعدی بلوغ هم اگزین و هم دانه‌های گرده رشد قابل توجه و ناگهانی نشان داده، بزرگ و خاردار می‌شوند (شکل ٤ B-E). سلول‌های لایه مغذی در مرحله تتراد میکروسپور و اوایل مرحله میکروسپور آزاد در جای خود باقی می‌مانند. سپس دیواره‌ی این سلول‌ها تخریب شده، پروتوپلاست به حفره بساک وارد می‌شود و تاپی آمیبی اطراف دانه‌های گرده مشاهده می‌شود (شکل ٤ B). در اواخر مرحله دانه گرده‌ی بالغ تاپی بطور کامل جذب می‌شود و دیواره بساک تنها شامل لایه مکانیکی است. سلول‌های این لایه بمیزان قابل توجهی بزرگ شده‌اند و ضخیم شدگی‌های فیبری روی دیواره‌های شعاعی و مماسی خود ایجاد کرده‌اند (شکل ٤ C). دانه گرده بالغ کروی و سطح آن خاردار است. اندازه متوسط آن بطور جالب توجهی بزرگ‌تر از حد معمول دانه‌های گرده و ۱۱٤ میکرومتر می‌باشد (شکل ٤ D, E).



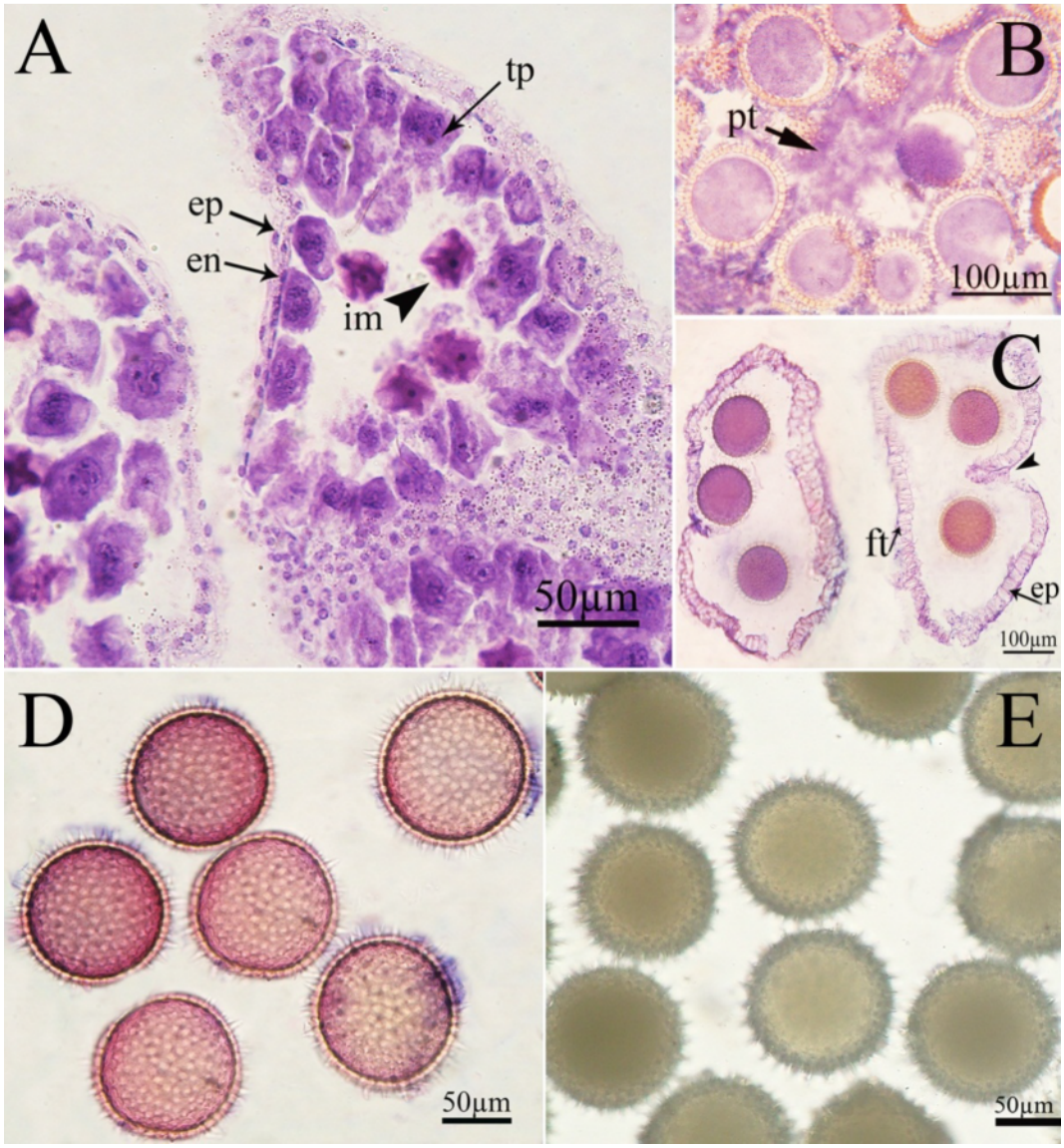
شکل A-D ۱ مراحل نموی بساک در ختمی جنوبی (*A. aucheri*). A – برش طولی پرچم با بساک‌های جوان بدون تمایز، یک دسته‌ای بودن میله پرچم‌ها (مونودلفی) دیده می‌شود، B– تشکیل توده‌ی هاگزا و لایه‌ی کناری از سلول‌های آرکئوسپوری، C-D– مشخص شدن محدوده‌ی اپیدرم و حضور سلول آرکئوسپوری و بافت هاگزا ، بافت هاگزا با رنگ پذیری بالا و هسته‌های به‌نسبت حجیم (D)، ep= لایه اپیدرم، st= بافت هاگزا. مقیاس‌ها بزرگنمایی را نشان می‌دهند.



شکل A-F ۲. مراحل نموی بساک در ختمی جنوبی (*A. aucheri*). A- برش طولی پرچم در مرحله مادر میکروسپور، مونودلفی (تک دسته‌ای) آشکار است، B- برش عرضی پرچم در مرحله مادر میکروسپور، C و D- بترتیب بساک و کیسه گرده در مرحله‌ی سلول مادر میکروسپور و مشخص شدن محدوده‌ی چهار لایه‌ی دیواره، E و F- کیسه‌های گرده در مرحله سلول مادر میکروسپور و تمایز نسبی لایه مغذی، سلول‌های مادر میکروسپور آماده‌ی تقسیم، mmc= سلول مادر میکروسپور، tp= لایه مغذی (تاپی) ، ml= لایه میانی، en= لایه مکانیکی، ep= لایه اپیدرم. مقیاس‌ها بزرگنمایی را نشان می‌دهند.



شکل A-D ۳ مراحل نموی بساک در ختمی جنوبی (*A. aucheri*). A- بساک حاوی سلول‌های تترادی، B-D- بساک در مرحله تتراد، در شکل B تتراد از نوع چهار وجهی (tetrahederal) است که غالبیت با این نوع تتراد است، در شکل C تتراد چهارگوشه (tetragonal) و در شکل D تتراد چلیپایی (decussate) دیده می‌شوند، دیواره کالوزی اطراف تترادها و بین میکروسپورهای تتراد بوضوح دیده می‌شوند، لایه تاپی نیز بصورت رشد یافته دیده می‌شود، tc= سلول تترادی، t= تتراد، c = دیواره کالوزی، t= تاپی، en= لایه مکانیکی، ep= لایه اپیدرم. مقیاس‌ها بزرگنمایی را نشان می‌دهند.



شکل A-E ٤. مراحل نموی بساک در ختمی جنوبی (A. aucheri). A- بساک حاوی میکروسپورهای نابالغ که مجاور لایه مغذی قرار گرفته‌اند، B- تاپی آمیبی اطراف دانه‌های گرده، C- بساک در مرحله شکوفایی، سلول‌های لایه مکانیکی بزرگ شده و دارای ضخیم شدگی‌های فیبری روی دیواره‌های خود هستند، نوک پیکان محل شکوفایی بساک را نشان می‌دهد، D- دانه گرده بالغ رنگ آمیزی شده با ائوزین- هماتوکسیلین، E- دانه‌های گرده بالغ بدون رنگ آمیزی. im= گرده نابالغ، ep= لایه اپیدرم، en= لایه مکانیکی، tp= لایه مغذی، ft= ضخیم شدگی‌های فیبری لایه مکانیکی، pt= تاپی آمیبی. مقیاس‌ها بزرگنمایی را نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این گیاه چهار لایه دیواره‌ای مشاهده شد. نمو دیواره بساک در این گیاه با نوع دولپه‌ای مطابقت دارد اپیدرم پریموردیوم بساک بطور مستقیم به اپیدرم دیواره بساک تبدیل می‌شود. تقسیمات سلول آرکئوسپوری در نهایت منجر به تولید سه لایه سلولی دیواره‌ای زیر اپیدرمی و بافت هاگزامی‌شود. در نتیجه دیواره بساک قبل از بلوغ شامل ٤ لایه سلولی اپیدرم، لایه مکانیکی، لایه میانی و لایه مغذی (از خارج به داخل) است. سلول‌های لایه میانی در مرحله تتراد بطور کامل از بین می‌روند و اثری از آن‌ها دیده نمی‌شود. شاید این لایه تغذیه کننده سلول‌های مادر

میکروسپور در هنگام میوز باشد. ضخیم شدگی‌های فیبری در مرحله گرده بالغ در لایه مکانیکی دیده می‌شود [9].

در برخی گونه‌های تیره Malvaceae مانند *Althaea rosea* سلول‌های اسپوروژن اولیه بطور مستقیم بعنوان مادر میکروسپور عمل می‌کنند. اما در برخی دیگر این سلول‌ها متحمل تقسیمات اندکی شده، تعداد سلول‌های اسپوروژن افزایش می‌یابد که در این‌صورت این سلول‌ها در چند ردیف قرار می‌گیرند. در هر صورت، تعداد سلول‌ها در هر حفره، نسبت به سایر تیره های راسته Malvales کمتر و اندازه آن‌ها بزرگ‌تر است [6]. از آن‌جایی‌که در این پژوهش تنها یک ردیف سلول در برش‌های طولی مشاهده شد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سلول‌های اسپوروژن در گونه مورد مطالعه بطور مستقیم بعنوان مادر میکروسپور عمل می‌کنند.

میوز در سلول‌های مادر میکروسپور با سیتوکینز همزمان دنبال می‌شود و مشاهده مرحله چهار هسته‌ای (سلول تترادی) نشانگر این واقعیت است. بنابراین طی میوز I تقسیم سیتوپلاسم انجام نشده و در پایان میوز II و پس از تشکیل سلول تترادی جدار بندی صورت می‌گیرد. بیشتر تترادهای مشاهده شده چهار وجهی هستند اما تعداد اندکی تترادهای چهارگوشه و چلیپایی نیز مشاهده شدند. Rao و همکاران (۱۹۵٤) در مطالعه‌ای که بر روی تعدادی از گونه‌های تیره مالواسه انجام دادند تتراد چهار وجهی را نوع غالب تتراد معرفی کردند. هرچند در برخی از گونه‌های مورد مطالعه چند مورد تتراد bilateral و یک مورد تتراد خطی نیز مشاهده کردند [6]. Tang و همکاران (۲۰۰۹) نیز با بررسی میکروسپورزایی در *Eriolaena candollei* Wallich (Malvaceae) نتایج مشابهی بدست آوردند. در این مطالعه نیز بندرت تترادهای چلیپایی و دو هم کنار مشاهده شدند [9].

سلول‌های لایه مغذی بطور قابل ملاحظه‌ای از مرحله سلول مادر میکروسپور به بعد بزرگ و طویل می‌شوند و رنگ بیشتری نسبت به سلول‌های مادر میکروسپور بخود می‌گیرند. با پیشرفت میوز سلول‌های این لایه از سلول‌های لایه میانی جدا می‌شوند. این سلو لها در مرحله تتراد میکروسپور و اوایل مرحله میکروسپور آزاد در جای خود باقی می‌مانند و پس از آن با تخریب دیواره‌ی این سلول‌ها، پروتوپلاست به حفره بساک وارد می‌شود و دانه‌های گرده را احاطه می‌کند بنابراین لایه مغذی از نوع آمیبی می‌باشد که با نتایج حاصل از مطالعات Rao و همکاران (۱۹۵٤) مطابقت دارد [6].

اگزین میکروسپورهای تک هسته‌ای در مراحل اولیه صاف است اما هم دانه گرده و هم اگزین رشد قابل توجه و ناگهانی نشان می‌دهند و بزرگ و خاردار می‌شوند [6, 9]. دانه‌های گرده گیاهان این خانواده کروی با سطح اگزین خاردار هستند و از نظر اندازه در بین بزرگترین دانه‌های گرده نهاندانگان قرار می‌گیرند [4].

منابع

[۱] پاکروان، م. (۱۳۸۷) فلور ایران، تیره پنیرک (Malvaceae). جلد ۵۸، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران.

[۲] شریفی فر، ف.، کوهپایه، ع.، متقی، م. م.، امیرخسروی، ا. و پور محسنی نسب، ا. (۱۳۸۹) بررسی اتنوبوتانی گیاهان دارویی شهرستان سیرجان استان کرمان، داروهای گیاهی ۳: ۱۹-۲۸.

[3] Bibi, N., Akhtar, N., Hussain, M. and Khan, M. A. (2010) Systematic implications of pollen morphology in the family Malvaceae from north west frontier province, Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 42(4): 2205-2214.

[4] El Naggar, S. M. and Sawady, N. (2008) Pollen morphology of Malvaceae and its taxonomic significance in Yemen. Flora Mediterranea, 18: 431-439.

[5] Esmaeelian, B., yari Kamrani, Y., Amoozegar, M. A., Rahmani, S., Rahimi, M. and Amanlou, M. (2007) Anti-cariogenic of malvidin-3,5-diglucoside isolated from Alcea longipedicellata against oral bacteria. International Journal of Pharmacology, 3(6): 468-474.

[6] Rao, C. V. (1954) Embryological studies in Malvaceae-I. Proceedings of the National Institute of Sciences in India 20: 127-150.

[7] Rezanejad, F. (2008)The structure and ultrastructure of anther epidermis and pollen in Lagerstroemia indica L. (Lythraceae) in Response to Air Pollution.Turkish Journal of Botany, 32: 35-42

[8] Shooshtarian, S. and Salehi, H. (2010)Enhancing Alcea Aucheri (Boiss.) Alef. seed germination by application of some scarification treatments. Advances in Environmental Biology, 4(2): 216-219.

[9] Tang, Y., Gao, H. and Xie, J. S. (2009)An embryological study of Eriolaena candollei Wallich (Malvaceae) and its systematic implications. Flora, 204: 569-580.