

مطالعه مراحل تکوین دانه گرده و تخمک در *Inula aucheriana* DC.

عبدالکریم چهرگانی راد^{۱*}، سمیه حاجی صادقیان و فریبا محسن‌زاده^۱
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

چکیده

در این پژوهش مراحل و چگونگی تکوین تخمک و دانه گرده در گیاه *Inula aucheriana* بررسی گردید. گل‌ها و غنچه‌ها در مراحل مختلف نمو برداشت شده، در FAA₇₀ تثبیت و سپس در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و قالب‌گیری در پارافین، با میکروتوم برش‌گیری گردید. رنگ آمیزی با پرئودیک اسید شیف و نیز با همتوکسیلین انجام گرفت. نتایج نشان داد که در این گیاه بساک‌ها دارای ۴ کیسه گرده بوده و لایه مغزی آن از نوع پری‌پلاسمودیومی کاذب است. سیتوکینز همزمان بوده و تترادهای میکروسپور فقط از نوع چهار گوش (تتراگونال) است. دانه‌های گرده در زمان انتشار دو یاخته‌ای، دارای سه شکاف رویشی و با تزیینات سوزنی شکل هستند. تخمک از نوع واژگون، تک پوسته‌ای و کم خورش است. لایه اندوتلیوم از یک ردیف یاخته تشکیل شده است. نمو کیسه رویانی بر اساس الگوی مونوسپوریک و تیپ پلی‌گونوم صورت می‌گیرد. پس از تقسیم میوز تترادهای مگاسپور آرایش T شکل دارند. در این گونه، مگاسپور عملکردی موقعیت شالازی دارد. کیسه رویانی ابتدا بسیار کوچک است، به طوری که هسته‌های آن آرایش خطی فشرده را به خود می‌گیرند. در جریان بلوغ کیسه رویانی هرچند باریک باقی می‌ماند، اما رشد طولی درخور توجهی پیدا می‌کند. هسته یاخته‌های آنتی‌پود حجیم و حالت پلی‌پلویدی دارد. بر اساس نتایج این پژوهش، کریستال‌های سوزنی شکل در سلول‌های اپیدرم دیواره مادگی مشاهده شد، که از اختصاصات این گونه است. همچنین در سطح بیرونی مادگی نیز کرک‌های تک‌رشته‌ای، تک‌سلولی و بسیار طویل مشاهده گردید. گزارش حاضر، اولین گزارش دقیق درباره‌ی مراحل تکوین تخمک و دانه گرده این گونه است که می‌تواند در تفکیک آن از گونه‌های مجاور راه گشا باشد.

واژه‌های کلیدی: دانه گرده، تخمک، مگاسپورزایی، میکروسپورزایی، *Inula aucheriana*، Asteraceae

مقدمه

گرفته است. توسعه دانش زیست‌شناسی تکوینی و مطالعه چگونگی و مراحل تکوین اندام‌های تولید مثلی، برای حفظ گیاهان، به ویژه گیاهان نادر و در حال انقراض و نیز مهم در بخش کشاورزی ضروری است (Batygina, 1987). تیره مرکبان Asteraceae بزرگترین تیره گیاهی است

زیست‌شناسی تکوینی زایشی که مطالعه مراحل مختلف تکوین گل، یعنی اندام‌زایی گل، تکوین پرچم و دانه گرده، تکوین مادگی، تکوین تخمک و مگاسپوریت را شامل می‌شود، در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه قرار

آرایه‌شناختی این گروه نیز همانند سایر تیره‌های گیاهی استفاده گردد (Shamrov, 1998; Johri *et al.*, 1992). مطالعات رویان‌شناختی محدود انجام شده، ویژگی‌های استثنایی و نادر متعددی را در گیاهان این تیره نشان داده که عبارتند از: وجود پدیده Nemece؛ یعنی تشکیل ساختارهای شبیه کیسه رویانی در دانه گرده (Davis, 1964)، افزایش یاخته‌های قرینه (سینرژیدها) در کیسه رویانی (Batygina (1982; Cichan and Palser, 1987)، افزایش یاخته‌های آنتی‌پود (Richards, 1997; Pandey, 2001)، تکوین کیسه رویانی ۴ یاخته‌ای (Harling, 1951) و وجود آپومیکسی (Davis, 1968; Chaudhury *et al.*, 2001). بنابراین، انجام مطالعات تکوینی به منظور توسعه دانش زیست‌شناسی تولید مثلی در گیاهان این تیره ضروری است. با توجه به ارزش دارویی و وجود اسانس در (Maoz *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008) این گونه به منظور مطالعات تکوینی در پژوهش حاضر انتخاب شده است. بر اساس مطالعات مرجع‌شناختی به عمل آمده، پژوهش حاضر اولین گزارش در مورد تکوین اندام‌های زایشی گونه *Inula aucheriana* است.

مواد و روش‌ها

برای مطالعه تکوین اندام‌های زایشی *I. aucheriana* گیاهان از زیستگاه‌های طبیعی در همدان جمع‌آوری شده، در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا (BASH) نگهداری می‌شوند. مشخصات محل جمع‌آوری آن به صورت زیر

(Bremer, 1994). بر اساس گزارش‌های باغ گیاه‌شناسی سلطنتی کیو، این تیره بیش از ۱۶۰۰ سرده و ۲۳۰۰۰ گونه دارد (Watanabe, 2002; Kadereit and Jeffrey 2007; Crawford *et al.*, 2009). در این تیره تقسیم‌بندی سرده‌ها و تشخیص مرز بین آنها اغلب مشکل‌زاست و برخی از آنها باید پی در پی به زیر گروه‌های کوچک‌تر تقسیم شوند (Hind *et al.*, 1995). یکی از مشکلات اساسی آرایه‌شناختی در این تیره ارتباطات بین سرده‌ها، طایفه‌ها و همچنین وجود گونه‌های چند شکل (پلی‌مورف) است (Hind, 1995)، که مطالعات تکوینی و رویان‌شناختی می‌تواند به حل مشکلات آرایه‌شناختی نیز در این تیره کمک نماید.

پراکنش جهانی و وجود سرده‌ها و گونه‌های فراوان در این تیره که بسیاری از آنان خواص دارویی دارند، تیره مرکبان را موضوع مطالعات متعددی نموده است (Torrell *et al.*, 1999). بسیاری از گیاهان این تیره از جمله *Inula aucheriana* از نظر خواص دارویی و داشتن اسانس و مواد مؤثره، ارزش ویژه‌ای دارند (Maoz *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008). مطالعات متعدد کاربولوژیک و فیتوشیمی در این آرایه صورت گرفته است (Vallès *et al.*, 2003; Vallès *et al.*, 2005)، اما با وجود این، به نظر می‌رسد که مطالعات تکوینی و رویان‌شناختی محدودی در این تیره انجام شده است، بنابراین هنوز انجام مطالعات جدید تکوینی برای افزایش دانش و آگاهی در مورد گیاهان این تیره ضروری است (Shamrov, 1998). همچنین پیش‌بینی می‌شود مطالعات تکوینی و رویان‌شناختی بتواند در کنار سایر مطالعات در حل مشکلات

وجود می‌آید، برچه‌ها باز است (شکل ۱)، همچنین، مادگی دارای کاکل ریش مانند یا تار مانند است که همزمان با تشکیل پرچم و مادگی شروع به تشکیل می‌کند (شکل ۱)؛ خامه دو شاخه‌ای، بلند، در انتها مدور، و بافت کلاله‌ای به شکل دو خط حاشیه‌ای بر روی هر شاخه خامه دیده می‌شود و تا پایین خامه امتداد دارد (شکل ۲)؛ دو شاخه خامه در محل کلاله به هم نزدیک شده‌اند (شکل ۲).

تخمک از نوع واژگون است و پریموردیوم تخمک، خمیدگی را از همان مراحل اولیه آغاز می‌کند. بنیان‌گذاری پوشش تخمک در زمانی آغاز می‌شود که تخمک حدود ۹۰ درجه چرخش حاصل کرده است (شکل ۳). با افزایش میزان خمیدگی ضمن رشد، تخمک به حالت خمیده در می‌آید؛ به طوری که در آغاز تشکیل کیسه رویانی، تخمک کاملاً واژگون شده است (شکل ۷) و در نتیجه با اتصال بخشی از پوسته به بند، رافه تشکیل می‌شود (شکل‌های ۷-۹).

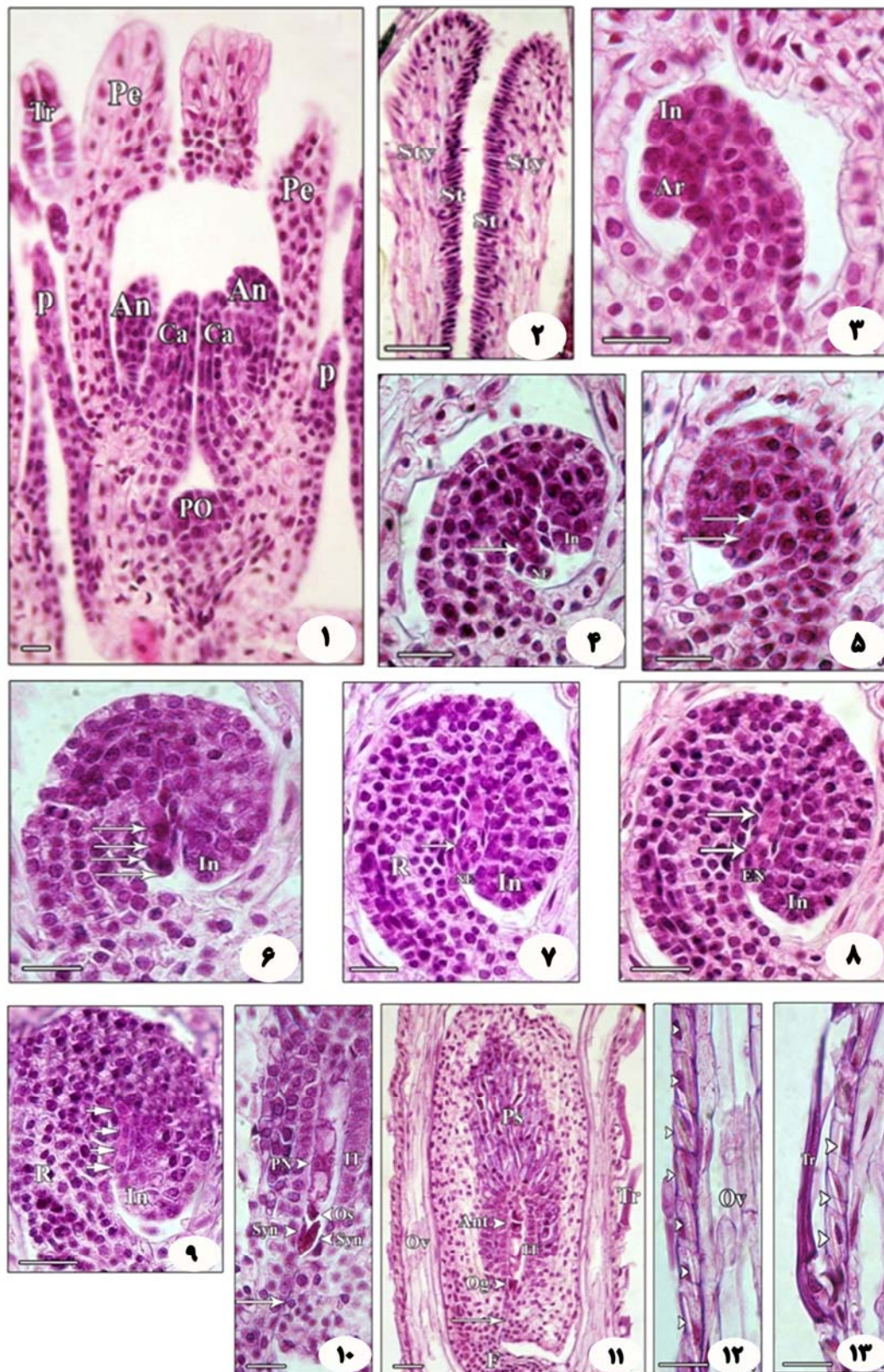
تخمک تک پوسته‌ای است و با تقسیمات شعاعی یاخته‌های سطحی پریموردیوم تخمک، بنیان‌گذاری پوسته تخمک در طرفین جسم تخمک و در قاعده خورش به صورت برجستگی چندیاخته‌ای انجام می‌شود (شکل ۳). اپیدرم خورشی در نمونه مورد بررسی فقط شامل لایه دیواره مگاسپورانژ است که یاخته مادر مگاسپور را احاطه می‌کند (شکل ۴). اپیدرم خورشی در این نمونه قبل از لقاح تجزیه می‌شود.

مشخص شد: همدان، جاده رزن به آوج، روستای امیرآباد، ارتفاع ۱۴۰۰ متری. علاوه بر این گل‌ها و غنچه‌های گیاه مورد مطالعه از گیاهان طبیعی رویش یافته در منطقه ذکر شده، در مراحل مختلف نمو برداشت شده، در تثبیت‌کننده FAA70 تثبیت و در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از قالب‌گیری در پارافین با میکروتوم برش‌گیری گردید. رنگ‌آمیزی با پرئودیک اسید شیف و نیز با هماتوکسیلین طبق روش پیشنهادی توسط Yeung (۱۹۸۴) انجام گرفت. هر یک از مراحل تکوین تخمک و پرچم در چندین برش به وسیله میکروسکوپ نوری Zeiss Axiostar Plus (Germany) مجهز به دوربین دیجیتال بررسی شد. برای هر مرحله حداقل ۲۰ گل برش‌گیری و از بهترین آنها عکس‌برداری شد.

نتایج

تشکیل مادگی و تخمک در *I. aucheriana*

بلافاصله پس از ایجاد پریموردیوم پرچم، برجستگی مرستمی برای تشکیل مادگی شکل می‌گیرد؛ به طوری که تشکیل پرچم و مادگی تقریباً همزمان به نظر می‌رسند، اما رشد مادگی بسیار سریع صورت می‌گیرد و قبل از تکوین پرچم، پریموردیوم تخمک به صورت برجستگی کوچک پایه‌گرا دیده می‌شود (شکل ۱). در این گونه، برچه‌ها دو عدد و پیوسته است و هنگامی که پریموردیوم تخمکی به



شکل ۱-۱۳- نشان‌دهنده مراحل تکوین تخمک، مگاسپورزایی و تکوین مگامتوفیت در *Inula aucheriana* است: (۱) برش طولی از غنچه گل که نشان‌دهنده تکوین پرچم‌ها و مادگی است. در قاعده مادگی پریموردیوم تخمک قابل رؤیت است. پریموردیوم تخمکی زمانی به وجود می‌آید که هنوز تکوین پرچم کامل نشده است و در این زمان برچه‌ها باز است. تشکیل کاکل نیز همزمان با این تحولات آغاز می‌شود. (۲) خامه دوشاخه‌ای و بلند و در انتها مدور است. بافت کلاله‌ای به شکل دو خط حاشیه‌ای بر روی هر شاخه خامه قرار گرفته و تا پایین کشیده شده است، دو شاخه خامه در محل کلاله به هم نزدیک شده‌اند. (۳) تخمک جوان در حال تکوین، تشکیل پوسته تخمک و سلول آرکتوسپور دیده می‌شود. (۴) برش طولی از تخمک جوان با یاخته مادر مگاسپور (me) (↑) و پوسته‌های تخمکی در حال تشکیل. (۵) سلول‌های حاصل از اولین تقسیم میوزی (دیاد) (↑↑). (۶) تخمک در مرحله تتراد T شکل (↑)، پوسته تخمک بخش عمده‌ای از جسم تخمک را فرا گرفته است. (۷) برش طولی تخمک با مگاسپور عملکردی شالازی (fme) (↑). (۸) برش طولی تخمک نشان‌دهنده کیسه رویانی دو هسته‌ای (↑↑). قبل از تکمیل تکوین بخش‌های فوقانی تخمدان و تشکیل خامه و کلاله، به تدریج اولین آثار تشکیل تخمک (پریموردیوم تخمک) در کف جدار تخمدان پدیدار می‌شود، یعنی تمکن از نوع قاعده‌ای است. (۹) برش طولی تخمک نشان‌دهنده کیسه رویانی چهار هسته‌ای است. هر هسته با یک پیکان نشان داده شده است. (۱۰) برش طولی از کیسه رویانی بالغ، دستگاه تخم متشکل از یاخته تخمزا (os) و قرینه‌ها (syn) در مجاورت مجرای سفت (↑) است. هسته‌های قطبی (pn) قابل رؤیت است. (۱۱) تخمک واژگون، کم‌خورش، تک‌پوسته‌ای و با بندی نسبتاً کوتاه (F). خورش در این نمونه دارای پوستامنت (Ps) و ضخامت دیواره تخمدان (Ov) زیاد است. پیکان مجرای سفت را نشان می‌دهد. (۱۲) سلول‌های اپیدرم حاوی کریستال‌های سوزنی شکل‌اند (↑). (۱۳) سطح مادگی پوشیده از کرک‌های رشته‌ای تک سلولی بسیار کشیده (↑) است. شاخص معادل ۵۰ میکرومتر است. An: بساک؛ Pe: گلبرگ؛ Tr: کرک؛ Ca: برچه؛ Po: پریموردیوم برچه؛ Sty: خامه؛ In: پوسته تخمک؛ Ar: آرکتوسپور؛ Ov: تخمدان؛ Og: دستگاه تخم؛ R: رافه؛ Mi: مجرای سفت؛ Me: مگامتوسیت؛ en: اندوتلیوم؛ mc: یاخته مادر مگاسپور؛ fme: مگاسپور عملکردی؛ pn: هسته قطبی (بعد از تلقیح هسته ثانویه)؛ ant: آنتی‌پودها؛ syn: قرینه‌ها؛ os: تخمزا؛ Ps: پوستامنت.

به صورت یک ستون از سلول‌های طویل مستقر در بخش زیرین انتهای آنتی‌پودی کیسه رویانی قرار گرفته است. سلول‌های پوستامنت از سلول‌های اطراف به وسیله سیتوپلاسم متراکم تر و دیواره‌های رنگ‌پذیرتر قابل تشخیص هستند.

مگاسپورزایی و نمو گامتوفیت ماده *I. aucheriana*

مگاسپوروسیت با حجم زیاد، هسته درشت، متراکم و حجیم و شکل چند وجهی خود به خوبی از سایر یاخته‌های خورش قابل تشخیص می‌باشد (شکل ۴). مگاسپوروسیت با انجام میوز مگاسپورها را تشکیل می‌دهد که ضمن رشد گامتوفیت ماده یا کیسه‌رویی را تولید می‌کنند.

در رأس خورش تنها یک یاخته آرکتوسپوری وجود دارد که در داخل پریموردیوم تخمک، این یاخته به واسطه حجم زیاد، سیتوپلاسم متراکم و هسته بزرگ آن قابل تشخیص است (شکل ۳). یاخته مادر مگاسپور از یاخته آرکتوسپوری تمایز یافته و موقعیت آن در لایه سوم است (شکل ۴).

تخمک *I. aucheriana* از نوع کم‌خورش است که دارای یاخته‌های به مقدار کم توسعه یافته با دیواره نازک است. یاخته‌های دیپلوئید بافت خورش در این نمونه، کروی شکل و فشرده است (شکل ۱۱). از نکات متمایزکننده در این نمونه وجود پوستامنت در خورش است (شکل ۱۱). پوستامنت بافتی با خاستگاه خورشی است که

رخ داده، موجب تشکیل کیسه‌روییانی بالغ می‌شود. پدیده یاخته‌ای شدن کیسه‌روییانی همزمان با مهاجرت هسته‌های قطبی صورت می‌گیرد. سه یاخته در قطب مجاور سفت دستگاه تخم را ایجاد می‌کند (شکل ۱۰)، که شامل یک یاخته میانی (تخم‌زا) و دو یاخته کناری قرینه‌ها (سینرژیدها) است (شکل ۱۰).

یاخته تخم‌زا کروی شکل بوده، به واسطه استقرار یک هسته درشت در قطب بُنی خود قابل تشخیص است و دو یاخته سینرژید کشیده و گلابی‌شکل‌اند (شکل ۱۰). در قطب بُنی یاخته‌های آنتی‌پود به وجود می‌آید (شکل ۱۱). دو هسته قطبی جدا شده از قطب‌های سُفتی و بُنی در قسمت مرکزی کیسه‌روییانی قرار می‌گیرند و یاخته مرکزی را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۰).

در *I. aucheriana* یاخته‌های آنتی‌پود افزایش پیدا نمی‌کند و تعداد آنها از سه سلول تجاوز نمی‌کند و تا زمان تشکیل رویان از بین نمی‌روند (شکل ۱۱). آنتی‌پودها یا یاخته‌های قطب بُنی کوچک‌ترین یاخته‌های کیسه‌روییانی هستند و در این گونه گیاهی به صورت خطی در قطب بُنی ردیف می‌شوند (شکل ۱۱). دو هسته قطبی (یاخته مرکزی) به تدریج به سمت دستگاه تخم مهاجرت کرده، به طور معمول دو هسته قطبی نزدیک هم قرار می‌گیرند (شکل ۱۰). در این نمونه دو هسته قطبی در مجاورت دستگاه تخم‌زا و بعد از لقاح با هم تلفیق می‌شوند و ایجاد یک هسته ثانوی را می‌کنند که دارای ۲n کروموزوم است. کیسه‌روییانی در این نمونه از نوع پلی‌گونوم، و دوکی شکل منظم است (شکل‌های ۱۰-۱۱).

اولین تقسیم میوزی مگاسپوروسیت موجب تشکیل دو یاخته دیاد هاپلوئید می‌گردد (شکل ۵) و دومین تقسیم میوزی موجب تشکیل چهار یاخته تتراد می‌شود. بررسی تعداد زیادی از برش‌ها نشان داد که تترادها در این گونه از نوع I. aucheriana شکل هستند (شکل ۶). در I. aucheriana نوع از نوع T شکل هستند (شکل ۶). در I. aucheriana وقتی میوز با تشکیل تترادها به پایان می‌رسد، پوسته تخمک حدوداً تمام جسم تخمک را می‌پوشاند (شکل ۶) و این نشان می‌دهد که رشد پوسته‌های تخمک در این نمونه سریع است.

از چهار یاخته حاصل از میوز (تتراد)، سه یاخته تحلیل می‌روند و در این نمونه موقعیت یاخته باقی‌مانده یا مگاسپور عملکردی در ناحیه شالازی قرار گرفته است و در نهایت به کیسه‌روییانی تحول می‌یابد (شکل ۷). هسته یاخته بنیادی کیسه‌روییانی سه تقسیم میتوزی متوالی را انجام می‌دهد. نخستین تقسیم میتوزی، موجب تشکیل دو هسته هاپلوئید جدید شده، کیسه‌روییانی دو هسته‌ای را ایجاد می‌کند (شکل ۸). هر هسته نسبتاً حجیم بوده، دارای هستک یا هستک‌های حجیم و باز دوست است. دومین تقسیم میتوزی نیز موجب پیدایش چهار هسته هاپلوئید و در نتیجه کیسه‌روییانی چهار هسته‌ای می‌شود (شکل ۹). در نهایت، تقسیم سوم، کیسه‌روییانی هشت هسته‌ای را به وجود می‌آورد. در این مرحله کیسه‌روییانی به قدر کافی رشد نکرده است و بنابراین، هسته‌های کیسه‌روییانی به صورت خطی فشرده و نزدیک هم قرار دارند. با رشد طولی کیسه‌روییانی، در بین هشت هسته ذکر شده، واکوئل‌هایی ایجاد می‌شود و در نتیجه، چهار هسته در انتهای سُفتی و چهار هسته در انتهای بُنی قرار می‌گیرند. سپس یاخته‌ای شدن در کیسه‌روییانی

میکروسپورزایی و تکوین دانه گرده در *I. aucheriana*

در این گونه، یاخته‌های بافت هاگ‌زای به وجود آمده از یاخته‌های آرکتوسپور مستقیماً به میکروسپوروسیت تمایز می‌یابند. میکروسپوروسیت‌ها با سیتوپلاسم متراکم، اندازه بزرگ و هسته‌های مشخص با یاخته‌های بافت احاطه‌کننده متفاوتند و در این گونه گیاهی در دو ردیف قرار گرفته‌اند (شکل ۱۴). با شروع میوز، در اطراف میکروسپوروسیت‌ها، کالوز شروع به تشکیل می‌کند که در تصاویر میکروسکوپی تهیه شده به صورت یک لایه ضخیم و شفاف در اطراف میکروسپوروسیت‌ها (شکل‌های ۱۶-۱۹) و تترادها (شکل ۲۰) قابل رؤیت است. با تقسیم میوز I، در یاخته‌های مادر گرده، ابتدا ۲ یاخته n کروموزومی و با تقسیم میوز II، ۴ یاخته n کروموزومی (هاپلوئید) که تتراسپور نام دارد، به وجود می‌آید.

هر میکروسپور از مراحل میوز به طور واضح عبور می‌کند، به طوری که ابتدا وارد پروفاز I شده (شکل ۱۵)، و سپس به ترتیب از مراحل متافاز I (شکل ۱۶)، آنافاز I (شکل ۱۷) و تلوفاز I (شکل ۱۸) عبور می‌کند و به این ترتیب تقسیم اول میوز کامل می‌شود. یاخته‌های هاپلوئید حاصل از میوز I بلافاصله وارد تقسیم دوم میوز می‌شوند و از مراحل متافاز II، آنافاز II و تلوفاز II (شکل ۱۹) عبور می‌کنند که به تشکیل تترادهای میکروسپوری منجر می‌شود. بین هسته‌های حاصل از تلوفاز II دیواره به وجود نمی‌آید (شکل ۱۹). تترادها فقط از نوع تترگونال هستند (شکل ۲۰).

پس از تکمیل میوز II تقسیم سیتوپلاسم به طور همزمان صورت گرفته (سیتوکنیز از نوع همزمان)، چهار یاخته میکروسپور (تتراد) به وجود می‌آید. در این مرحله، دیواره

با توسعه یافتن پوسته پوشاننده خورش، مجرای سُفت به وجود می‌آید که در این نمونه مورد بررسی، مجرای سُفت شکل خطی صاف دارد (شکل ۱۱). یاخته‌های لایه اندوتلیوم به صورت شعاعی امتداد یافته، چسبیده به کیسه رویانی است و دارای هسته‌ای کاملاً واضح و سیتوپلاسمی متراکم است (شکل‌های ۱۰-۱۱) و از پایداری زیادی برخوردارند؛ به طوری که در زمان تشکیل رویان نیز حضور دارند. در هر تخمدان یک عدد تخمک وجود دارد (شکل ۱۱).

از نکات متمایزکننده در این نمونه، حضور کریستال‌های سوزنی شکل در سلول‌های اپیدرم مادگی است (شکل‌های ۱۲-۱۳). علاوه بر این، در *I. aucheriana* ضخامت دیواره مادگی بسیار زیاد است و سطح آن پوشیده از کرک‌های تک رشته‌ای تک سلولی بسیار کشیده است (شکل ۱۳).

در مرحله کیسه‌رویانی بالغ، چند ویژگی ارزشمند تاکسونومیک در ۲۰ نمونه مورد اندازه‌گیری و ارزیابی قرار گرفت و میانگین مربوط به آنها محاسبه شد که به این شرح است: میانگین طول تخمدان، عرض تخمدان و ضخامت دیواره تخمدان در این مرحله از نمو به ترتیب ۵۱۵، ۲۲۱/۵ و ۵۵/۵ میکرومتر (μm) اندازه‌گیری شد.

میانگین محور طولی تخمک در این مرحله از نمو حدود $329/5 \mu\text{m}$ ، میانگین محور عرضی تخمک $110/5 \mu\text{m}$ ، میانگین طول بند تخمک $26/5 \mu\text{m}$ و میانگین قطر بند تخمک $30/5 \mu\text{m}$ محاسبه شد. همچنین میانگین محور طولی کیسه رویانی بالغ $76 \mu\text{m}$ و میانگین محور عرضی کیسه رویانی بالغ $16/5 \mu\text{m}$ است.

مادگی تشکیل نشده، پرچم به صورت توده‌ای از یاخته‌های مریستمی تشکیل شده است. پرچم‌ها پنج عدد هستند (شکل ۲۵) و بساک آنها پیوسته است. بساک تتراسپورانژی یا دارای چهار کیسه گرده است (شکل ۲۴). در مراحل اولیه نمو بساک در زیر اپیدرم، ۵ تا ۸ ردیف یاخته آرکتوسپوری تمایز پیدا می‌کند. دیواره بساک در این نمونه متشکل از چهار لایه است که شامل لایه روپوست، لایه مکانیکی، لایه میانی و لایه مغذی است، که تعداد هر یک از این لایه‌ها از یک عدد تجاوز نمی‌کند (شکل ۱۵). از نکاتی که در این نمونه جالب توجه است، حضور کریستال‌های سوزنی شکل در لایه مکانیکی است که باعث شده است این لایه به صورت کنگره‌ای دیده شود (شکل‌های ۲۴-۲۵). ضخیم‌شدگی‌های فیبری لایه مکانیکی در مرحله پایانی نمو دانه‌های گرده دو یاخته‌ای، صورت می‌گیرد. یاخته‌های لایه مغذی یک لایه مشخص را تشکیل می‌دهند که بافت هاگزای بساک را احاطه می‌کند (شکل‌های ۱۴-۱۹). در این گونه یاخته‌های لایه تاپی بیضی شکل و دو هسته‌ای هستند.

از آنجایی که یاخته‌های لایه تاپی در مراحل ابتدایی نمو بساک و دانه‌های گرده در جای خود ثابت باقی مانده، تحلیل نمی‌روند (شکل‌های ۱۴-۲۱) و وقتی که میکروسپورها در حال نمو به دانه گرده بالغ هستند، ضمایی از یاخته‌های تاپی به سمت حفره بساک تشکیل می‌شود (شکل ۲۲)، بنابراین، می‌توان گفت لایه تاپی از نوع ترش‌حی است. در مرحله دانه‌های گرده دو یاخته‌ای، یاخته‌های تاپی تقریباً تحلیل می‌روند (شکل‌های ۲۳-۲۴).

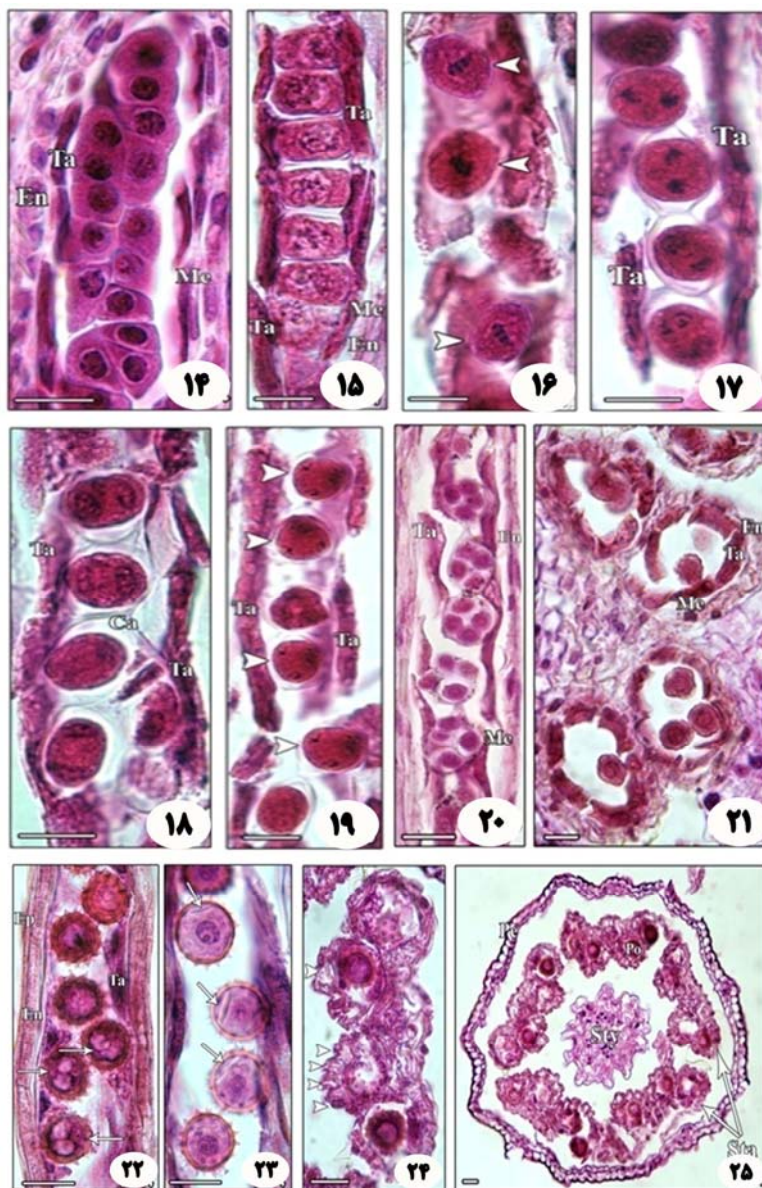
کالوزی در اطراف تتراده‌ها و لابه لای موناها به خوبی مشخص است. میکروسپورها در زمان آزاد شدن هنوز واکوئوله نیست و دارای سیتوپلاسم متراکم، شکل منظم با یک هسته مشخص و قرار گرفته در مرکز یاخته هستند (شکل ۲۱).

اطراف هر میکروسپور را دیواره‌ای آگزینی فرا گرفته است. پس از تحلیل دیواره کالوزی از اطراف تتراسپورها و آزادی میکروسپورهای جوان، دیواره انتین در مجاورت سیتوپلاسم تشکیل می‌شود (شکل ۲۲). در این گونه، سه شیار رویشی بر روی دیواره گرده وجود دارد. با توسعه واکوئل مرکزی، هسته به موقعیت کناری رانده می‌شود؛ یعنی یک واکوئل بزرگ، سیتوپلاسم و هسته دانه گرده را به کناره‌ها می‌راند (شکل ۲۳). سپس، هسته به روش میتوز تقسیم می‌شود و دو هسته نابرابر را به وجود می‌آورد: یک هسته بزرگ رویشی و یک هسته کوچک زایشی که به تشکیل دانه گرده دو هسته‌ای و نهایتاً دو یاخته‌ای منجر می‌شود.

بنابراین، در گونه *I. aucheriana* دانه‌های گرده بالغ آزاد شده از بساک دو یاخته‌ای است، که دانه‌های نشاسته نیز در آنها به چشم می‌خورد. در این دانه‌های گرده، علاوه بر نشاسته، دانه‌های روغنی نیز وجود دارد (شکل ۲۲). در این نمونه، حضور کریستال‌های سوزنی در دانه گرده مشهود است (شکل ۲۳). دانه‌های گرده تقریباً کروی شکل و دارای سه شیار بر روی دیواره گرده است که در محل شیارها آگزین وجود ندارد و انتین ضخیم‌تر است. سطح آگزین پوشیده از تریبینات خار مانند است.

ویژگی‌های تکوینی پرچم در *I. aucheriana*

در این گونه تمایز و تکوین پرچم خیلی زود صورت می‌گیرد؛ به طوری که در مرحله‌ای که هنوز طرح اولیه



شکل ۱۴-۲۵- نشان‌دهنده تکوین پرچم و دانه گرده در *Inula aucheriana* (۱۴) برش طولی از بساک، سلول‌های میکروسپوروسیت که در این نمونه در دو ردیف در برش طولی در بساک قرار می‌گیرند. در این برش به خوبی چهار لایه تشکیل‌دهنده دیواره بساک؛ یعنی تاپی (Ta)، لایه مکانیکی (En)، لایه میانی (Me) و اپیدرم (Ep) دیده می‌شود. (۱۵) برش طولی از بساک که نشان‌دهنده آغاز تقسیم میوز (پروفاز I) در یاخته‌های مادر گرده است. (۱۶) مرحله متافاز I (۱۷)، آنافاز I (۱۸)، تلوفاز I (۱۹)، تلوفاز II (۲۰)، برش طولی بساک در مرحله تتراد میکروسپور. تتراد فقط از نوع تتراگونال است. (۲۱) برش طولی بساک در مرحله میکروسپورها (گرده‌های جوان) رها شده از تتراد. شکل میکروسپورها منظم و هسته منفرد آنها قابل مشاهده است. لایه مغذی هنوز از بین نرفته است. (۲۲) در دانه‌های گرده جوان تشکیل دیواره خارجی (اگزین) مشهود است. دانه‌های گرده حاوی قطرات روغنی بزرگ (↑) و دانه‌های نشاسته هستند. (۲۳) دانه گرده بالغ حاوی کریستال‌های سوزنی شکل (↑) و اگزین دارای خارهای درشت است. (۲۴) لایه تاپی به طور کامل تحلیل رفته است. لایه مکانیکی به علت حضور کریستال کنگره‌ای دیده می‌شود (↑). (۲۵) برش عرضی گل نشان‌دهنده بساک با چهار کیسه گرده (تتراسپورانژی) در مرحله دانه‌های گرده بالغ. شاخص معادل ۳۰ میکرومتر است.

ep: اپیدرم؛ en: لایه مکانیکی؛ Ta: تاپی؛ Me: لایه میانی؛ Ca: لایه کالوز؛ pe: گلبرگ‌ها؛ Sta: بساک؛ Po: دانه گرده؛ Sty: خامه؛ pm: یاخته مادر گرده؛ sta: پرچم؛ ta: لایه مغذی.

بحث و نتیجه‌گیری

تخمک و گامتوفیت ماده

نتایج این مطالعه نشان داد که در هر تخمدان فقط یک تخمک واژگون کم خورش وجود دارد. در لایه زیر اپیدرمی تخمک فقط یک یاخته آرکئوسپوری وجود دارد که با پیشرفت رشد و تکوین تخمک، مستقیماً به یاخته مادر مگاسپور تمایز می‌یابد. موقعیت زیر اپیدرمی یاخته مگاکامتوسیت در سایر گیاهان این تیره نیز گزارش شده است (Johri *et al.*, 1992). موقعیت مگاسپوروسیت در این نمونه در لایه سوم زیر اپیدرمی قرار گرفته است که با گزارش قبلی از گونه دیگر این جنس مغایر است (Yurukova-Grancharova *et al.*, 2006).

مطالعه بر روی مگاسپورانژ نشان می‌دهد که شکل تترادها در این تیره دارای تنوع بسیار زیادی است. نتایج این پژوهش نشان داد در گونه مورد مطالعه تتراد مگاسپورها از نوع T شکل است. مگاسپور شالازی تتراد که به وسیله دیواره کالوزی پوشیده نشده است، موجب تشکیل کیسه رویانی مونوسپوری تیپ پلی‌گونوم می‌شود و سه مگاسپور دیگر به سرعت از بین می‌رود. وجود تترادهای خطی در گیاهان این تیره به وسیله پژوهشگران متعددی گزارش شده است (Rangaswamy and Pullaiah, 1986; Lakshmi and Pullaiah, 1979; Kapil and Bhatnagar, 1981) اما وجود تتراد T شکل یک حالت نسبتاً نادر است. مگاسپور پایا، کیسه رویانی هشت هسته‌ای را به وجود می‌آورد که سپس به کیسه رویانی بالغ تمایز می‌یابد. در کیسه رویانی بالغ سه یاخته در مجاورت سُفت تمایز می‌یابند که شامل یک تخمزا و دو یاخته قرینه است. در این مطالعه، هر دو

یاخته قرینه در کیسه رویانی بالغ قابل مشاهده است. دو هسته آزاد قطبی در بخش میانی کیسه رویانی قرار دارند که به سمت دستگاه تخم مهاجرت می‌کنند که تلفیق آنها در مجاورت دستگاه تخم و قبل از لقاح صورت می‌گیرد و باعث تشکیل هسته ثانویه می‌شود. در این گیاه، تقسیمات تخم ضمیمه قبل از تخم اصلی آغاز می‌شود. در کیسه رویانی تیپ پلی‌گونوم، یاخته‌های آنتی‌پود در قطب مقابل دستگاه تخم قرار دارند که معمولاً سه عدد هستند و از نظر اندازه (Maheshwari, 1950; Xiao and Yuan, 2006; Cameron and Prakash, 1994) و همچنین از نظر تعداد (Rangaswamy and Pullaiah, 1986)، در گونه‌های مطالعه شده این تیره تنوع نشان داده‌اند. اندوتلیوم در این گونه یک لایه‌ای است همان طور که قبلاً برای گونه *Inula cuspidate* نیز گزارش شده است (Sood and Neelam, 2000). از ویژگی‌های گونه مورد مطالعه، حضور کریستال‌های سوزنی شکل در سلول‌های اپیدرم مادگی است که برای اولین بار گزارش می‌شود. براساس مطالعات مرجع‌شناختی ما وجود کریستال از سین‌آپومورفی‌های عمده در طایفه Inuleae است (Judd *et al.*, 1999). همچنین Meric (۲۰۰۹) حضور کریستال‌های اگزالات کلسیم را در قسمت‌های مختلف گیاهان این طایفه نشان داده است. از نکات جالب توجه دیگر این است که در *J. aucheriana*، در سطح مادگی کرک‌های تک رشته‌ای تک سلولی بسیار کشیده دیده می‌شود که به فراوانی در سطح مادگی پراکنده‌اند.

بساک و دانه گرده

در گونه مورد مطالعه، نمو چهار لایه‌ای دیواره بساک بر اساس تیپ دو لپه‌ای انجام می‌گیرد (Davis, 1964). یاخته‌های آرکنوسپوری با سیتوپلاسم متراکم و هسته حجیم خودشان قابل تشخیص‌اند. این یاخته‌ها به صورت مماسی تقسیم شده، یاخته جداری بیرونی و هاگزای درونی را تشکیل می‌دهند (Xue and Li, 2005). ضخیم شدگی‌های فیبری لایه مکانیکی با مشاهدات میکروسکوپی به خوبی قابل تشخیص نیست (Yurukova-Grancharova, et al., 2006). بر اساس نتایج ما در گونه مورد مطالعه، لایه میانی نمو پیدا می‌کند و بساک دارای چهار لایه است که با برخی گزارش‌های قبلی همسو است: Sood و Neelam (۲۰۰۰) با بررسی گونه *Inula cuspidate* Pullaiah و (۱۹۷۹) با مطالعه روی تعدادی از جنس‌های طایفه *Inuleae* وجود چهار لایه بساک را برای این گونه‌ها گزارش کرده‌اند. همبستگی آشکاری بین تقسیمات میوزی در یاخته‌های مادر گرده و نمو لایه تاپی بساک وجود دارد که برای سایر گونه‌های این تیره نیز گزارش شده است (Steil, 1950). یاخته‌های لایه تاپی درجه بالایی از پلویدی را نشان می‌دهند که نمایانگر فعالیت متابولیسمی بالای آنهاست و از این نظر شبیه به یاخته‌های آنتی‌پود کیسه رویانی هستند (Maheshwari, 1950). در نهاندانگان دو تیپ اصلی نمو لایه تاپی بساک قابل تشخیص است (Pacini et al., 1985): ترشچی (جداری) و آمیبی (periplasmodial).

در گیاه مورد مطالعه، لایه تاپی از نوع ترشچی است که در آن تکثیر هسته‌ها صورت گرفته، و تعداد هسته‌ها در هر یاخته به دو یا سه افزایش می‌یابد. لایه تاپی آمیبی برای

گونه‌های متعددی از تیره Asteraceae گزارش شده است (Lakshmi and Pullaiah, 1979)، که با نتایج ما همسویی ندارد. در گیاه مورد مطالعه، یاخته‌های اولیه هاگزا مستقیماً به یاخته‌های مادر گرده تمایز پیدا می‌کنند که به صورت دو ردیفه در بخش میانی بساک استقرار دارند. گونه‌های معدودی وجود دارند که استقرار یک ردیفه یاخته‌های مادر گرده را از خود نشان دهند (Hu, 1982). متأسفانه، هنوز اهمیت استقرار یک یا چند ردیفه یاخته‌های مادر گرده از نظر تبارزایی گیاهی ناشناخته است (Pan et al., 1997). میوز در هر میکروسپورسیت به تشکیل تتراد منجر می‌شود. تترادها فقط از نوع تتراکونال هستند. وجود تترادهای تتراهدال و صلیبی شکل نیز در گیاهان تیره Asteraceae گزارش شده است (Maheshwari, 1950). تکوین میکروسپوره‌های همه کیسه‌های گرده همجوار، همزمان است. میکروسپورها در زمان آزاد شدن از تترادها هیچ واکنشی نداشته، دارای یک سیتوپلاسم متراکم، شکل منظم با یک هسته حجیم قرار گرفته در بخش میانی هستند. هسته‌ها با روش میتوز تقسیم شده و دو هسته نابرابر را به وجود می‌آورند که هسته بزرگتر رویشی و هسته کوچک‌تر زایشی است. بنابراین، دانه گرده دو هسته‌ای و سپس دانه گرده دو یاخته‌ای تشکیل می‌شود. نتایج پژوهش‌های Sood و Neelam (۲۰۰۰) نشان داده است که دانه‌های گرده در این جنس، در مرحله بلوغ سه یاخته‌ای‌اند که با یافته‌های ما متفاوتند. دانه‌های گرده بالغ دارای ذرات نشاسته و قطرات روغنی هستند. دانه‌های گرده گونه مورد مطالعه، واجد کریستال‌های سوزنی‌شکل نیز هست. یکی از ویژگی‌های شاخص گونه مورد مطالعه، حضور کریستال در

گونه *Helianthus annuus* و Meric (۲۰۰۹) در برخی گونه‌های طایفه Inuleae گزارش کرده‌اند.

لایه مکانیکی بساک است که باعث شده است اپیدرم در این گونه کنگره‌دار دیده شود. Meric و Dane (۲۰۰۴) نیز حضور کریستال‌های سوزنی شکل اگزالات کلسیم را در

منابع

- Batygina, T. B. (1987) Embryology of flowering plants: terminology and concepts. Science Publishers, New York.
- Bremer, K. (1994) Asteraceae, Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, Oregon.
- Cameron, B. G. and Prakash, N. (1994) Variations of the megagametophyte in the Papilionoidea. Advances in legume systematic. Structural Botany 6: 97-115.
- Chaudhury, A. M., Koltunow, A., Payn, T., Luo, M., Tucker, M. R., Dennis, E. S. and Peacock, W. J. (2001) Control of early seed development. Annual review of cell and developmental biology 17: 677-699.
- Cichan, M. A. and Palser, B. F. (1982) Development of normal and seedless achenes in *Cichorium intybus* (Compositae). American Journal of Botany 69: 885-895.
- Davis, G. L. (1964) Embryological studies in the compositae: Sporogenesis, gametogenesis, and embryogeny in *Brachycome ciliaris* (Labill.) Less. Australian Journal of Botany 12: 142-151.
- Davis, G. L. (1968) Apomixis and abnormal anther development in *Calotis lappulacea* Benth. (Compositae). Australian Journal of Botany 16: 1-17.
- Crawford, D. J., Tadesse, M., Mort, M. E., Kimball, R. T. and Randle, C.P. (2009) Coreopsidae (eds. Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T. F. and Bayer, R. J.) 713-730. International Association of Plant Taxonomy, Washington D.C.
- Harling, G. (1951) Embryological studies in the Compositae: Anthemideae-Chrysantheminae. Acta Horticulture Bergiani 16: 1-56.
- Hind, D. J. N. (1995) Compositae (ed. Stannard, B. L.) 187-278. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Hu, S. Y. (1982) Embryology of angiosperms. High Education Press, Beijing.
- Johri, B. M., Ambegaokear, K. and Srivastava, P. S. (1992) Comparative embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Germany.
- Judd, W. E. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. and Stevens, P. F. (1999) Plant systematic: a phylogenetic approach. Massachusetts, USA.
- Kadereit, J. W. and Jeffrey, C. (2007) Flowering plants vol. VIII. Eudicots. Asterales. Springer-Verlag Press, Berlin Heidelberg.
- Kapil, R. N. and Bhatnagar, A. K. (1981) Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. Cytology 70: 291-337.
- Khan, A. L., Gilani, S. A., Fujii, Y. and Watanabe, K. N. (2008) Monograph on *Inula britannica* L. Mimatsu Corporation, Tokyo.
- Lakshmi S. P. and Pullaiah T. (1979) Embryology of *Senecio tenuifolius* Burm. f. (Asteraceae). Taiwan 32: 208-213.
- Maheshwari, P. (1950). An introduction to the embryology of angiosperms. McGraw-Hill, New York.
- Maoz, M., Kashman, Y. and Neeman, I. (1999) Isolation and identification of a new antifungal sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. Planta Medica 65:281-282.
- Meric, C. and Dane, F. (2004) Calcium oxalate crystals in floral organs of *Helianthus annulus* L. and *H. tuberosus* L. (Asteraceae). Acta Biologica Szegediensis 48:19-23.
- Meric, C. (2009) Calcium oxalate crystals in some species of the tribe Inuleae (Asteraceae). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 51:

- 105-110.
- Pacini, E., Franchi, G. G. and Hesse, M. (1985) The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematic and Evolution* 149: 155-185.
- Pan, K. Y., Wen, J. and Zhou, S. L. (1997) Embryological study on *Mosla chinensis* (Lamiaceae). *Acta Botanica Sinica* 39: 111-116.
- Pandey, B. P. (2001) A textbook of botany, Angiosperms. Taxonomy, anatomy, embryology (including tissue culture) and economic botany. McGraw-Hill, New York.
- Pullaiah, T. (1979) Studies in the Embryology of Compositae. IV. The Tribe Inuleae. *American Journal of Botany* 66:1119-1127.
- Rangaswamy, V. and Pullaiah, T. (1986) Studies in the embryology of *Senecio candicans* DC. (Compositae). *Journal of Indian Botanical Society* 65: 509-512.
- Richards, A. J. (1997) Plant breeding systems. Chapman and Hall, New York.
- Shamrov, I. (1998) Ovule classification in flowering plants - new approach and concepts. *Botanische Jahrbucher fur Systematik* 120: 377-400.
- Sood, S. K. and Neelam, K. (2000) Investigations on embryology of *Inula cuspidata* Clarke (Asteraceae). *Journal of Indian Botanical Society* 79: 93-95.
- Steil, W. N. (1950) Some Evidences for the Interaction of Tapetal and Sporogenous Cells in Certain Vascular Plants. *Botanical Gazetti* 111: 300-306.
- Torrell, M., Bosch, M., Martin, J. and Vallès, J. (1999) Cytogenetic and isozymic characterization of the narrow endemic species *Artemisia molinieri* (Asteraceae, Anthemideae): Implications for its systematic and conservation. *Canadian Journal of Botany* 77:51-60.
- Vallès, J., Garnatje, T., Garcia, S., Sanz, M. and Korbkov, A. A. (2005) Chromosome numbers in the tribes Anthemideae and Inuleae (Asteraceae) from Kazakhstan. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 77-85.
- Vallès, J., Torrell, M., Garcia-Jacas, T., Yilatersana, N. and Susanna, A. (2003) The genus *Artemisia* and its allies: phylogeny of subtribe Artemisineae (Asteraceae) based on nucleotide sequence on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Plant Biology* 5: 274-278.
- Watanabe, W. (2002) Index to chromosome numbers in Asteraceae. Retrieved from <http://www-asteraceae.cla.kobe-u.ac.jp/index.html>. On 15 Aug 2008.
- Xiao, D. X. and Yuan, Z. (2006) Embryogenesis and seed development in *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae). *Journal of Plant Research* 119: 163-166.
- Xue, C. Y. and Li, D. Z. (2005) Embryology of *Megacodon stylophorus* and *Veratilla baillonii* (Gentianaceae): descriptions and systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 317-331.
- Yeung, E. C. (1984) Histological and histochemical staining procedures. (ed. Vasil, I. K.) 689-697. Academic Press, New York.
- Yurukova-Grancharova, P., Robeva-Davidova, P. and Vladimirov, V. (2006) Study on the embryology and mode of reproduction of selected diploid species of *Hieracium* (Asteraceae) from Bulgaria. *Flora* 201: 668-675.
- Zhao, Y. M., Zhang, M. L., Shi, Q. W. and Kiyota, H. (2006) Chemical constituents of Plants from the Genus *Inula*. *Chemical Biodiversity* 3: 371-384.

Study on the developmental stages of ovule and pollen grains of *Inula aucheriana* DC.

Abdolkarim Chehregani rad*, Somayeh Hajisadeghian and Fariba Mohsenzadeh

Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan

Abstract

In this research, developmental stages of ovule and pollen grains of *Inula aucheriana* were studied. The flowers and buds, in different developmental stages, were removed, fixed in FAA₇₀, stored in 70% ethanol, embedded in paraffin and then sliced at 7-10 μm by microtome. Staining was carried out with PAS and contrasted with Hematoxylin. The results indicated that anthers were tetra-sporangiate and anther tapetum type was as secretory type one. Pollen tetrads were tetragonal. Pollen grains, when shed had three colpi and needles on the surface. Ovule was anatropous, unitegmic and tenuinucellate. Endothelium was uni-seriate. Endothelium layer was composed of monolayer cells. Embryo sac development was of monosporic and *Polygonum* type. The shape of megaspore tetrads was both tetrahedral and T-form. Functional megaspore was the chalazal one. Embryo sac was very small at the beginning of development, so that their nuclei were arranged as linear, but its size was increased in later of development. Antipodal nuclei were massive and exhibited polyploidy. Results of this research showed the presence of needle formed crystals in the epidermal cells of ovary that was species specific characteristic. On the outer surface of ovary long, filamentous and one-celled trichoms were visible.

Key words: Pollen grain, Ovule, Megasporogenesis, Microsporogenesis, Asteraceae,

Inula aucheriana

* Correspong Author: chehregani@basu.ac.ir