

بررسی ساختار تشریحی و تکوینی بساک و عکس‌های الکترونی دانه‌های گرده *Chrysanthemum morifolium* L.

مهین قائمی*^۱، احمد مجد^۲

^۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۹

چکیده

بررسی تکوین و مورفولوژی گرده گل داوودی، در موارد مختلفی، از جمله، مطالعات آلرژی زایی آن مفید است. بدین منظور، از برش‌های میکروتومی و میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده گردید. نتایج نشان داد که در زیر اپیدرم بساک، لایه‌های مکانیکی، میانی و تغذیه‌ای تشکیل می‌شوند. پس از میوز سلول‌های مادر گرده و تشکیل سلول‌های تترادی، دیواره کالوزی تحلیل می‌رود. پس از تجزیه سلول‌های لایه تغذیه‌ای، ترشحات آنها به درون کیسه بساک رها می‌گردند. سپس میکروسپورهای جوان با شکل نامنظم و اندازه کوچکتر از یکدیگر جدا می‌شوند. ابتدا اگزین اولیه تشکیل و برای اینکه به گرده بالغ و رسیده تبدیل شوند، سلول‌های لایه مغذی از محل اولیه خود جدا شده، لا به لای میکروسپورها قرار می‌گیرند. سپس اگزین ضخیم و انتین اطراف دانه گرده را می‌پوشاند. لایه مکانیکی در زیر اپیدرم جزء در محل شکافتگی باقی می‌ماند. دانه‌های گرده رسیده در درون بساک‌های هر گلچه قرار دارند. گرده‌ها به صورت موند یا مجتمع می‌باشند. از نظر شکل و اندازه حالت دی مورفسم دارند. تزئینات و برجستگی‌های سطح اگزین گرده خار مانند است و کل سطح گرده را پوشش می‌دهند و اندازه‌ای بین ۲۳ تا ۳۲ میکرومتر دارند. به علاوه، تزئیناتی به شکل ناهمواری و منافذ ریز، در سطح گرده قرار دارند که حمل‌کننده انواع آلودگی‌های معلق در هوا می‌باشند.

واژگان کلیدی: بساک، برش‌های میکروتومی، تکوین دانه گرده، گیاه داوودی، میکروسکوپ الکترونی

مقدمه

رسوبی؛ شناخت نوع و علل آلرژی زایی دانه‌های گرده در انسان و حیوان؛ تشکیل بانک حفظ گرده‌های گونه‌های کمیاب؛ تشخیص ارزش غذایی و مرغوبیت گرده‌ای برای نگهداری دانه‌های گرده، تشکیل دو رگه‌های گیاهی و عسل؛ مطالعه بوم‌شناسی حال و گذشته و شناخت جغرافیای گذشته زمین؛ تشخیص مخازن نفت و ذغال سنگ؛ مورد استفاده در باستان‌شناسی و تشخیص مراکز تمدن گذشته و... کاربرد دارند. علم شناخت دانه‌های گرده موجود برای اولین بار توسط Zandr از آلمان، Alte و Martind از

مطالعه تکوین دانه‌های گرده و گرده‌شناسی امکان داده است که با توجه به ویژگی‌های تکوینی و ریخت‌شناسی بتوان نوع گیاه مولد آن و حتی جایگاه و اهمیت آن را در رده بندی و تقسیمات گیاه‌شناسی مشخص کرد و خویشاوندی جنس‌ها و حتی گونه‌ها را مورد بررسی دقیق قرار داد. علاوه بر این، گرده‌شناسی در مواردی چون دیرین‌شناسی (پالئوتولوژی)؛ چینه‌شناسی و اطلاعات مربوط به سن نسبی لایه‌های

*مسئول مکاتبه: ghaemi-m86@yahoo.com

رنگ‌آمیزی قرار گرفتند و با گذشتن از مراحل زیر عمل رنگ آمیزی انجام گرفت:

پارافین زدایی، این عمل بوسیله گزین به مدت ۴۰ دقیقه انجام گرفت. آب دهی نمونه‌ها با درجات الکلی رو به کاهش (۳۰، ۵۰، ۷۵، ۹۶ و ۱۰۰) هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه و در نهایت استفاده از آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. رنگ آمیزی با همتوکسیلین، در این مرحله از رنگ همتوکسیلین به مدت ۸ دقیقه استفاده شد و سپس تثبیت رنگ توسط آب جاری به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید (کلر موجود در آب جاری، برای رنگ به عنوان دندان عمل می‌کند و به تثبیت آن کمک می‌کند). لام‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی با ائوزین، ابتدا لام‌ها در اتانول ۵۰ و ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه آب‌گیری شدند و سپس در ائوزین الکلی ۷۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفتند (ائوزین سیتوپلاسم را به رنگ صورتی در می‌آورد). آب‌گیری از نمونه‌ها در اتانول‌های ۹۰ و ۱۰۰ درصد، هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. شفاف کردن نهایی، این مرحله با قرار دادن لام‌ها در تولوئن خالص به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس پس از چسباندن لام، لام‌ها، با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و عکسبرداری قرار گرفتند.

مشاهده ساختار گرده‌های بالغ گل داوودی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

برای مطالعه دانه‌های گرده با میکروسکوپ الکترونی نگاره ساخت شرکت فیلیپس (Philips) از کشور هلند و مدل XL30 عکس‌الکترونی تهیه گردید، در ابتدا، گرده‌ها با آون آب‌گیری شدند سپس به وسیله دستگاه خشک کننده نقطه بحرانی با دی اکسید کربن خشک شدند و پس از چسباندن بر روی پایه‌های آلومینیومی به وسیله واحد پوشش دهنده طلا پوشش دهی شدند سپس با

سویس و Hodges از انگلستان مطرح گردید. محققانی مانند Louveaux و Maurizio نیز تحقیقات گسترده‌ای را در زمینه گرده‌شناسی کشورهای اروپایی انجام داده‌اند (Jafari and Karimi, 2006). از آنجایی که گیاه داوودی گل‌های زینتی دارد و از گیاهان آلرژی زا محسوب می‌گردد (قائمی و همکاران، ۱۳۸۹). در این بررسی چگونگی تکوین دانه‌های گرده و بررسی‌های ساختاری گرده‌های آن می‌تواند در مطالعات آلرژی زایی این گیاه مفید باشد

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی مراحل تکوین دانه‌های گرده، نمو بساک و بررسی ساختار دانه‌های گرده گل داوودی در فصل پاییز، از روش‌های زیر استفاده شد:
برش‌های میکروتومی

ابتدا بساک‌های موجود در مراحل مختلف رشد، پس از شستشوی اولیه به مدت ۲۴ ساعت در فیکساتور FAA (اتانول ۸۰ درصد، فرمالین ۱۵ درصد و اسیداستیک ۵ درصد) تثبیت شدند. پس از طی مدت لازم برای عمل تثبیت، به‌منظور از بین بردن اثرات فیکساتور، نمونه‌ها به مدت زمان تثبیت در آب جاری قرار داده شدند. پس از این مرحله نمونه‌ها ۲ تا ۳ بار با آب مقطر شستشو شدند.

برای آب‌گیری، نمونه‌ها در محلول اتانول با درجه‌های رو به افزایش ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس طی شفاف‌سازی ماده تولوئن به تدریج جانشین اتانول موجود در بساک‌ها گردید. پارافین به تدریج وارد سلول‌ها گردید و تولوئن از آنها خارج گردید. برای انجام عمل قالب گیری، قالب‌های واجد نمونه از پارافین مذاب ۶۰-۶۲ درجه سانتی‌گراد پر شدند. برش‌گیری توسط میکروتوم به ضخامت ۸-۱۲ میکرومتر انجام گرفت. برای رنگ‌آمیزی لام‌های آماده درون جار مخصوص

میکروسکوپ الکترونی نگاره متصل به کامپیوتر مورد مطالعه و عکس برداری قرار گرفتند.

نتایج

مراحل تکوین بساک و دانه‌های گرده گل داوودی

در هر پرچم موجود در گل‌های لوله‌ای کپه، در مراحل آغازی نمو بساک، یک لایه پیرامونی و یک توده‌هاگزای درونی در زیر اپیدرم به وجود می‌آید. ضمن ادامه تمایز، لایه‌های دیواره‌ای بساک شامل لایه مکانیکی (EI)، لایه میانی یا گذر (عمر کوتاه دارد)، لایه تغذیه‌ای (T) در زیر اپیدرم تشکیل می‌شوند (شکل 2A). در شکل 2B، سلول‌های مادر گرده در برش هر کیسه گرده دیده می‌شوند و پس از میوز I و II سلول‌های تترادی ایجاد می‌گردند. مطابق با شکل 2A، از آغاز میوز دیواره ویژه بر روی سلول‌های مادر در حال تقسیم تشکیل می‌گردد و پس از ایجاد تترادها کم کم شروع به تحلیل می‌کند. ضمن این مراحل سلول‌های لایه تغذیه‌ای واکوئل دار شده و در مرحله میوز II و تتراد، دیواره داخلی (مماسی) آنها تجزیه می‌شود تا بتوانند ترشحات و محتویات خود را به درون کیسه بساک رها کنند. دیواره کالوزی اطراف تتراسپورها به تدریج تجزیه می‌شود و میکروسپورهای جوان دارای هسته از یکدیگر جدا می‌شوند.

مطابق با شکل 2B، میکروسپورهای جوان در حال تکوین کم و بیش شکل نا منظم و نسبتاً اندازه کوچکتر دارند و این در حالی است که اگزین اولیه بر سطح آنها تشکیل شده است و برای اینکه به گرده بالغ و رسیده تبدیل شوند، تغییراتی چون افزایش حجم (رشد سیستم واکوئلی و ماده سازی) و تقسیم میتوزی انجام می‌دهند. در مراحل پایانی تکوین گرده سلول‌های لایه مغزی از محل اولیه خود جدا شده، در لایه لای میکروسپورهای در حال نمو قرار می‌گیرند (لایه مغزی پلاسمودی یا آمیبی) و سرانجام تخریب و

تجزیه می‌شوند و مواد حاصل از تجزیه آنها در فضای کیسه گرده رها می‌شوند، اگزین ضخیم (Ex) و نیز انتین (In) اطراف هر دانه گرده را می‌پوشاند (شکل 2B). لایه مکانیکی با سلول‌های دارای تزئینات چوبی در زیر اپیدرم جزء در محل شکافتگی باقی می‌ماند. پس از بلوغ گرده بساک شکافته می‌شود و دانه‌های گرده رها می‌شوند. در شکل 2C، برش عرضی یک کپه رسیده و گلچه‌های آن نشان داده شده که دانه‌های گرده رسیده در درون بساک‌های هر گلچه قرار دارند. شکل 2C، دانه‌های گرده رسیده را نشان می‌دهد که پوشش گرده ای اطراف آن کامل شده است.

ساختار دانه گرده‌های گل داوودی با میکروسکوپ

الکترونی نگاره (SEM)

طبق بررسی انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) بر روی گرده‌های گل داوودی نتایج زیر بدست آمدند: به علت وجود خارهای نوک تیز در سطح اگزین، دانه‌های گرده بیشتر به حالت چسبیده به هم و مجتمع وجود دارند (شکل 3A). در شکل 3B، لوله گرده از شکاف رویشی خارج شده و رویش یافته است. مطابق با شکل 3B,C، گرده‌های گل داوودی از نظر شکل و اندازه حالت دی مورفیسیم (دو شکلی) نشان می‌دهند و به دو حالت تقریباً سه گوش و اغلب کروی دیده می‌شوند، نوع سه گوش آن بزرگتر از نوع کروی می‌باشد. تزئینات و برجستگی‌های سطح اگزین دانه‌های گرده داوودی به شکل خارهای نوک تیز بوده و کل سطح گرده را پوشش می‌دهند. طرز تجمع گرده‌ها در حالت رسیدگی کامل بساک‌ها به صورت مونا و مجتمع می‌باشد (شکل 3A, B). اندازه دانه‌های گرده بین ۲۳ تا ۳۲ میکرومتر است. علاوه بر خارهای موجود، اگزین دارای تزئیناتی به شکل ناهمواری‌ها و سوراخ‌های ریز می‌باشد که در تمام سطح دانه گرده قرار دارند (شکل 3D).

بحث

سیتوپلاسمی بزرگ (سیتوپلاسم سلول‌های تاپی) در حالت تاپی آمیبی به گرده‌های در حال نمو منتقل می‌شوند و در تغذیه و تنظیم گرده در حال نمو، تشکیل آگزین و انتین دخالت می‌نمایند که با مشاهدات Hsieh (۲۰۰۴) و Furness (۲۰۰۱) هم سویی دارد.

اهمیت سلول‌های تاپی در نمو گرده به وسیله این حقیقت نیز شرح داده می‌شود که نر عقیمی در گیاهان به طور کلی وابسته به ناهنجاری‌های لایه مغذی است. تجزیه پیش رس یا با تاخیر لایه مغذی، فقدان آن، رفتار هسته ای غیر عادی و یا نقص این لایه به طور معمول سبب نر عقیمی ژنتیکی در گیاهان می‌شود که با پژوهش‌های مجد (۱۳۸۳) و Ahmed (۱۹۹۲) هم سویی دارد. در مورد مکانیسم انتقال مواد از لایه مغذی به دانه‌های گرده در حال نمو، اعتقاد بر این است که عوامل زیر دخالت می‌کنند:

قانون انتشار و جنبش براونی، اسکلت سلولی توبولینی و اکتینی، ضربات یا نوسانات لایه مغذی، آبگیری حفره بساک، که سبب چروکیدگی آن می‌شود و در نتیجه سبب انتقال مواد به سمت دانه‌های گرده می‌شود. به علاوه همچنان که حفره آب از دست می‌دهد، نیروهای کشش سطحی عمل کرده، مواد را بین گرده‌ها منتقل می‌نمایند (Dikinson, 2000; Hsieh, 2001; Furness, 2004).

در گل داوودی، تقسیم سیتوپلاسمی از نوع هم زمان بوده و پس از میوز دوم انجام می‌شود. دانه‌های گرده رسیده و بالغ دارای تزئینات خار مانند یا سوزن مانند می‌باشند. جالب توجه است که در این گیاه به دلیل داشتن گل آذین کپه و کوچک بودن گلچه‌ها و بساک‌ها، قطر هر حفره بساک کوچک و تعداد دانه‌های گرده کم می‌باشد (قابل ذکر است که بساک‌ها طویل بوده و در نتیجه تعداد گرده‌ها قابل توجه است که همسو با نتایج Meo و Ajabkhan (۲۰۰۶) است.

به‌طورکلی در گیاهان پس از تبدیل مریستم رویشی به زایشی، با تسهیم در مریستم گل، پریموردیوم‌های پرچمی از بخش‌های سطحی و حاشیه ای مریستم زایشی (مریستم گل) پدیدار می‌شوند. هر پریموردیوم پرچمی توده‌ای از سلول‌های مریستمی و دارای تقسیم‌های میتوزی است. با تقسیم و رشد این سلول‌ها پریموردیوم‌های پرچمی رشد می‌کنند، سپس با اختلاف در سرعت میتوزها و رشد سلول‌های بساک و میله هر طرح اولیه پرچمی از هم مشخص می‌شوند (Scott, 2004; Bots, 2005; Zhu, 2004; Pressman, 2002).

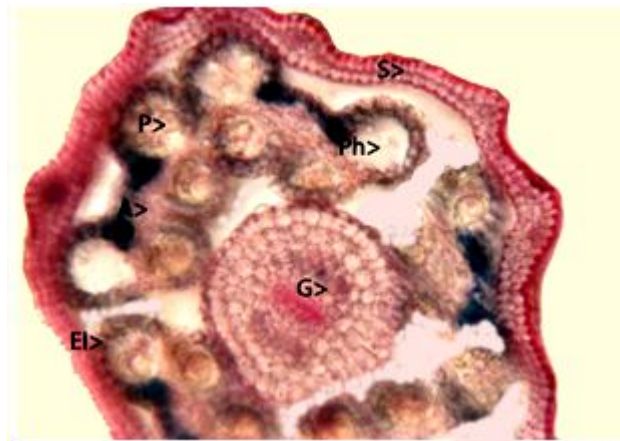
هر پرچم از سه قسمت تشکیل شده است: بساک، رابط و میله؛ بساک‌ها ساختارهای متورم و کشیده هستند که هر یک از چهار کیسه گرده تشکیل شده اند، در داخل آنها دانه‌های گرده تشکیل می‌شوند. در بساک‌های بالغ کیسه‌های گرده دو به دو به هم متصل می‌شوند (Scott, 2004; Bots, 2005). مطالعه نمو بساک در گل داوودی نشان داد که در این گیاه لایه مکانیکی دارای تزئینات چوبی زیاد است، تمام سطوح سلول‌های لایه مکانیکی به جز سطوح خارجی چوبی شده است. در محل شکاف بساک سلول‌های لایه مکانیکی فاقد تزئینات چوبی می‌باشند. Ahmed (۱۹۹۲) نشان داد که تحت شرایط حرارت‌های بالا نمو لایه مکانیکی متوقف می‌شود و بساک‌ها به صورت بسته باقی می‌مانند، بنابراین، لایه در شکافتن بساک دخالت می‌نماید. لایه میانی در مراحل اولیه نمو تحلیل می‌رود.

لایه مغذی نقش مهمی در تکوین و تمایز دانه‌های گرده در حال نمو دارد. مواد حاصل از تجزیه آن به صورت ذرات اوبیش، قطعات غشایی تاپی (۱)، رشته‌های اتصالی (۲)، وزیکول‌های سیتوپلاسمی متراکم یا شفاف در حالت تاپی ترشچی و یا قطعات

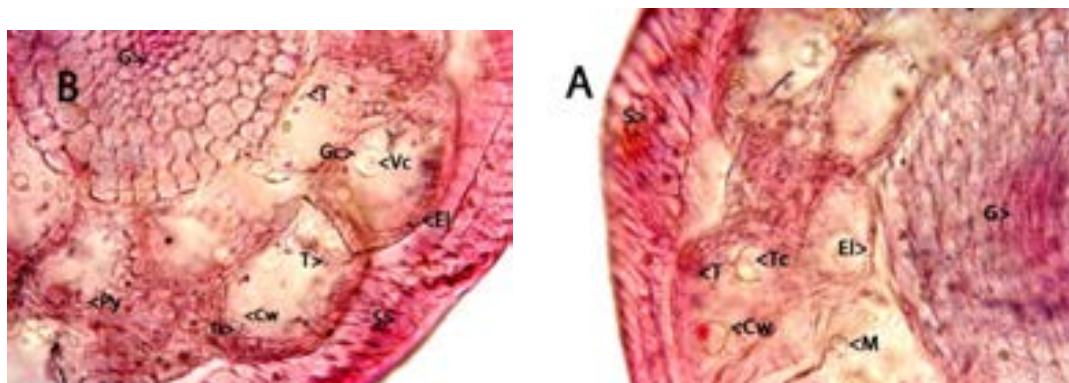
نتیجه‌گیری نهایی

در گل داوودی، تقسیم سیتوپلاسمی از نوع هم زمان بوده، سلول‌های لایه مغزی در بساک در حال تکوین از نوع پلاسمودی یا آمیبی است. دانه‌های گرده رسیده و بالغ دارای تزئینات خار مانند یا سوزن مانند می‌باشند که بیشتر به حالت چسبیده به هم و مجتمع دیده می‌شوند، از نظر شکل و اندازه حالت دی مورفسم نشان می‌دهند. از آنجا که دانه‌های گرده گل داوودی اندازه بین ۲۳ تا ۳۲ میکرومتر دارند و نیز در سطح اگزین خود منافذ ریز بسیار زیادی دارند و با توجه به آلودگی هوای شهرهای بزرگ صنعتی و گسترش زیاد این گل در پارک‌ها و فضای سبز و در نواحی که در مسیر وزش باد هستند، می‌توانند موجب انتقال آلاینده‌ها و گسترش عوارض آلرژیک باشند.

اندازه دانه‌های گرده به‌طور معمول بین ۵ تا ۲۵۰ میکرومتر با یک اکثریت در گستره ۲۰-۵۰ میکرومتر است. مطابق با نظر Embeline (۲۰۰۰) و Jennifer و همکاران (۲۰۰۴) به‌طور معمول دانه‌های گرده‌ای که توسط باد گرده افشانی می‌شوند، کوچکتر هستند که می‌تواند عاملی برای آلرژی‌زایی باشند اما قائمی و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی‌های آلرژی‌زایی گرده‌های گل داوودی، ثابت کردند که گرده‌های این گل نیز با وجود حشره دوست و به نسبت چسبناک و سنگین بودن، آلرژی‌زا است. اندازه دانه‌های گرده یک گونه خاص تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله ذخیره غذایی، شرایط آب و هوایی و آلودگی هوا تغییر می‌نماید. گرده‌ها را از نظر اندازه از گرده‌های بسیار کوچک با اندازه حدود ۱-۲ میکرون، گرده‌های کوچک، متوسط، بزرگ، بسیار بزرگ تا غول آسا با قطر ۲۵۰۰ میکرومتر و بیش از آن تقسیم بندی می‌کنند (Jennifer et al., 2004; Embeline, 2000).

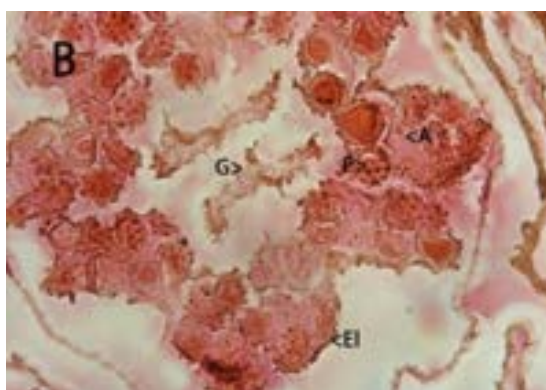


شکل ۱. میکروگراف نوری برش عرضی گلچه و گرده‌های در حال بلوغ (200X)؛ S= جام لوله ای، G= مادگی، El= لایه مکانیکی، Ph= خانه گرده، P= دانه گرده، A= بساک



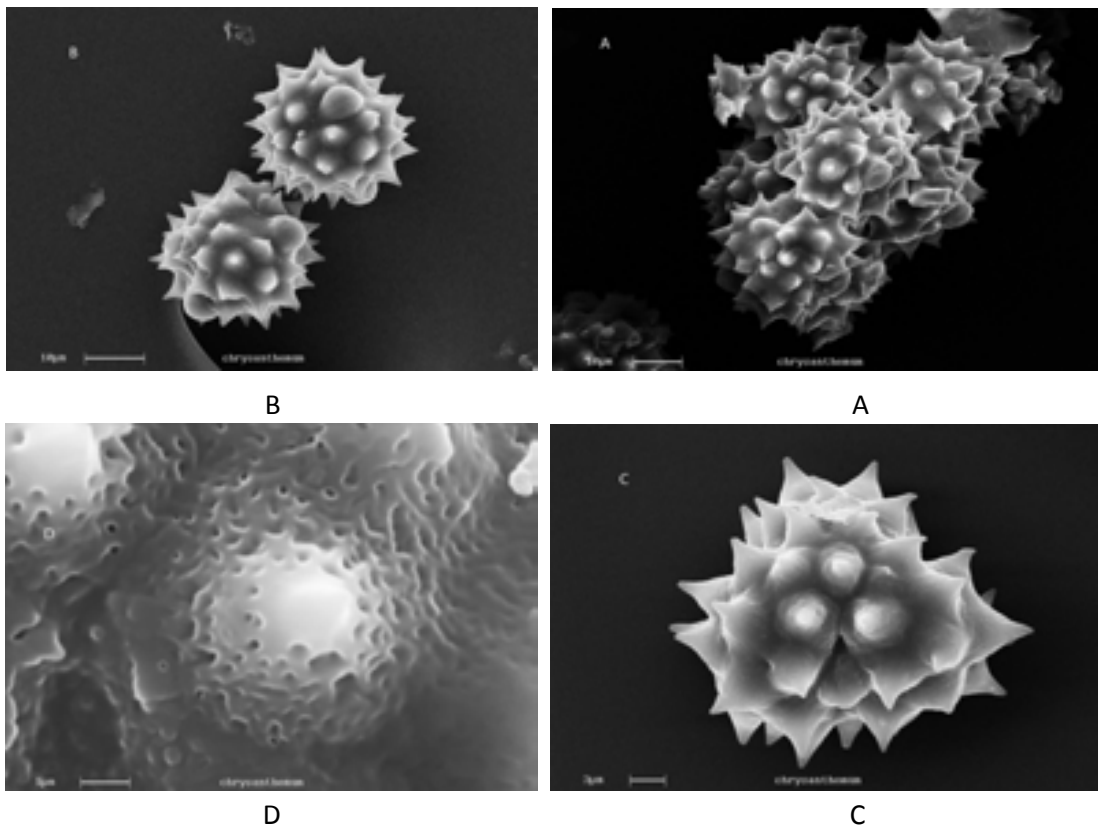
شکل B

شکل A



شکل C

شکل ۲. میکروگراف‌های نوری از برش عرضی بساک در مراحل نموی مختلف (400X)؛ A: دیواره بساک و دیواره کالوزی اطراف تترادهای حاصل از میوز II؛ B: برش عرضی دیواره بساک و دانه‌های گرده جوان (نابلغ) و رسیده (بالغ)؛ S = جام لوله‌ای شکل، G = مادگی، El = لایه مکانیکی، Tc = سلول تترادی، Cw = دیواره ویژه، Ts = تتراسپور، M و Py = میکروسپور نابالغ، T = سلول تایی، Vc = سلول رویشی، Gc = سلول زایشی؛ C: برش عرضی گلچه و بساک‌های رسیده (200X)؛ S = جام لوله‌ای، A = بساک، El = لایه مکانیکی، P = گرده رسیده، G = مادگی



شکل ۳. A: اجتماعی از دانه‌های گرده گیاه *Ch. morifolium* L. (1100X)؛ B: دانه گرده کروی (1500X)؛ C: دانه گرده تقریباً سه گوشه (2000X)؛ D: تزئینات سطح دانه گرده (5000X).

منابع

- Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, k., Kaldenhoff, R. and Mariani, T. (2005).** PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development; *Journal Exp Botany*. 56(409): 113 - 121.
- Dikinson, H.G. (2000).** Pollen coating-chimaeric genetic and new function; *Sex plant Reprod*, 12: 302-309.
- Emberline, J. (2000).** The problem of pollen; *Allergy*, 8: 25-28.
- Furness, C. and Rudall, P. (2001).** The tapetum in basal angiosperms: early diversity; *International Journal of Plant Sciences*, 162: 375-392.
- Hsieh, K. and Huang, A.H.C. (2004).** Endoplasmic Reticulum, Oleosins, and Oils in Seeds and Tapetum Cells; *Plant Physiology*, 136, pp. 3427-3434.
- جعفری، آن.، احمدیان، ر. و زارع حسن آبادی، م. (۱۳۸۵).** ترجمه سیستماتیک گیاهی، گورچاران سینگ، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد چاپ اول، صفحه ۱۹۳-۱۹۱.
- قائمی، م.، مجد، ا.، فهیمی، ح. و قاسمی بزدی، ک. (۱۳۸۹).** ارزیابی آلرژی زایی گرده‌های گل داوودی روی خوکچه هندی. فصلنامه پژوهش‌های گیاهی، شماره پنجم، صفحه ۳۳.
- Ahmed, F.E., Hall, A.E. and Demason, D.A. (1992).** Heat injury during floral development in *vigna unguiculata*; *American Journal of Botany*. 79(7): 784-791.

- Jafari, E. and Karimi. A.H. (1996).** Polynological study of visited medicinal plants by honey bee in Fars province. Research Center for Agricultural & Natural Resources of Fars p.o.Box 71555-617.
- Jennifer, A.T. and Beryl, B.S. (2004).** Breeding system evolution in *Tarasa* (*Malvaceae*) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species; American Journal of Botany. 91: 207-213.
- Meo, A.A., Ajabkhan, M. (2006).** Pollen morphology as an aid to the identification of *Chrysanthemum* species (compositae-anthemideae) from Pakistan. Pakistan Journal Botany. 38(1): 29-41.
- Pressman, E., Peet, M. and Pharr, D.M. (2002).** The Effect of Heat Stress on *Tomato* Pollen Characteristics is Associated with Changes in Carbohydrate Concentration in the Developing Anthers; Annals of Botany, 90: 631-636.
- Scott R., Spielman, J. and Dickinson, H.G. (2004).** Stamen Structure and Function; The plant cell, 16: S46-S60.
- Zhu, Q.H., Ramm, K., Shivakkumar, R., Dennis, E.S. and Upadhyaya, N.M. (2004).** The *Anther Indehiscence* Gene Encoding a Single MYB Domain Protein Is Involved in Anther Development in *Rice*; Plant Physiology, 135, pp. 1514-1525