

تکوین تخمک و مگاکامتوفیت در *Adonis flammea* Jacqu. گزارش سقط تخمک و رویان

عبدالکریم چهرگانی راد. Ph.D. ^{۱*}، فریبا محسن زاده Ph.D. ^۱، سولماز اخطاری M.Sc.Student. ^۲،
سیمین تاجیک اسماعیلی Ph.D.Student. ^۳

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، کد پستی ۶۵۱۷۸۳۸۶۸۳
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳- دانشجوی دکتری زیست شناسی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: chehregani@basu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳

چکیده

هدف: با توجه به اینکه مطالعات کاربردی و مولکولی در Ranunculaceae در حال افزایش است، بررسی و درک تکوین گل در این تیره ضروری است. در این پژوهش مراحل و چگونگی تکوین تخمک در گیاه *Adonis flammea* بررسی شد.

مواد و روش‌ها: گل‌های جوان و غنچه‌ها در مراحل مختلف برداشت، در 70 FAA تثبیت و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از آب‌گیری و قالب‌گیری در پارافین، با میکروتوم برش‌گیری شدند. رنگ آمیزی با PAS و هماتوکسیلین انجام گرفت. لام‌های تهیه شده از مراحل مختلف تکوینی با دقت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و عکسبرداری شدند.

نتایج: نتایج نشان داد تخمک‌ها در *A. flammea* از نوع واژگون، دو پوششی و پرخورش است. مجرای سفت با پوسته درونی تشکیل می‌شود. مگاسپروسیت پس از تقسیم میوز تترادهای با هر دو نوع آرایش خطی و غیرخطی را ایجاد می‌کند. تکوین کیسه رویانی از تیپ پلی‌گونوم پیروی می‌کند. سلول‌های آنتی‌پد پایا هستند که در مرحله اندوسپرم سلولی تحلیل می‌روند. ارتباطات سیتوپلاسمی سلول‌های کیسه رویانی، تحلیل برخی از تخمک‌ها و به‌دنبال آن سقط تخمک و رویان در برخی از موارد مشاهده شدند.

نتیجه‌گیری: الگوهای تکوین تخمک و کیسه رویانی از نهاندانگان و تیپ پلی‌گونوم تبعیت می‌کنند. ولی پایایی آنتی‌پدها، تشکیل کلاهک خورشی، ارتباطات سیتوپلاسمی بین سلول‌های کیسه رویانی و عدم موفقیت در لقاح و سقط رویان در برخی از تخمک‌ها از ویژگی‌های گونه مورد مطالعه است که علت آن می‌تواند عوامل محیطی یا ژنتیکی باشد.

واژگان کلیدی: تخمک، کیسه رویانی، مگاکامتوفیت، *Ranunculaceae Adonis flammea*

مقدمه

تیره آلاله موقعیت فیلوژنتیک برجسته‌ای در راسته Ranunculales دارد و به نظر می‌رسد پایه و اساس گروه بزرگی از دولپه‌ای‌ها (بودایکت‌ها) باشد. این خانواده مجموعه قابل توجهی از ریخت‌شناسی اولیه و پیشرفته را در بر می‌گیرد. از جمله ویژگی‌های رویان شناختی این تیره بدین شرح است: گل‌های منظم یا نامنظم، دوجنس یا تک‌جنس، برچه‌های آزاد یا متصل، برگه‌های چند تخمکی یا فندقه‌های یک تخمکی، تخمک پرخورش یا کم‌خورش، تک پوسته، دو پوسته یا فاقد پوسته، تک‌سپری کیسه رویانی از تیپ‌های Allium و Polygonum پیروی می‌کند، و سلول‌های آنتی‌پود زودگذر یا پایا هستند (۱ و ۲). پلی‌پلوئیدی مکرر در انواع سلول‌های کیسه رویانی نظیر آنتی‌پودها، سینرژیدها، اندوسپرم و سوسپانوسور گزارش شده است (۳ و ۴) و ارتباط آشکاری که میان ساختار این سلول‌ها و طول مدت زمان زندگی‌شان وجود دارد، نقش تغذیه‌ای آن‌ها را پیشنهاد می‌کند (۵). وقوع درون پلوئیدی در سلول‌های آنتی‌پود، در اعضای این خانواده گزارش شده است (۶ و ۷). یکی از جنس‌های این تیره جنس *Adonis* است که به طایفه Ranunculeae از زیر خانواده Ranunculoideae تعلق دارد. براساس مطالعات مرجع شناختی انجام گرفته گزارشی در مورد مراحل تکوین تخمک و کیسه رویانی گیاه مورد مطالعه و به‌ویژه در خصوص سقط تخمک و رویان در این جنس در دسترس نمی‌باشد. هدف این مقاله توسعه مطالعه نحوه تکوین تخمک و کیسه رویانی به‌عنوان یک واحد زایای مهم در *A. flammea* است. به‌علاوه، آشکار ساختن خصوصیات ریخت‌زایی تخمک علاوه بر درک کارایی مکانیسم تولید مثلی، سبب فهم بهتری از رده‌بندی تیره آلاله نیز می‌شود.

مواد و روشها

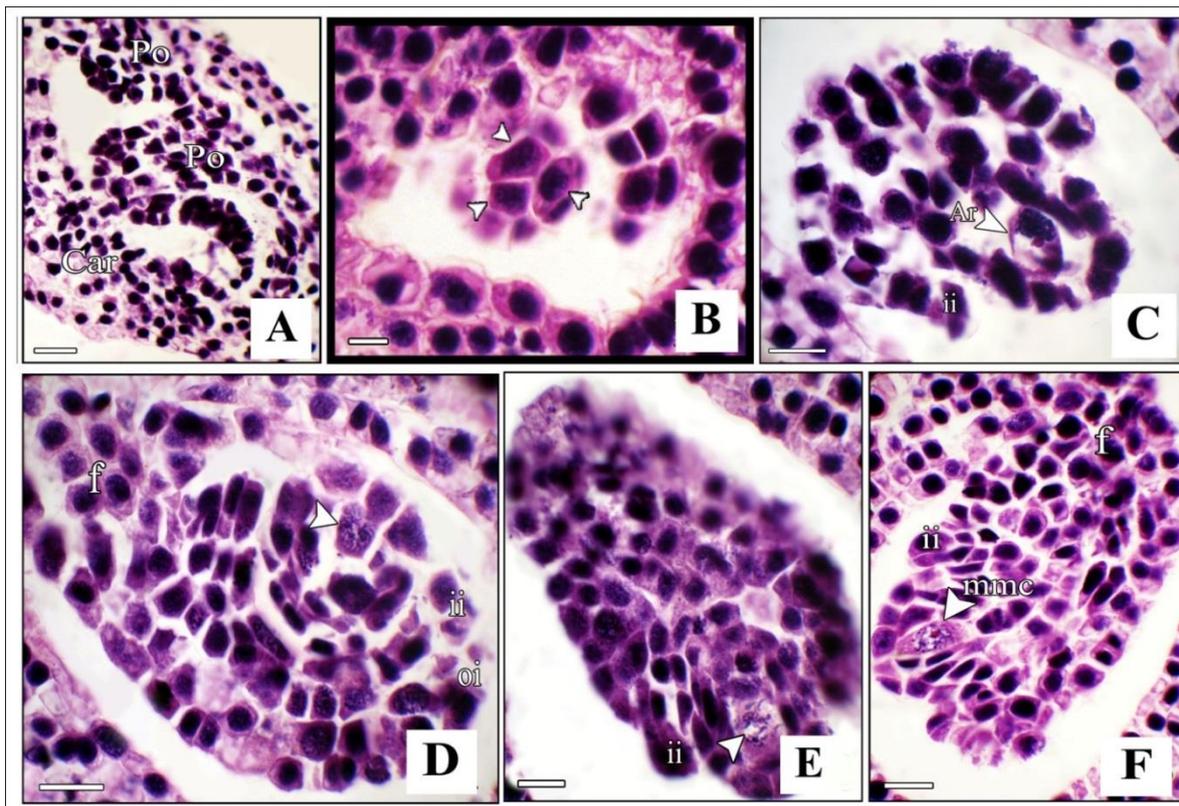
گل‌ها و جوانه‌های گونه مورد مطالعه در اوایل تابستان از زیستگاه‌های طبیعی در همدان، ضلع شرقی کوه الوند، منطقه مجاور امام زاده کوه (امام زاده محسن) (ع) جمع‌آوری شد. گل‌ها و غنچه‌ها در مراحل مختلف تکوین برداشت و جهت تثبیت در FAA₇₀ (Formalin Acetic acid Ethanol) قرار داده شد و سپس در الکل ۷۰ درصد نگه‌داری شدند. پس از قالب‌گیری، نمونه‌ها در قالب‌های پارافین با میکروتوم در اندازه ۷ تا ۱۰ میکرومتر برش‌گیری شدند (۸). شفاف‌سازی نمونه‌ها

مطابق روش Yeung (۹) و رنگ آمیزی مضاعف هسته و سیتوپلاسم به‌وسیله هماتوکسیلین و اتوزین صورت گرفت. نمونه‌های مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری Olympus CX21FS1 (Japan) بررسی شد و عکس‌برداری به کمک دوربین دیجیتال مدل Canon G11 (Japan) انجام گرفت. با مطالعه تعداد زیادی لام تهیه شده مراحل تکوین تخمک و کیسه رویانی مشخص و مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

تکوین تخمک

بر اساس نتایج به‌دست آمده در گیاه مورد مطالعه، استقرار تخمک‌ها در تخمدان از نوع جداری است. بنیان تخمکی پایه‌گرا است و به‌صورت یک برآمدگی گنبدی شکل از سلول‌های قاعده سطح شکمی برچه توسعه می‌یابد. پریموردیوم تخمک دارای ۴ تا ۷ لایه سلولی است (شکل ۱A). پریموردیوم تخمک، خمیدگی را از همان مراحل اولیه آغاز می‌کند (شکل ۱A). در داخل پریموردیوم تخمک، سلول‌های آرکتوسپور به واسطه حجم زیاد، سیتوپلاسم متراکم و هسته بزرگ از بقیه سلول‌های خورش قابل تشخیص هستند (شکل‌های ۱C و ۱B). در پریموردیوم تخمک *A. flammea* چندین سلول آرکتوسپوری وجود دارد که یکی از این سلول‌ها به‌طور مستقیم به سلول مادر مگاسپور تمایز می‌یابد. سلول مادر مگاسپور در *A. flammea* در لایه چهارم زیر اپیدرمی قرار دارد (شکل‌های ۱F و ۱D). پوسته‌ها در قاعده پریموردیوم‌های تخمکی بنیان‌گذاری می‌شوند. ابتدا پوسته درونی و سپس پوسته بیرونی تشکیل می‌گردد. میکروپیل به‌وسیله پوسته داخلی که متشکل از ۲ لایه سلولی است شکل می‌گیرد. پوسته خارجی ضخیم و متشکل از ۴ تا ۵ لایه سلولی است. پوسته‌های تخمک در طرفین جسم تخمک، محل پیدایش نسبتاً متقابل دارند و بنابراین میکروپیل حالت خطی صاف با انتهای داسی شکل دارد (شکل‌های ۴G، ۴F، ۳D). خمیدگی تخمک با واکوئل‌دار شدن و رشد بیشتر سلول‌های جهت‌مقابل به خمیدگی، مشخص‌تر می‌شود (شکل‌های ۲F، ۲C، ۲B، ۱F). با افزایش میزان خمیدگی ضمن رشد، تخمک به حالت کاملاً خمیده در می‌آید و سپس در ضمن تشکیل کیسه رویانی، تخمک واژگون می‌شود. در نتیجه پوسته‌های تخمک در کنار پایه تخمک (فونیکول) قرار می‌گیرند (شکل‌های ۲F و ۱F-۲C). (۱D).



شکل ۱: مراحل اولیه تکوین تخمک و مگاسپوروزن در *A. flammea* (A) بنیان تخمکی که به صورت برآمدگی کوچکی در سطح شکمی تخمدان تشکیل شده و خمیدگی را از همان مراحل اولیه آغاز می‌کند در بعضی برچه‌ها بیش از یک پریموردیوم شکل می‌گیرد ولی تنها یکی از آن‌ها رشد می‌کند؛ (B) بیش از یک سلول آرکتوسپوری در راس خورش شکل می‌گیرد (▲)؛ (C) پیشرفت تقسیمات آرکتوسپور (Ar) به همراه سیتوپلاسم متراکم آن و رشد پوسته؛ (D) متافاز I (▲) در سلول مادر مگاسپور؛ (E) آنافاز I (▲) در سلول مادر مگاسپور؛ (F) حضور سلول مادر مگاسپور (mmc) در لایه چهارم، شاخص ۳۰ میکرومتر. مخففها: ii پوسته درونی؛ oi پوسته بیرونی؛ car برچه؛ Po پریموردیوم تخمکی، f پایه تخمک (فونیکول).

حالتی که هنوز سیتوکینز انجام نشده (شکل ۲A) قابل مشاهده است که پس از سیتوکینز هم دیاد طولی (شکل ۲B) و هم دیاد عرضی (شکل ۲C) مشاهده شد. دومین تقسیم میوزی موجب تشکیل چهار سلول تتراد می‌شود. تترادهای مشاهده شده از نوع خطی طولی و T شکل (شکل‌های ۲E و ۲D) است. از چهار سلول حاصل از میوز (تتراد)، سه سلول تحلیل می‌روند و در این نمونه موقعیت سلول مگاسپور عمل کردی سفتی (میکروپیلی) است (شکل ۲F) که در نهایت به کیسه رویانی تحول می‌یابد. وقتی میوز با تشکیل تترادها به پایان می‌رسد، پوسته تخمک حدود ۳/۴ جسم تخمک را می‌پوشاند. هسته سلول بنیادی کیسه رویانی سه تقسیم میتوزی متوالی را انجام می‌دهد و به ترتیب کیسه رویانی دو هسته‌ای و چهار هسته‌ای را ایجاد می‌کند. در نهایت، تقسیم سوم، کیسه رویانی هشت هسته‌ای را به وجود می‌آورد. در این مرحله پوسته خارجی به حداکثر اندازه خود رسیده است. سه سلول در قطب مجاور مجرای سفت (میکروپیل) دستگاه تخم‌زا را ایجاد می‌کنند. دستگاه تخم‌زا شامل یک سلول میانی تخم‌زا و دو سلول کناری قرینه (سینرژید) است (شکل ۳B).

در این گونه، مادگی با برچه‌های متعدد و آزاد به‌طور ماریپیج و به دنبال استقرار ماریپیچی پرچم‌ها روی نهنج برجسته قرار دارد. برچه‌ها از آغاز کوزه مانند هستند (شکل ۴H). مادگی در نمونه مورد مطالعه، دارای پایک و همچنین کرک از نوع غده‌ای است (شکل‌های ۴C و ۴F). پریموردیوم تخمکی به صورت برجستگی کوچک انگشت مانند دیده می‌شود (شکل B ۱). تعداد این برجستگی‌ها معمولاً دو یا سه عدد می‌باشد که تنها یکی از آن‌ها رشد می‌کند و بالغ می‌شود. در نمونه مورد مطالعه تخمک از نوع دو پوسته‌ای، متوسط خورش و واژگون است (شکل‌های ۴G و ۴F).

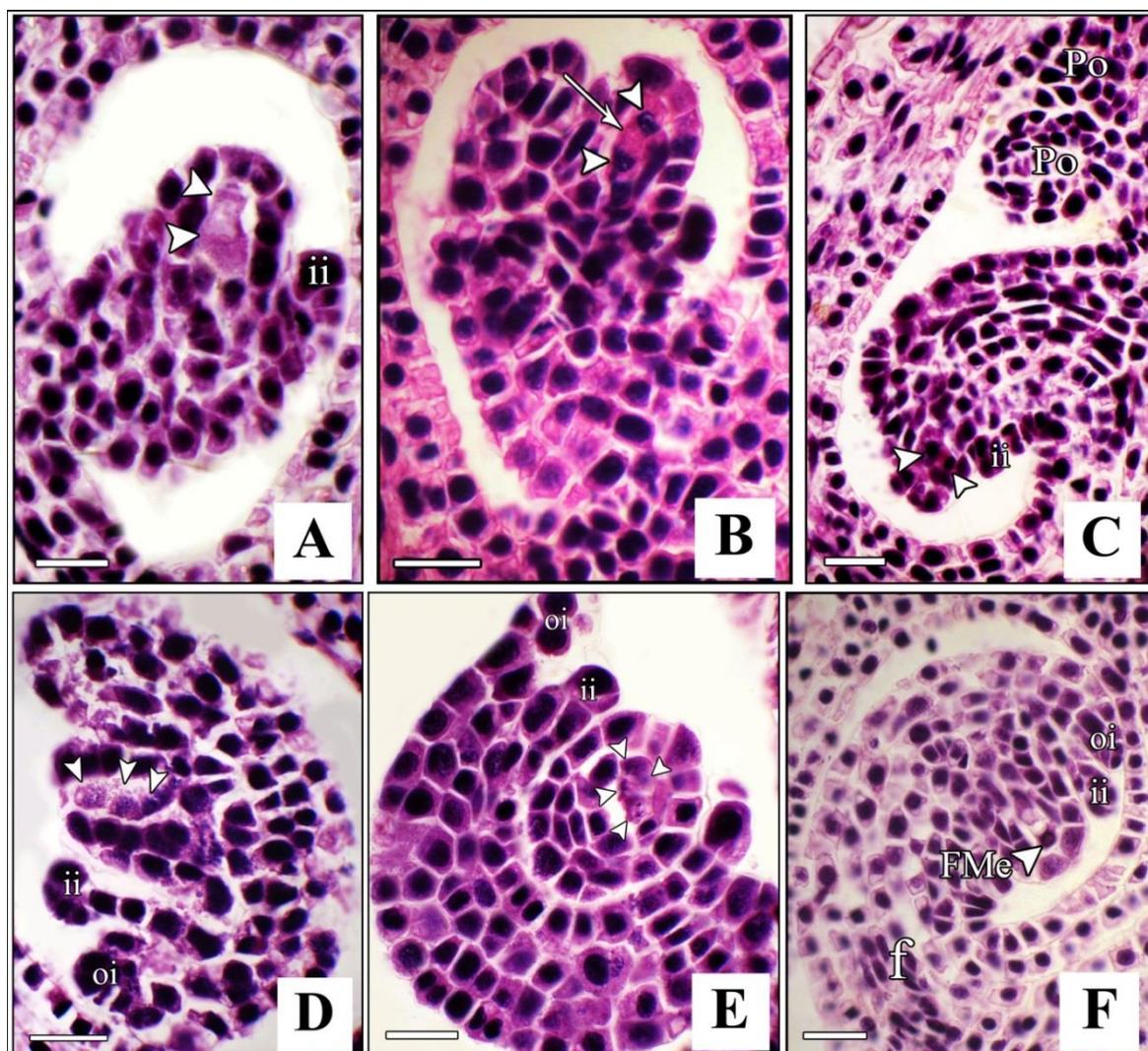
مگاسپورزایی و نمو گامتوفیت ماده

سلول مگاسپوروسیت با حجم زیاد، هسته درشت، سیتوپلاسم متراکم و شکل چند وجهی خود از سایر سلول‌های خورش قابل تشخیص می‌باشد (شکل‌های ۱D-۱F). مگاسپوروسیت با انجام میوز مگاسپورها را تشکیل می‌دهد. با اولین تقسیم میوزی مگاسپوروسیت، دو سلول دیاد هاپلوئید تشکیل می‌گردد. دیاد در

هسته‌های قطبی و تشکیل هسته ثانویه قبل از لقاح تشکیل می‌شود. با تشکیل کیسه رویانی و سلول‌هایی که قابلیت لقاح را دارند، یعنی تخم‌زا (هاپلوئید) و هسته دوتایی (دیپلوئید) تکوین تخمک به پایان می‌رسد.

در زمان لقاح تعداد زیادی لوله‌گرده به تخمک راه پیدا می‌کنند (شکل ۳C) و در این بین تنها یکی از لوله‌های گرده از طریق مجرای سفت وارد شده، و از طریق یکی از سینرژیدها به کیسه رویانی راه پیدا می‌کند و محتویات خود را به داخل کیسه تخلیه می‌نماید. یکی از اسپرم‌ها با سلول تخم‌زا و دیگری با سلول مرکزی لقاح می‌یابد (شکل ۳E) و بدین ترتیب سلول تخم (شکل ۳F) و سلول مادر آندوسپرم (شکل ۴A) تشکیل می‌شود.

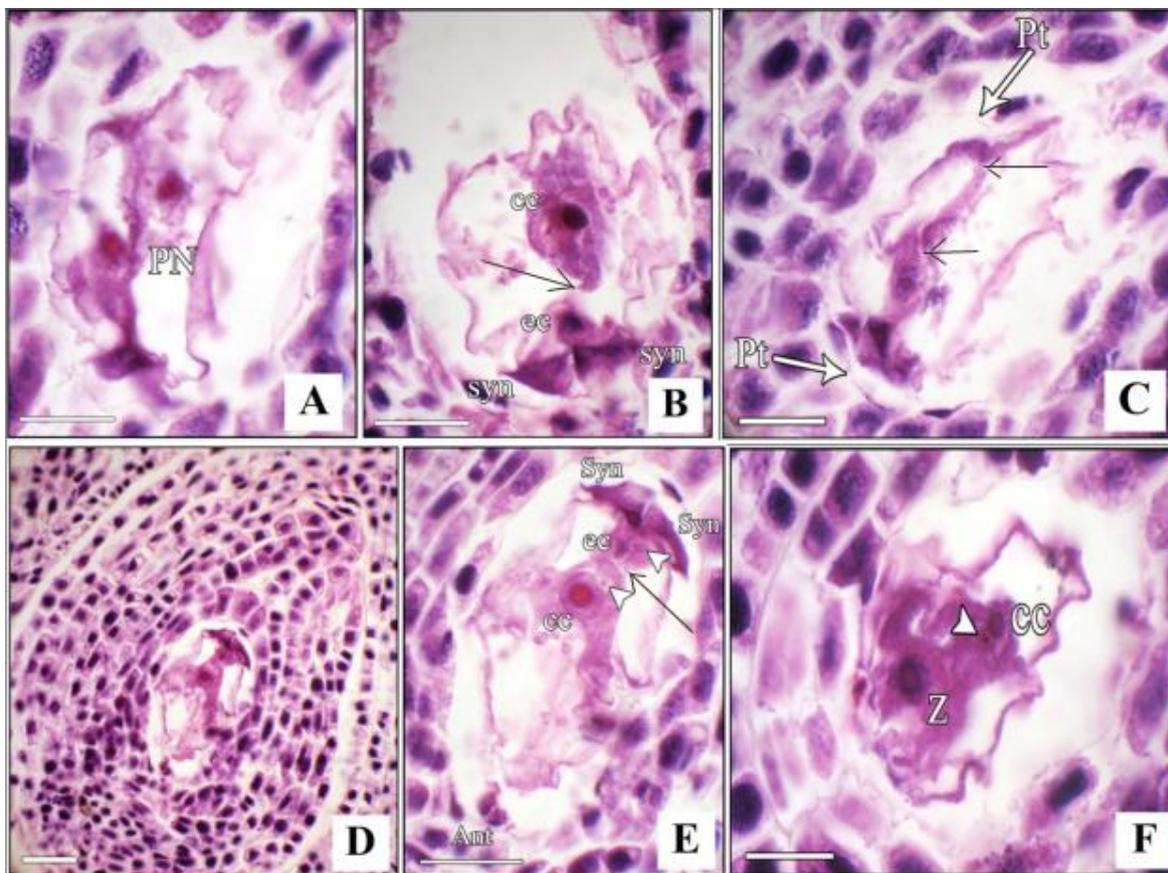
این سلول‌ها آرایش مثلثی را ایجاد می‌کنند. در قطب بنی، سلول‌های آنتی‌پود به وجود می‌آیند که آن‌ها نیز آرایشی مثلثی شکل دارند. در نمونه مورد بررسی آنتی‌پودها کوچک‌ترین سلول‌های کیسه رویانی هستند (شکل‌های ۴B و ۳E). هم‌زمان با تمایز سلول‌های سفتی به دو سلول قرینه و سلول تخم‌زا، دو هسته قطبی جدا شده از قطب‌های سفتی و بنی در قسمت مرکزی کیسه رویانی (شکل ۳A) به هم ملحق می‌شوند تا هسته ثانویه یا سلول مرکزی را تشکیل دهند؛ ارتباطات سیتوپلاسمی بین کلیه سلول‌های کیسه رویانی برقرار است (E۳, F, DD۴). سپس سلول مرکزی مهاجرت کرده و در زیر دستگاه تخم‌زا قرار می‌گیرد (شکل‌های ۳E-۳B). در نمونه مورد مطالعه ترکیب



شکل ۲: مگاسپوروتنز و تکوین گامتوفیت ماده در *A. flammea*. (A) دیاد (▲) بدون سیتوکینز؛ (B) دیاد خطی طولی، دیواره بین سلول‌ها (↑) قابل رویت است؛ (C) در این برچه سه تخمک دیده می‌شود که دو عدد از آن‌ها در مرحله پریموردیوم تخمکی به سر می‌برد و دیگری در مرحله دیاد می‌باشد. دیاد از نوع خطی عرضی (▲) است؛ (D) تتراد خطی (▲)؛ (E) تتراد T شکل (▲). ii: پوسته داخلی، oi: پوسته خارجی؛ (F) موقعیت مگاسپور عمل‌کردی (FMe) در قطب بنی است، پایه تخمک (f) در این شکل دیده می‌شود. شاخص ۴۰ میکرومتر. مخففها: ii: پوسته درونی؛ oi: پوسته بیرونی؛ car: برچه؛ Po: پریموردیوم تخمکی؛ f: پایه تخمک (فونیکول).

(شکل ۴E). پس از نمو سلول تخم و در مرحله رویان کروی شکل، اندوسپرم کاملا سلولی می‌شود (شکل ۴E). سلولهای اندوسپرم تک هسته‌ای هستند.

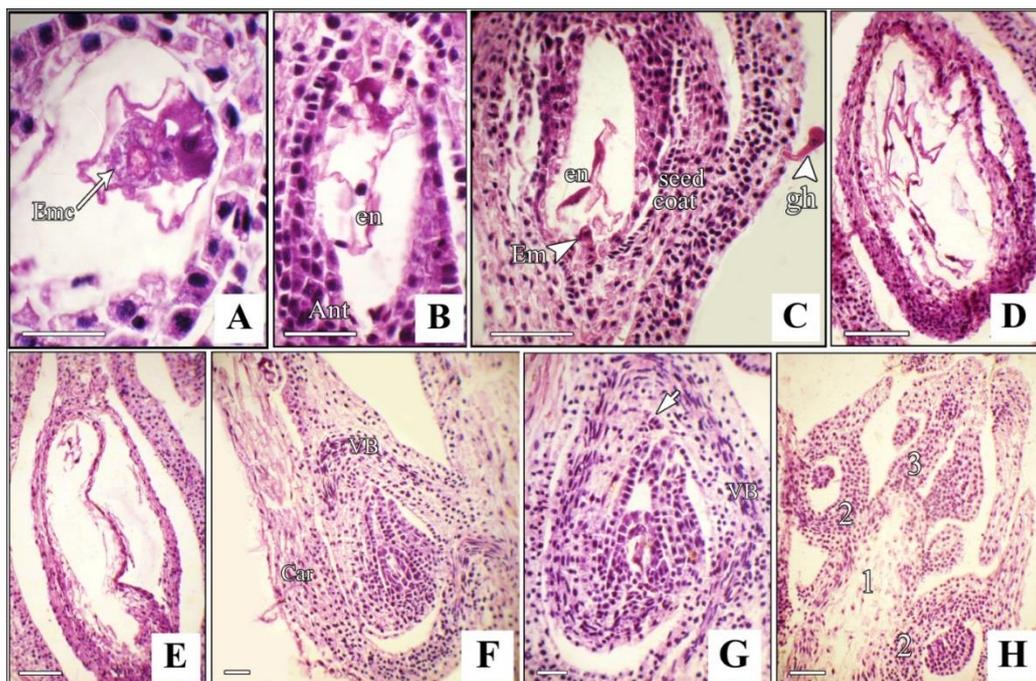
نمو سلول مادر اندوسپرم به سرعت انجام می‌شود و بافت اندوسپرم را به وجود می‌آورد. اندوسپرم ابتدا از نوع هسته‌ای است (شکل‌های ۴D-۴B) و سپس جداربندی نموده و سلولی می‌شود



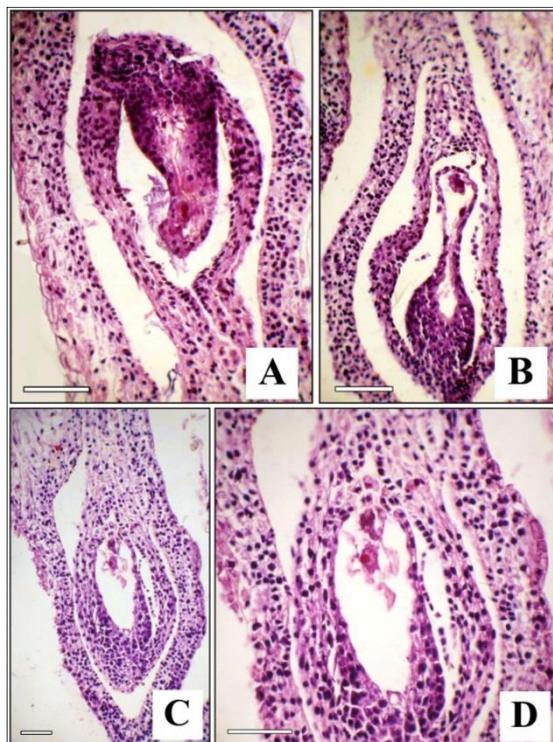
شکل ۳: تکوین و لقاح گامتوفیت ماده در *A. flammea* (A) هسته‌های قطبی (PN) در مرکز کیسه رویانی در حال تلقیح هستند؛ (B) کیسه رویانی بالغ شامل دو عدد سلول سینرژید (syn) و یک سلول میانی تخم‌زا (ec)، سلول مرکزی (cc) در بالای این مجموعه استقرار می‌یابد؛ (C) ورود لوله گرد (Pt) (↑) به داخل کیسه رویانی؛ (D) شکل کلی تخمک و کیسه رویانی، شکل خطی هلالی میکروپیل که پوسته داخلی در تشکیل آن دخالت دارد در این تصویر نمایان است؛ (E) بخش فوقانی کیسه رویانی با جزئیات دقیق تر، در این شکل تلقیح اسپرم (▲) به داخل سلول مرکزی و سلول تخم‌زا دیده می‌شود. سلول‌های سینرژید و سلول‌های آنتی پود نیز حضور دارند؛ (F) در این شکل سلول تخم (Z) تشکیل شده و تلقیح هسته‌ای بین اسپرم (▲) و سلول مرکزی (cc) برقرار شده است. پیکانهای توپر محل اتصالات سلولی در بین برخی از سلول‌های کیسه رویانی را نشان می‌دهد. شاخص در شکل D ۴۰ در بقیه شکل‌ها ۱۵ میکرومتر است.

بررسی، مادگی متشکل از ۶ تا ۸ برچه است و تنها یک تخمک زایا در هر برچه دیده می‌شود. بعضی از تخمک‌ها در مراحل پایانی تکوین گامتوفیت ماده تخریب می‌شوند و آثار تخمک‌های تحلیل رنده با کیسه رویانی غیر عادی قابل رویت و تشخیص است (شکل‌های ۵A-۵D). شمارش اولیه در بیش از ۳۰ نمونه گل مورد مطالعه و ارزیابی تعداد تخمک‌های در حال تحلیل و لقاح نیافته نشان داد که تعداد آن‌ها قابل توجه و حدود ۴۰ درصد از تخمک‌های گیاه مورد بررسی را شامل می‌شود و حدود یک سوم از موارد فوق (تخمک‌های در حال تحلیل) مربوط به تخمک‌هایی است که لقاح یافته و محتوی رویان اولیه ولی در حال سقط می‌باشد.

تعداد آنتی‌پودها در ابتدا سه عدد است اما به موازات رشد کیسه رویانی تعداد آن‌ها در نتیجه تقسیمات میتوزی افزایش می‌یابد. تعداد آن‌ها گرچه بیش از سه عدد ولی نامشخص است. تعدادی از آن‌ها بعد از لقاح نیز تا مدتی پایا مانده (شکل ۴B) و احتمالاً در جریان سلولی شدن اندوسپرم، فشرده و تخریب می‌شوند. سلول تخم تقسیم شده، پیش رویان و سپس رویان را ایجاد می‌کند (شکل ۴C). در طی بلوغ کیسه رویانی کلاهک خورشی تحلیل می‌رود. تکوین کیسه رویانی از تیپ پلی‌گونوم پیروی می‌کند و در طی بلوغ کشیده و طویل می‌گردد. در تخمک *A. flammea* دستجات آوندی در خورش و پوسته‌ها به خوبی قابل مشاهده است (شکل‌های ۴G و ۴F). در غنچه‌های مورد



شکل ۴: گامتوفیت ماده بعد از لقاح در *A. flammea* (A) سلول مادر اندوسپرم (*Emc*) تشکیل و شروع به تقسیم می‌کند؛ (B) در حالی که تقسیمات اولیه اندوسپرم (*en*) آغاز شده هنوز سلول‌های آنتی‌پودی (*Ant*) حضور دارند؛ (C) در این شکل اندوسپرم هسته‌ای (*en*) در مجاورت جنین (*EM*) دیده می‌شود؛ در دیواره تخمدان کرک غده‌ای (*gh*) حضور دارد؛ (D) وسعت اندوسپرم هسته‌ای در این تصویر کاملاً نمایان است؛ (E) اندوسپرم سلولی، (F) تخمک پرخورش، دو پوسته‌ای آویخته در برچه، دستجات آوندی در حال ورود به پوسته می‌باشد؛ (G) درپوش سفتی (\uparrow) بر روی پوسته خارجی حضور دارد. دسته آوندی (*VB*) قابل مشاهده است؛ (H) برش طولی از یک غنچه جوان شامل: ۱، نهنج؛ ۲، برچه؛ ۳، خامه و کلاله. شاخص در شکل A ۱۵ و در سایر شکل‌ها ۴۰ میکرون است. مخففها همانند تصاویر قبلی است.



شکل ۵: تخمک‌های در حال تحلیل در *A. flammea* که به علت کافی نبودن تعداد دانه‌های گرده و یا شرایط اکولوژیک، تعدادی از تخمک‌ها موفق به لقاح نمی‌شوند (A) و سقط می‌شوند و برخی نیز پس از لقاح و در مرحله تشکیل پیش رویان غالباً کروی شکل (B) سقط می‌شوند. در شکل‌های C و D کیسه رویانی با تکوین ناقص و فاقد مجموعه ساختارهای سلولی کامل دیده می‌شود که نشان دهنده سقط آنها است. شاخص ۴۰ میکرومتر.

بحث

به صورت کمتر معمول، از پوسته‌های بیرونی تشکیل می‌شوند. به طور کلی سدها در طی تشکیل کیسه رویانی به وجود می‌آیند و در زمان ورود لوله گرده به حفره تخمدان به طور کامل نمو یافته می‌شوند (۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰). اغلب انواع سد پس از لقاح از بین می‌روند و برخی در دانه بالغ باقی می‌مانند. در گونه *A. flammea* سد از پوسته بیرونی منشا می‌گیرد و تشکیل آن در طی نمو کیسه رویانی و در حالی است که پوسته بیرونی به حداکثر رشد خود رسیده است. وجود چندین سلول آرکتوسپور در هر تخمک، از ویژگی‌های تیره آلاله و به طور کلی از خصوصیات تخمک‌های با خورش حجیم و چند لایه‌ای است. اما فقط یکی از آن‌ها به سلول مادر مگاسپور تمایز می‌یابد. الگوی مگاسپوروزنژ منظم است. مطالعه بر روی مگاسپورانژ نشان می‌دهد که شکل تترادها در این تیره دارای تنوع بسیار زیادی است. دستجات آوندی در خورش و پوسته‌ها مشاهده شد. حضور دستجات آوندی در پوسته‌ها یک ویژگی ابتدایی است (۲۱). این دستجات عناصر تراکتیدی هستند.

نتایج ما نشان داد که مکان تلفیق هسته‌های قطبی در مرکز کیسه رویانی است ولی به علت مهاجرت به سمت میکروپیل در نهایت موقعیت استقرار هسته ثانویه در *A. flammea* در مجاورت سلول تخم را است. در این خانواده دو تیپ پلی‌پلوئیدی در سلول‌های آنتی‌پود گزارش شده است (۱۰). اما در گونه *A. flammea* تعداد آنتی‌پودها در ابتدا سه عدد بود ولی تعداد آن‌ها به سرعت افزایش یافته به طوری که تعداد نامشخصی داشتند و از نظر اندازه نیز بسیار کوچک می‌مانند و در واقع کوچکترین سلول‌های کیسه رویانی هستند و به نظر نمی‌رسد دارای پلی‌پلوئیدی باشند. به علاوه، تعدادی از آنتی‌پودها تا مدتی پس از لقاح پایا می‌مانند. اگرچه سلول‌های آنتی‌پود به عنوان سلول‌های با پایداری کم در نظر گرفته می‌شوند که اغلب قبل از لقاح و یا بلافاصله پس از لقاح از بین می‌روند (۱۳)، ولی در برخی از گیاهان سلول‌های مزبور پایداری بالایی دارند و حتی تعداد آن‌ها نیز افزایش می‌یابد (۲۲ و ۲۳). پس از لقاح باقی‌مانده و حتی موجب تشکیل رویان می‌شوند (۲۴ و ۲۵). پایین بودن نسبت جنسی (نسبت دانه‌های گرده به تخمک) و عوامل ژنتیکی نظیر پلی‌پلوئیدی می‌تواند موجب کاهش شانس لقاح و باروری شود و تخمک‌های لقاح نیافته در حال تحلیل را برجای بگذارد (۱۳). در گیاه مورد بررسی نیز تعداد قابل توجهی از تخمک‌های مورد مطالعه در حال تحلیل مشاهده شدند که حاکی از عدم لقاح موفق در آن‌ها است. یافتن علت این پدیده نیاز به بررسی عوامل ژنتیکی و محیطی دارد.

توالی بنیانگذاری مارپیچی اندام‌های تشکیل دهنده گل در خانواده Rnunculaceae یک الگوی کلی است (۱۰) و یک سطح سیستماتیکی پائین را نشان می‌دهد (۱۱). وضعیت دو پوسته‌ای و مجرای سفت (میکروپیل) اندوستومیک، ویژگی‌های ابتدایی هستند که در اغلب گیاهان این تیره دیده می‌شود، در حالی که میکروپیل bistomic و تخمک تک پوسته‌ای که در برخی از گیاهان این تیره دیده می‌شود ویژگی‌های اشتقاق یافته از گروه اول هستند (۱۲). در نمونه مورد مطالعه، تخمک از نوع ابتدایی و دو پوسته‌ای است که ابتدا پوسته درونی و سپس پوسته بیرونی تخمک بنیانگذاری می‌شود. پوسته بیرونی از رشد زیادی برخوردار بوده و تعداد لایه‌های آن بیش از دو عدد می‌باشد در حالی که پوسته درونی محدود به دو لایه سلولی است. در تخمک‌های با پوسته‌های چند لایه‌ای، اپی‌درم و پارانشیم تمایز یافته دیده می‌شود (۱۳). در تخمک دو پوسته‌ای مورد بررسی، تنها پوسته داخلی در تشکیل میکروپیل دخالت دارد، به عبارتی میکروپیل اندوستومیک است که یک ویژگی ابتدایی محسوب می‌شود (۱۱). در اغلب اسپرماتوفیت‌ها، پوسته به خورش متصل است و در بیشتر موارد فقط در انتهای میکروپیلی به صورت آزاد باقی می‌ماند (۱۴). در اعضای برخی تاکسون‌ها، فرایند کامل اتصال می‌تواند وجود داشته باشد. بنابراین در برخی اعضای تیره آلاله پوسته‌های آزاد، بدون اتصال به طور محکم فشرده می‌شود و در برخی دیگر فرایند کامل اتصال دیده می‌شود به طوری که حاشیه بین پوسته‌ها قابل تشخیص نیست (۱۲). حالت اخیر در *A. flammea* مشاهده گردید. در نهاندانگان پایه (بازال آنژیوسپرم‌ها) تخمک‌های پر خورش غالب هستند (۱۰) و تیره آلاله در بین تاکسون‌های ابتدایی دو لپه‌ای‌ها حجیم‌ترین خورش را دارد (۱۰)، اما در نمونه مورد مطالعه تخمک از نوع متوسط خورش مشاهده گردید.

در تیره آلاله تقسیمات مماسی سلول‌های اپی‌درمی منجر به تشکیل کلاهک خورشی می‌شود. درجه نمو کلاهک، یک ویژگی مخصوص گونه است. کلاهک خورشی در *A. flammea* ۲-۴ لایه‌ای است. در خانواده آلاله کلاهک خورشی می‌تواند موجب تشکیل اپیستاز شود (۱۵ و ۱۶) که بافتی با دیواره سلولی ضخیم است که بر اساس گزارش‌های فوق در دانه‌های بالغ پایدار می‌ماند اما در نمونه‌های مورد مطالعه ما در مراحل پیشرفته قابل تشخیص نیست. سدهای پوستکی در نتیجه توسعه لبه راسی پوسته و به طور معمول از پوسته درونی به وجود می‌آیند و

نتیجه گیری

بررسی دقیق روند تکوین مادگی و کیسه رویانی نشان داد که اگرچه الگوی تکوین از الگوی گیاهان نهاندانه پیروی می‌کند، اما ویژگی‌های منحصر به فردی نیز در گونه مورد مطالعه وجود دارد. تخمک دو پوسته‌ای است اما مجرای سفت فقط با پوسته درونی ساخته می‌شود در کلاهک خورشی ۲ تا ۴ لایه وجود دارد که موجب تشکیل اپیستاز می‌گردد. چندین سلول ارکتوسپوری وجود دارد، اما فقط یکی از آن‌ها به مگاسپوروسیت تبدیل می‌شود. روند مگاسپوروزن روند عادی و متداول است. در کیسه رویانی سلول‌های آنتی‌پود برخلاف حالت معمول نسبتاً کوچک هستند که نشان دهنده این است که در تغذیه کیسه رویانی نقش مهمی ندارند. آن‌ها همچنین بر خلاف حالت متداول دوام بیشتری دارند و تا مدت‌های طولانی پس از لقاح دوام می‌یابند. یکی از ویژگی‌های جالب توجه در گونه مورد مطالعه تخریب و تحلیل تعداد قابل توجهی از تخمک‌ها است که نشان دهنده عدم موفقیت آن‌ها در فرایند لقاح است. علت این پدیده می‌تواند عوامل ژنتیکی و پایین بودن نسبت جنسی (نسبت دانه‌های گرده به تخمک) و یا عوامل محیطی باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. بر اساس مطالعات مرجع شناختی ما، مطالعه حاضر اولین مطالعه در ارتباط با روند تکوین تخمک، مگاسپوروزن و کیسه رویانی در *A. flammea* است.

منابع

1. subgenus *Batrachium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1981; 50: 161-164.
7. Turala-Szybrowska K, Wolanska J. Two mechanisms of polyploidization of the antipodals in *Aquilegia vulgaris* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 1989; 31: 63-74.
8. Chehregani A, Tanaomi N. Ovule ontogenesis and megagametophyte development in *Onobrychis schahuensis* Bornm. (Fabaceae). *Turkish Journal of Botany*. 2010; 34: 241-248.
9. Yeung EC, Cavey MG. Developmental changes in the inner epidermis of the bean seed coat. *Protoplasma*. 1990; 154: 45-52.
10. Ren Y, Li ZJ, Chang HL, Lei YJ, Lu AM. Floral development of *Kingdonia* (*Ranunculaceae* s. l., *Ranunculales*). *Plant Systematic and Evolution*. 2004; 247: 145-153.
11. Endress PK. Floral structure and evolution in *Ranunculanae*. *Plant Systematic and Evolution*. 1995; 9: 47-61.
12. Wang Z, Ren Y. Ovule Morphogenesis in *Ranunculaceae* and its Systematic Significance. *Oxford Journal*. 2007; 101:447-462.
13. Rezanejad F, Chehregani A. Embryology of Flowering Plants (Translated from Batygina, T.B.). 1th. Kerman: Shahid Bahonar University; 2004.
14. Eames, A. Morphology of Angiosperms. 1th Ed. New York: McGraw-Hill; 1961.
15. Van Tieghem Ph. Epideeapharide genre nouveau Luxembourgaises. *J Botany France*. 1901; 12: 376-389.
16. Van Tieghem, Ph. 1901b. L'hypostase, sa structure et son role constants, sa position et sa forme variables. *Bull Mus Natn Hist.Nat* 1901; 7 (8): 412-418.
17. Bhargava HR. Contribution to the morphology of *Boerhaavia repanda*, *Indian J Botanical Society*. 1932; 11 (4): 303-326.
18. Savchenko MI, Komar GA. Morphology of the ovule in some Monocotyledons, pp. 74-113. In M.S. Yakovlev (eds). *Flower Morphology and Reproductive Process in Angiosperms*, Moscow-Leningrad, Russia; 1965.
19. Savchenko MI. Morphology of the flowering plant ovule. 1th Ed. Russia: Nauka, Leningrad; 1973.
20. Shamrov II, Nikiticheva ZI. The ovule and seed morphogenesis in *Gymnadenia conopsea* (Orchidaceae): structural and histochemical investigation. *Bot Zhurnal*. 1992; 77: 45-60.
21. Öztürk R, Ünal M. Cytoembryological studies on *Paeonia peregrina* L. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2003; 2: 85-89.
1. Vijayaraghavan MR, Bhandari NN. Studies in the family Ranunculaceae: Embryology of *Thalictrum javanicum* Blume. *Flora*. 1970; 159: 450-458.
2. Johri BM, Ambegaokar K, Srivastava PS. Comparative embryology of Angiosperms, 2th Ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
3. Kozieradzka-Kiskurno M, Bohdanwicz J. *Sedum acre* embryogenesis: Polyploidization in the suspensor. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2003; 45: 153-157.
4. Greilhuber J, Dolezel J, Lysak MA, Bennett MD. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*. 2005; 95(1): 255-260.
5. Raghavan, V. Molecular embryology of flowering plants, 4th Ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1997.
6. Turala-Szybrowska K, Wedzony M. Endopolyploidy in the antipodals of *Ranunculus*

22. Chehregani A, Mohsenzadeh F, Hajisaddeghian S. Study on the developmental stages of ovule and pollen grains in *Tanacetum parthenium*. Journal of Developmental Biology. 2010; 1:17-19.
23. Chehregani A, Hajisaddeghian S, Mohsenzadeh F. Study on the developmental stages of ovule and pollen grains of *Inula aucheriana* DC. Iranian Journal of Plant Biology. 2010; 2(6): 1-10.
24. Chehregani A, Zarre Sh, Hajisaddeghian S. Embryology of *Tripleurospermum disciforme*: New and rare type of embryogenesis. Iranian Journal of Biology. 2010; 23(1): 26-34.
25. Mohsenzadeh F, Chehregani Rad A, Ekhtari S. Study on Developmental Stage of Gynoecium and Megagametophyte in *Ranunculus arvensis* L. Journal of Cell and Tissue. 2012; 3(3): 201-210.

Ovule and Megagametophyte Development in *Adonis flammea* Jacqu: Report of Ovule and Embryo Abortion

Chehregani Rad A, Ph.D.^{1*}, Mohsenzadeh F, Ph.D.¹, Ekhtari S, M.Sc.Student²,
Tajik Esmaeili S, Ph.D.Student³

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

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

3. Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran

* Email corresponding author: chehregani@basu.ac.ir

Received: 13 Mar. 2013

Accepted: 8 Oct. 2013

Abstract

Aim: Since applied and molecular studies are increasing in Ranunculaceae, the study and understanding of the flower development in the family is necessary. In this research ovule developmental stages in *Adonis flammea* were studied.

Material and Methods: The young flowers and buds were sampled in different developmental stages, fixed in FAA₇₀ and kept in 70% ethanol. Samples were embedded in paraffin after dehydration and sliced using microtome. Staining was carried out with PAS and Hematoxylin. Prepared slides of different developmental stages were studied using light microscope and are photographed.

Results: Results showed that ova in *A. flammea* are anatropous, bitegmic and crassinucellate. Micropylar channel was constructed with inner integument. Megasporocyte produces both linear and nonlinear arrangement of tetrads after meiosis. Embryo sac development follows to the *Polygonum* type. Antipodal cells are persistent that degenerate at the cellular endosperm stage. Cytoplasmic connections of embryonic sac cells, degeneration of some ova, consciously abortion of ovules and embryo were also observed.

Conclusion: The patterns of ovule and embryo sac development are accordance with the Angiosperms and *Polygonum* type. But antipodal cells persistence, nucellar cap formation, cytoplasmic connections between embryo sac cells, fertilization failure and embryotocia in some ova are characters of the studied species that can due to genetical or environmental factors.

Keywords: Ovule, Embryo sac, Megagametophyte, *Adonis flammea*, Ranunculaceae