

بررسی مراحل تکوین مادگی و مگاکامتوفیت در *Ranunculus arvensis* L.فریبا محسن زاده Ph.D.^{*}، عبدالکریم چهرگانی راد Ph.D.^۱، سولماز اخطاری^۲

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: fmohsenzade@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۳

چکیده

هدف: مطالعه تکوین مادگی و گامتوفیت ماده در علم گیاه شناسی و تاکسونومی گیاهی اهمیت دارد. این پژوهش به منظور مطالعه مراحل تکوین تخمک در گیاه *Ranunculus arvensis* L. و مقایسه با سایر تاکسون‌های گزارش شده این تیره، انجام شد.

مواد و روش‌ها: گل‌ها و غنچه‌ها در مراحل مختلف نمو برداشت، در FAA₇₀ تثبیت و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. نمونه‌ها پس از آب‌گیری و قالب‌گیری در پارافین با میکروتوم برش‌گیری و رنگ آمیزی شدند. مراحل تکوین تخمک و کیسه رویانی با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی و عکس برداری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که تخمک واژگون، تک پوسته‌ای با ۴ یا ۵ لایه و پر خورش است. تکوین کیسه رویانی از طرح تک اسپوری و تیپ پلی‌گونوم پیروی می‌کند. افزایش یاخته‌های آنتی پود، و در برخی از نمونه‌ها افزایش یاخته‌های قرینه نیز مشاهده شد. همچنین هسته آن‌ها حالت پلی‌پلوئیدی داشت. آرکئوسپورها پس از تشکیل، به وسیله لایه کالوزی احاطه شده بودند. پس از تقسیم میوز، تترادهای مگاسپور آرایش خطی و T شکل داشتند. کیسه رویانی بزرگ و با شکل نامنظم بوده و در جریان بلوغ، رشد طولی قابل توجهی پیدا می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که اگر چه الگوی کلی تکوین تخمک در گونه مورد مطالعه شبیه به موارد گزارش شده قبلی است ولی آرایش تترادهای، افزایش سلول‌های آنتی پود و قرینه و وجود هیپوستاز، پوستامنت و کلاک خورشی در تخمک، از ویژگی‌های خاص گونه گیاهی مورد مطالعه است.

واژگان کلیدی: آلاله، تکوین تخمک، کیسه رویانی، مگاکامتوفیت

مقدمه

تیره آلاله موقعیت فیلوژنتیک برجسته‌ای در راسته Ranunculales دارد و به نظر می‌رسد پایه و اساس یودایکت‌ها باشد (۱). این خانواده آرایش قابل توجهی از ریخت شناسی اولیه و پیشرفته را در بر می‌گیرد. ویژگی‌های ریختی و رویان شناختی این تیره بدین شرح است: گل‌های منظم یا نامنظم، دوجنس یا تک جنس، برچه‌های آزاد یا متصل، مادگی چند تخمکی یا یک تخمکی، تخمک پرخورش یا کم‌خورش، تک پوسته، دو پوسته یا فاقد پوسته، تکوین کیسه رویانی از تیپ‌های Allium و Polygonum پیروی می‌کند و سلول‌های آنتی پود زودگذر یا پایا هستند (۲ و ۳). پلی پلوئیدی به صورت رایج در انواع سلول‌های کیسه رویانی نظیر آنتی پودها، سینرژیدها، آندوسپرم و سوسپانسور دیده می‌شود (۴ و ۵) و ارتباط آشکاری که میان ساختار این سلول‌ها و طول مدت زمان زندگی‌شان وجود دارد، نقش تغذیه‌ای آن‌ها را پیشنهاد می‌کند (۶). وقوع درون پلی پلوئیدی در سلول‌های آنتی پود در اعضای این تیره ملاحظه شده است (۷ و ۸).

یکی از جنس‌های بزرگ این تیره جنس آلاله (*Ranunculus*) است که به تبار *Ranunculeae* از قبیله *Clematideae* تعلق دارد. جنس *Ranunculus* L. متعلق به تیره *Ranunculaceae* و بزرگ‌ترین جنس آن با حدود ۶۰۰ گونه با پراکنش وسیع در سطح جهان، به ویژه مناطق معتدله است و پراکندگی آن بیشتر در نیمکره شمالی است (۱). حدود ۲۰ گونه آن انحصاری ایران است و بقیه گونه‌ها را در مناطق مدیترانه‌ای، عراق، افغانستان، آسیای جنوب غربی، ترکمنستان، سوریه، لبنان، شبه جزیره بالکان، پاکستان، مراکش، جزیره قبرس و ماورای قفقاز نیز می‌توان یافت. در ایران، مرکز تنوع و انتشار تعداد قابل توجهی از گونه‌های آلاله در ناحیه ایرانی - تورانی است. این جنس دارای گونه‌های یک‌ساله، دوساله و چندساله در بیشتر نقاط ایران است (۹). عصاره خام گونه‌های *Ranunculus* کشنده قارچ (۱۰)، دافع حشرات (۱۱)، بی حس کننده درد و ضد اشتعال هستند (۱۲) و در اروپا به عنوان تبیر و درمان آسم و نقرس استفاده می‌شده است. تاریخچه مداوای بیماران با این گیاه به قرون گذشته بر می‌گردد. در زمان قدیم، آن را برای ایجاد مسمومیت به کار می‌بردند و فرد مصرف کننده دچار حالتی از مسمومیت با چهره‌ای ظاهراً خندان می‌شد (۱۲). Gilibert و همکارانش (۱۲) مصرف شیره رقیق شده گیاه را در درمان تنگی نفس، بیماری

سل، حالت زردی، زخم‌های مثانه و برخی موارد دیگر توصیه کرده‌اند.

از آنجایی که مطالعات تکوینی و مولکولی در مورد گل‌های راسته Ranunculales در حال افزایش است (۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶)، دانش مقایسه‌ای و درک تکوین گل در اعضای تیره *Ranunculaceae* ضروری است. گرچه مقالات چندی در مورد جنبه‌های ساختار گل و رویان‌شناسی در تیره *Ranunculaceae* وجود دارد، اما پراکنش مطالعات تکوینی در اعضای این خانواده ناموزون است (۱۷ و ۱۸). توجه به همه جنس‌های مختلف و نیز همه گونه‌های مختلف یک جنس کمتر صورت گرفته یا حتی تعداد قابل توجهی از آن‌ها اصلاً مطالعه نشده است. هدف این مقاله، مطالعه رویان‌شناختی با تکیه بر تکوین تخمک و مگاکامتوفیت در *Ranunculus arvensis* L. چنین مطالعاتی به آشکار ساختن خصوصیات ریخت‌زایی تخمک و درک بهتری از رده‌بندی تیره آلاله به عنوان یک تاکسون با اهمیت تکاملی و دارای مشکلات آرایه شناختی حل نشده، منجر می‌شود.

مواد و روش‌ها

گل‌ها و جوانه‌های گونه مورد مطالعه در اوایل تابستان از زیستگاه‌های طبیعی در همدان جمع آوری شد و نمونه هرباریومی گونه مورد نظر در هرباریوم دانشگاه بوعلی‌سینا نگهداری می‌شود. گل‌ها و غنچه‌ها در مراحل مختلف تکوین در FAA₇₀ (Formalin, Acetic acid, Ethanol) تثبیت و سپس در الکل ۷۰ درصد ذخیره شدند. پس از آب گیری با الکل‌های با درجات صعودی و قالب گیری در پارافین، نمونه‌ها با میکروتوم با ضخامت ۷ تا ۱۰ میکرون برش گیری شدند (۱۹). شفاف‌سازی نمونه‌ها و رنگ‌آمیزی مضاعف هسته و سیتوپلاسم بوسیله هماتوکسیلین و اتوزین مطابق روش Yeung (۲۰) انجام شد. نمونه‌های مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری (Germany) Zeiss Axiostar Plus بررسی و عکس‌برداری به کمک دوربین دیجیتال Canon G₁₁ انجام شد. مراحل تکوین تخمک و کیسه رویانی در نمونه‌های مورد مطالعه به دقت بررسی و تصویر برداری گردید.

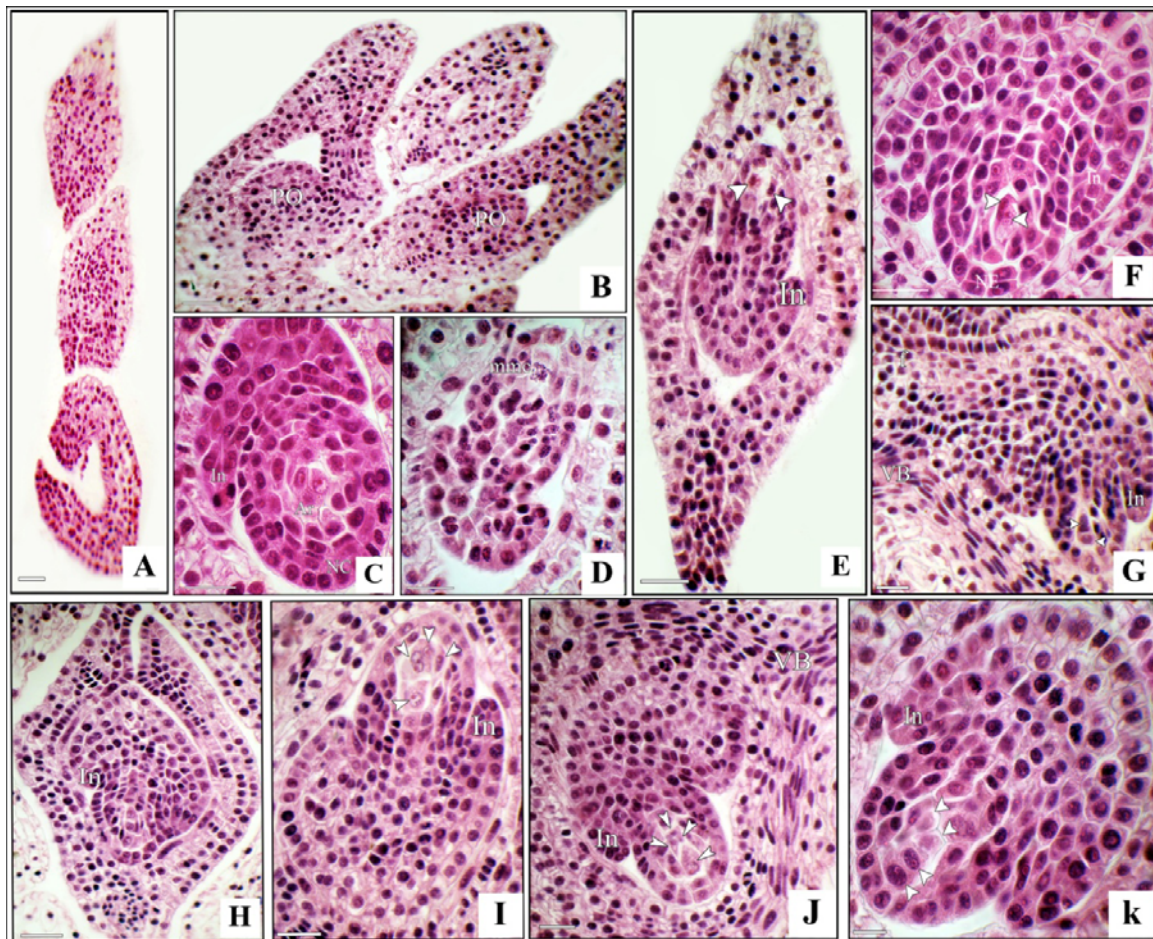
نتایج

تشکیل مادگی و تخمک در *Ranunculus arvensis*

گل‌های *Ranunculus arvensis* کوچک با گلبرگ‌های زرد

محوری امتداد می‌یابد، قابل مشاهده است (شکل ۱E). جایگزینی تخمک در تخمدان از نوع جداری است. در نمونه مورد مطالعه تخمک از نوع تک پوسته‌ای با ۴ یا ۵ لایه، پرخورش (Crassinucellar) و واژگون و مجرای سفت (میکروپیل) خطی صاف بود (شکل ۲E). در مراحل اولیه نمو تخمک در منطقه راسی پریموردیوم خورش، یک یا چند یاخته زیراپیدرمی به نام آرکتوسپور تمایز می‌یابند، که در *R. arvensis* چندین یاخته آرکتوسپوری وجود دارد که تنها یکی از این سلول‌ها به طور مستقیم (بدون تقسیم) به یاخته مادر مگاسپور یا مگاسپوروسیت تمایز می‌یابد (شکل ۱C). از نکات متمایزکننده در این نمونه وجود پوستامنت، هیپوستاز، سد پوسته‌ای و کلاهدک خورشی است (شکل‌های ۲H و ۱C).

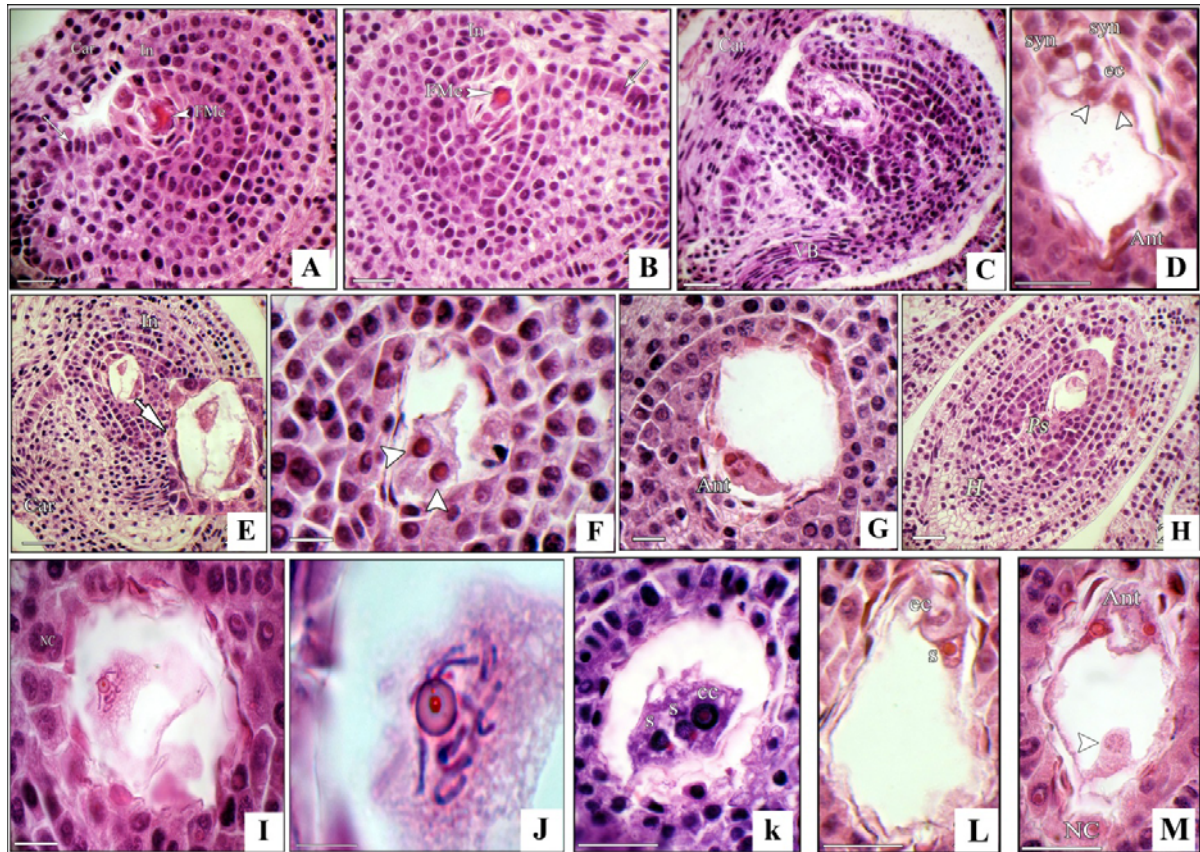
رنگ که از محور برگ‌ها خارج می‌شوند و گلدهی تا اواخر مرداد ماه ادامه پیدا می‌کند. تعداد گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌ها هر کدام ۵ عدد و پرچم‌ها ۱۰ تا ۱۳ عدد می‌باشد. مادگی متشکل از برچه‌های جدا از هم است. آرایش پرچم‌ها و برچه‌ها به صورت ماریچی است. تشکیل و تکوین پرچم و مادگی ناهمزمان است. در مراحل پایانی تکوین پرچم، پریموردیوم تخمکی به صورت برجستگی کوچک انگشت مانند دیده می‌شود. بنیان تخمکی پایه گرا (Basipetal) است و به صورت یک برآمدگی گنبدی شکل از سلول‌های قاعده سطح شکمی برچه توسعه می‌یابد. تشکیل پریموردیوم‌های تخمکی در هر دو حالت برچه بسته و باز، مشاهده شد (شکل‌های ۱A و ۱b) و هر برچه شامل ۶ تا ۸ تخمک واژگون، پرخورش و تک پوسته است. در طول هستی‌زایی (انتوزن)، الحاق بخشی از حاشیه‌های برچه که در طول سطح



شکل ۱: (A) تشکیل پریموردیوم‌های تخمکی در حالتی که برچه هنوز باز است، (B) رشد پریموردیوم تخمکی و بسته شدن برچه، (C) بنیانگذاری سلول‌های آرکتوسپوری (Ar)، کلاهدک خورش (NC) و پوسته تخمک (In)، (D) یکی از سلول‌های آرکتوسپور به عنوان مگاسپوروسیت (mmc) عمل می‌کند، (E) دیاد خطی عرضی (♂) و بسته شدن برچه در این شکل دیده می‌شود، (F) دیاد خطی طولی (♂)، (G) دیاد طولی (♂)، پایه تخمک (f) و همچنین ورود دستجات آوندی (VB) به پوسته دیده می‌شود، (H) در این شکل تترادها از نوع خطی هستند و برچه در این مرحله همچنان باز است، (I) تترادهای از نوع تتراهدراول، (J) تترادها از نوع تترگونال، (K) تترادها از نوع T شکل. (بزرگنمایی شکل‌های A و B = ۱۰۰×، بقیه شکل‌ها ۴۰۰×، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین - انوزین).

های پوستکی در نتیجه توسعه لبه راسی پوسته تشکیل می‌شوند به سمت میکروپیل رشد می‌کند و دهانه آن را مسدود می‌کند. کلاهک خورشی متشکل از سه لایه است و در طی بلوغ کیسه رویانی تحلیل می‌رود (شکل‌های ۲H و ۲E).

پوستامنت بافتی با خاستگاه خورشی است که به صورت یک ستون از سلول‌های طویل مستقر در بخش زیرین انتهای آنتی پودی کیسه رویانی قرار گرفته است. در منطقه بنی (شالازی) خورش این گونه، یک بافت توسعه یافته از نظر ریخت شناسی تمایز می‌یابد که هیپوستاز (Hypostase) نامیده می‌شود. سد-



شکل ۲: (A) از چهار یاخته تترادی، سه یاخته تحلیل می‌روند و سلولی که باقی مانده به گامتوفیت ماده تبدیل می‌شود. در این شکل موقعیت یاخته مگاسپور عملکردی (FMe) در ناحیه شالازی قرار دارد. رشد در پوش سفتی (↑) از این مرحله به بعد به وضوح دیده می‌شود، کلاهک خورشی دو لایه (NC)، برچه (Car)، در این شکل یاخته مگاسپور عملکردی (FMe) موقعیت میکروپیلی دارد، (C) کیسه رویانی ۸ هسته‌ای قبل از لقاح، ورود دستجات آوندی (VB) به تخمک دیده می‌شود، (D) تعدادی یاخته در قطب مجاور سفت، دستگاه تخم (ea) را ایجاد می‌کند. به موازات تکوین کیسه رویانی پوسته‌ها (In) و درپوش سفتی (↑) نیز رشد می‌کنند، کلاهک خورش (NC) در مراحل ابتدایی تکوین کیسه رویانی هنوز حجیم است، دستگاه تخم در قطب میکروپیلی شامل دو یاخته سینرژید (Syn) و یک یاخته میانی تخم‌زا (ec)، هسته‌های قطبی (Δ) در زیر دستگاه تخم مستقر بوده و در همین محل با هم تلفیق می‌شوند. در قطب بنی سلول‌های آنتی‌پودی (Ant) جای می‌گیرد، سه یاخته آنتی‌پود با آرایش مثلثی به همراه زوائد سیتوپلاسمی در این شکل دیده می‌شود. هسته هر سه یاخته قابل رویت می‌باشد. با نزدیک شدن پوسته‌ها به هم میکروپیل نیز شکل می‌گیرد، (F) هسته بزرگ سلول‌های آنتی‌پودی (Δ) در این نمونه مشاهده می‌شود، (G) افزایش سلول‌های آنتی‌پودی (Ant)، (H) در این شکل هیپوستاز (H) و پوستامنت (Ps) دیده می‌شود. هیپوستاز حجیم و فنجان‌ی است و در مراحل پایانی تکوین رویان همچنان حضور دارد. پوستامنت در واقع ستون سلولی مستقر در بخش زیرین انتهای متقاطری کیسه رویانی است که در تیره آلانه لایه‌های کمی دارد. هر دو ساختار در فراهم نمودن مواد غذایی نقش دارند، (I) مشاهده لقاح همراه میتوز، هسته اسپرم در مجاورت کروموزوم‌های یاخته تخم‌زا دیده می‌شود، منظور از لقاح همراه میتوز این است که تلفیق بین آنها با میتوز همراه است. تحلیل کلاهک خورش (NC) نمایان است، (J) همان شکل از نمای نزدیکتر؛ (K) دو اسپرم (S) در مجاورت یاخته مرکزی (cc) قبل از لقاح. یکی از اسپرم‌ها در حال لقاح با هسته ثانویه بوده و ارتباطات هسته‌ای بین آنها برقرار شده، در واقع لقاح هسته ثانوی زودتر از یاخته تخم‌زا صورت می‌گیرد، (L) اسپرم (S) در حال ورود به یاخته تخم‌زا (ec) می‌باشد، (M) در این شکل زیگوت (Δ) تشکیل شده است، سلول‌های آنتی‌پودی پایا بوده و همچنان بعد از لقاح حضور دارند. کلاهک خورشی (NC) در حال تحلیل رفتن است. (بزرگنمایی شکل‌های A-E = ۴۰۰×، بقیه ۱۰۰۰×، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین - اتوزین).

مگاسپورزایی و نمو گامتوفیت ماده در *Ranunculus arvensis*

با توجه به این که یاخته آرکنوسپور در لایه چهارم قرار دارد، یاخته مادر مگاسپور نیز در *R. arvensis* در لایه چهارم است (شکل ۱D). مگاسپوروسیت با انجام میوز مگاسپورها را تشکیل می‌دهد که ضمن رشد، گامتوفیت ماده یا کیسه رویانی را تولید می‌کنند. در تخمک نمونه مورد مطالعه از زمان پیدایش آرکنوسپورها، لایه کالوزی در اطراف آنها مشاهده شد (شکل ۱C). در اولین تقسیم میوزی مگاسپوروسیت که موجب تشکیل دو یاخته دیاد هاپلوئید می‌گردد، هم دیاد طولی (شکل‌های ۱G و ۱F) و هم دیاد عرضی (شکل ۱E) مشاهده شد. دومین تقسیم میوزی موجب تشکیل چهار یاخته تتراد می‌شود. بررسی تعداد زیادی از برش‌ها نشان داد که انواع تترادها را در این نمونه می‌توان مشاهده کرد، از جمله نوع خطی، T شکل، چهار وجهی (Tetrahedral) و چهار گوشه (Tetragonal) (شکل‌های ۲K و ۲H). از چهار یاخته حاصل از میوز (تتراد مگاسپور)، سه یاخته تحلیل می‌روند و فقط یکی باقی می‌ماند که مگاسپور عملکردی نامیده می‌شود. در این نمونه موقعیت مگاسپور عملکردی هم از نوع بنی (شکل ۲A) و هم سفتی (شکل ۲B) است. در *R. arvensis* وقتی میوز با تشکیل تترادها به پایان می‌رسد، پوسته تخمک حدوداً تمام جسم تخمک را می‌پوشاند (شکل‌های ۲B و ۲A) و این نشان می‌دهد که رشد پوسته‌های تخمک در این نمونه سریع است. هسته یاخته بنیادی کیسه رویانی، سه تقسیم میتوزی متوالی را انجام می‌دهد. نخستین تقسیم میتوزی، موجب تشکیل دو هسته هاپلوئید جدید شده، کیسه رویانی دو هسته‌ای را ایجاد می‌کند: دومین تقسیم میتوزی نیز موجب پیدایش چهار هسته هاپلوئید و در نتیجه کیسه رویانی چهار هسته‌ای می‌شود. در نهایت، تقسیم سوم، کیسه رویانی هشت هسته‌ای را به وجود می‌آورد. با رشد طولی کیسه رویانی، در بین هشت هسته ذکر شده، واکنش‌هایی ایجاد می‌شود و در نتیجه، چهار هسته در انتهای سفتی و چهار هسته در انتهای بنی قرار می‌گیرند (شکل ۲C). سپس یاخته‌ای شدن در کیسه رویانی رخ داده، موجب تشکیل کیسه رویانی بالغ می‌شود. پدیده یاخته‌ای شدن کیسه رویانی همزمان با مهاجرت هسته‌های قطبی صورت می‌گیرد (شکل ۲D). سه یاخته در قطب مجاور سفت دستگاه تخم (Egg apparatus) را ایجاد می‌کنند (شکل ۲D). دستگاه تخم شامل یک یاخته میانی تخم‌زا (Oospher) و دو یاخته کناری (سینرژید) است که این یاخته‌ها آرایش مثلی

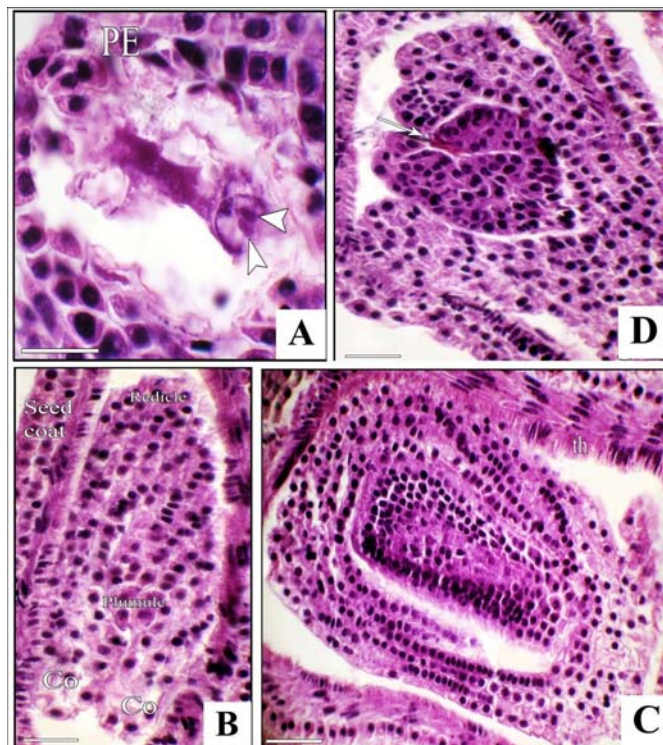
شکلی را ایجاد می‌کنند. یاخته تخم‌زا گلابی‌شکل بوده و به واسطه استقرار یک هسته درشت در قطب بنی خود قابل تشخیص است. واکنش در یاخته‌های سینرژید به سمت داخل (بن) و در یاخته تخم‌زا به سمت خارج (سفت) است. در قطب بنی کیسه رویانی، یاخته‌های آنتی‌پود به وجود می‌آید. از ویژگی‌های گونه *R. arvensis* این است که پس از بلوغ کیسه رویانی یاخته‌های آنتی‌پود به تقسیم خودشان ادامه می‌دهند و تعداد آنها افزایش می‌یابد (شکل ۲G)، بعلاوه آنها حالت پلی‌پلوئید دارند که با اندازه بزرگتر هسته مشخص می‌شود (شکل‌های ۲E و ۲F) و تا تشکیل رویان از بین نمی‌روند (شکل ۳A). از آنجا که هسته‌های آنتی‌پودی هم‌اندازه نیستند پدیده پلی‌پلوئیدی به طور هم زمان رخ نمی‌دهد و یاخته‌های آنتی‌پودی درجه پلوئیدی یکسانی ندارند. یاخته‌های آنتی‌پود روی پوستامنت قرار دارند. با تشکیل کیسه رویانی و سلول‌هایی که قابلیت لقاح را دارند، یعنی تخم‌زا (هاپلوئید) و هسته‌دوتایی (دیپلوئید) تکوین تخمک به پایان می‌رسد. در طی بلوغ کیسه رویانی کلاهک خورشی تحلیل می‌رود. کیسه رویانی در این گیاه از نوع پلی‌گونوم می‌باشد که برای حدود ۸۰ درصد گونه‌های نهان‌دانه توصیف شده است. در این نمونه کیسه رویانی بزرگ و با شکل نامنظم است و در جریان بلوغ رشد طولی قابل توجهی پیدا می‌کند.

در *R. arvensis* هسته ثانویه قبل از لقاح تشکیل می‌شود، بعلاوه لقاح هسته ثانویه زودتر از تخم اصلی شروع می‌شود (شکل ۲K). به دنبال لقاح هسته ثانویه یاخته مادر آندوسپرم تشکیل می‌شود و با تقسیمات پی‌درپی آن، بافت آندوسپرم (آلبومن) به وجود می‌آید و احتمالاً در مرحله آندوسپرم یاخته‌ای، آنتی‌پودهای پایا تحلیل می‌روند. یاخته تخم‌زا با تلقیح یکی از آنتروئیدهای لوله‌گرده، یاخته تخم را ایجاد می‌کند (شکل ۲M). یاخته تخم تقسیم شده و پیش رویان را تشکیل می‌دهد. سوسپانسر کوتاه و یک ردیفی است (شکل ۳A). سپس با انجام تقسیمات متوالی رویان ۸ سلولی و سپس رویان دولپه‌ای (شکل ۳B) و در نهایت دانه را ایجاد می‌کند (شکل ۳C). لقاح بین هسته اسپرم و سلول-های کیسه رویانی با انجام یک میتوز همراه است (لقاح توام با میتوز)، به طوری که در حین لقاح کروموزوم‌های یاخته ماده به خوبی قابل رویت می‌شوند (شکل‌های ۲I و ۲J).

در *R. arvensis* دستجات آوندی در خورش و پوسته‌ها مشاهده شد (شکل ۲C). حضور دستجات آوندی در پوسته‌ها یک ویژگی ابتدایی است. در غنچه‌های مورد بررسی، تنها یک تخمک زایا در

مسیری طولانی را طی می‌کند و احتیاج به محیطی مرطوب دارد که کرک‌های دیواره مادگی بدین منظور سازماندهی شده‌اند (شکل ۳C).

هر برچه مشاهده شد. برخی تخمک‌ها در جریان بلوغ تحلیل می‌روند (شکل ۳D). در یک سمت دیواره مادگی کرک حضور دارد، در این تیره لوله کرده برای رسیدن به کیسه رویانی



شکل ۳: (A) در این شکل پیش‌رویایان (PE) به همراه سوسپانسون کوتاه یک ردیفی دیده می‌شود، حضور سلول‌های آنتی‌بودی در قطب شلازی (♂) قابل توجه است، (B) در این شکل رویان دو لپه‌ای (Co) همراه با Redicle (ریشه‌چه) و Plumule (جوانه راسی) دیده می‌شود. در این مرحله پوشش دانه (Seed coat) شکل گرفته است، (C) برش طولی از مادگی حامل دانه. در یک سمت سطح درونی دیواره مادگی کرک (th) حضور دارد، (D) ورود لوله کرده (♂) به تخمک در حال تحلیل. (بزرگنمایی شکل‌های A = 1000x، بقیه شکل‌ها 400x، رنگ آمیزی با همتوکسیلین - انوزین).

مراحل تکوینی و رویانی یک فرد، یک فیلم کوتاه از مراحل تکاملی آن فرد یا گونه است، یعنی مراحلی را که گیاه برای تکامل طی کرده بصورت کوتاه در تکوینش می‌توان مشاهده کرد، بنابراین در نهادانگان برچه در مرحله‌ای باز است و سپس بسته می‌شود. در نمونه‌های مورد مطالعه ما، برچه در *R. arvensis* در مراحل اولیه تکوین تخمک باز بوده و سپس بسته می‌شود. در هر برچه تنها یک تخمک حضور دارد، تخمک‌ها واژگون، تک پوسته‌ای و پرخورش هستند. در بازال آنژیوسپرم‌ها تخمک‌های پرخورش غالب هستند (۲۴) و تیره آلاله در بین تاکسون‌های ابتدایی دو لپه‌ای‌ها حجیم‌ترین خورش را دارد (۱۳ و ۱۴). ساختار کلاهدک مانند چند لپه‌ای، در منطقه راسی خورش که از تقسیمات مماسی سلول‌های اپیدرمی و برآمده شدن (Overhanging) بافت کناری (پاریتال) یا انتهای میکروپیلی کیسه رویانی مشتق می‌گردد، کلاهدک خورشی (Nucellar cap) نامیده می‌شود. در تیره آلاله تقسیمات مماسی سلول‌های

بحث

توالی بنیانگذاری برچه‌ها به صورت مارپیچی در خانواده Rnunculaceae یک الگوی تقریباً ثابت است (۲۱) و یک سطح تکاملی و سیستماتیکی پائین را نشان می‌دهد (۲۲). در اغلب اسپرماتوفیت‌ها، پوسته به خورش متصل می‌شود و در بیشتر موارد در انتهای میکروپیلی به صورت آزاد باقی می‌ماند (۲۳). در اعضای برخی تاکسون‌ها، فرایند کامل اتصال می‌تواند دنبال شود. بنابراین در برخی اعضای تیره آلاله پوسته‌های آزاد، بدون اتصال بطور محکم فشرده می‌شود و در برخی دیگر فرایند کامل اتصال دیده می‌شود به طوری که حاشیه بین پوسته‌ها قابل تشخیص نیست. حالت اخیر در *R. arvensis* مشاهده گردید. در *R. arvensis* تخمدان متشکل از برچه‌های متعدد و آزاد با یک تخمک زایا و یا تخمک زایای آن با دو یا چند تخمک سترون همراه است. میوه به صورت اجتماعی از فندقه‌های واجد کلاله پایا و کوچک است (۹).

بوسیله سلول‌های سد که نشان ویژگی سلول‌های انتقال دهنده است و همچنین رشد ویژه آن‌ها به طرف سفت، عملکرد سد به‌عنوان بافت ترش‌خی را نشان می‌دهد که تغذیه لوله‌گرده را فراهم نموده و رشد آن را به داخل کیسه رویانی تضمین می‌کند (۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱ و ۴۲) به هر حال مکانیسم‌های راه اندازی این فرایند به مقدار کمی درک شده‌اند. در گونه مورد مطالعه ما زمان تشکیل این سد در مراحل اولیه نمو تخمک و در زمانی است که هنوز رشد پوسته‌ها کامل نشده است.

کیسه رویانی در نمونه مورد مطالعه، از تکوین تیپ پلی‌گونوم تغییر یافته تبعیت می‌کند که در گیاهان دیگر این تیره نیز گزارش شده است (۴۳ و ۴۴). در این خانواده دو تیپ پلی-پلوئیدی در سلول‌های آنتی‌پود گزارش شده بود. پدیده پلی-پلوئیدی ممکن است در نتیجه اختلال در میتوز باشد. برای مثال در تعداد کمی از گونه‌های *Anemon* (۴۱ و ۴۲)، یا حاصل از آندومیتوز باشد، به‌عنوان مثال در *Aconitum* (۴۵) و *Ranunculus peltatus* (۴۶). پدیده درون همانند سازی (Endoreplication) نیز گزارش شده است، برای مثال در ۴ گونه از *Aconitum* (۴۵)، در *Helleborus niger* (۴۱)، *Ranunculus peltatus* و *R. baudotii* (۴۶). در مورد گونه مورد مطالعه ما (*R. arvensis*) افزایش در تعداد و ابعاد سلول‌های آنتی‌پود مشاهده شد که افزایش قابل توجه ابعاد هسته در آن‌ها نمایانگر وجود پلی‌پلوئیدی در آن‌ها است. هنگامی که شمار این سلول‌ها افزایش می‌یابد، ابعاد هسته آن‌ها نشان می‌دهد که درجه پلوئیدی یکسانی ندارند.

در برخی جنس‌های تیره آلاله پوسته‌های آزاد، بدون اتصال و بطور محکم فشرده می‌شود و در برخی دیگر فرایند کامل اتصال دیده می‌شود به طوری که حاشیه بین پوسته‌ها قابل تشخیص نیست، حالت اخیر در نمونه مورد بررسی ما دیده شد (شکل ۲۸). حضور دستجات آوندی در پوسته‌ها یک ویژگی ابتدایی است (۴۷). این دستجات همان تراکئیدها هستند.

بررسی میکروسکوپی مگاسپوروژن گونه مورد مطالعه نشان داد که تقسیمات میوزی یاخته مگاکامتوسیت منجر به تشکیل تترادی می‌شود که اغلب خطی و یا T شکل است، که با گزارشات متعدد قبلی همسو است (۴۸)، اما در تعدادی از نمونه‌ها تتراد توده‌ای با آرایش تتراکونال و تتراهدراال نیز مشاهده شد که خاص این گونه محسوب می‌شود و برای اولین بار گزارش می‌گردد. مگاسپور عملکردی از نوع بنی (شالازی) است که با برخی از گزارشات پیشین همسو است (۴۶ و ۴۹). مگاسپور

اپیدرمی منجر به تشکیل کلاهک خورشی می‌شود. ممکن است کلاهک خورشی شامل دو یا چند لایه باشد که درجه نمو آن، یک ویژگی مخصوص گونه است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر کلاهک خورشی در *R. arvensis* سه لایه است. در خانواده آلاله کلاهک خورشی می‌تواند موجب تشکیل اپیستاز شود (۲۵) که بافتی با دیواره سلولی ضخیم است و در دانه‌های بالغ پایدار می‌ماند. بر اساس نتایج حاصله، در نمونه مورد بررسی ما این ساختار مشاهده نشد. ساختارهای هیپوستاز و پوستامنت در گونه *R. arvensis* حضور دارند. در واقع ممکن است ردیف‌های سلولی محوری پرموردیوم تخمکی منشاء ساختارهای ویژه مختلفی شوند. در تخمک‌های پر خورش، سلول‌های بخش نزدیک (proximal region) (به سلول‌های آرکتوسپوری) به پوستامنت، سلول‌های ناحیه دور (Distal region) به دسته آوندی و سلول‌های ناحیه میانی (Middle region) به پودیوم و هیپوستاز (منطقه مرکزی) نمو می‌یابند. زمان بنیان‌گذاری، طول عمر و ویژگی‌های ساختاری هیپوستاز، پودیوم و پوستامنت در بین تاکسون‌ها متفاوت بوده و همبستگی نزدیکی با دیگر ساختارهای مرتبط با نمو تخمک و دانه دارد و بوسیله الگوی مگاسپورزایی و الگوی نمو کیسه رویانی، رویان و آندوسپرم تعیین می‌شود. به هر حال همه این ساختارها در حالی که عملکردهای مشابه را انجام می‌دهند از نظر الگوی تشکیل متفاوت هستند. پوستامنت در تیره آلاله از لایه‌های کم تعداد تشکیل شده است و به سمت هیپوستاز توسعه یافته و از نظر ساختاری با سلول‌های پروکامبیومی قابل مقایسه هستند (۳۱-۲۶). در تخمک‌های پر خورش تیره آلاله، پوستامنت یک ساختار شاخص می‌باشد که در این خانواده از تعداد لایه‌های کمی تشکیل شده است (۳۲). طول عمر آن در گیاهان مختلف متفاوت بوده و با تکوین عملکرد ساختارهای خورشی دیگر در ارتباط است. به طور بسیار رایج، این ستون سلولی در ناحیه بن خورش مدت کوتاهی پس از لقاح تحلیل می‌رود.

سدهای پوستکی (Integument obturator) منشا تخمکی دارند و در نتیجه توسعه لبه راسی پوسته و به طور معمول از پوسته درونی بوجود می‌آیند و به صورت کمتر معمول، از پوسته‌های بیرونی تشکیل می‌شوند. به طور کلی سدها در طی تشکیل کیسه رویانی بوجود می‌آیند و در زمان ورود لوله‌گرده به حفره تخمدان به طور کامل نمو یافته می‌شوند (۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶ و ۳۷). اغلب انواع سد، پس از لقاح از بین می‌روند و برخی در دانه بالغ باقی می‌مانند. تجمع مواد پلاستیک (قابل انعطاف) مختلف

روبان از بین نمی‌روند. هسته ثانویه قبل از لقاح تشکیل می‌شود و لقاح هسته ثانویه زودتر از تخم اصلی است. به دنبال لقاح هسته ثانویه سلول مادر آندوسپرم تشکیل می‌شود و با تقسیمات پی‌درپی آن، بافت آندوسپرم (آلبومن) به وجود می‌آید و در مرحله آندوسپرم باخته‌ای، آنتی‌پودهای پایا تحلیل می‌روند.

منابع

1. Emadzade Kh, Lehnebach C, Lockhart P, Horandl E. A molecular phylogeny, morphology and classification of genera of Ranunculaceae (Ranunculaceae). *Taxon*. 2010; 59: 809-828.
2. Vijayaraghavan MR, Bhandari NN. Studies in the family Ranunculaceae: Embryology of *Thalictrum javanicum* Blume. *Flora* 1970; 159: 450-458.
3. Johri BM, Ambegaokar KB. Comparative embryology of angiosperms. PS Srivastava, Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1992.
4. Kozieradzka-Kiszkurno M, Bohdanowicz J. Sedum acre embryogenesis: Polyploidization in the suspensor. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2003; 45: 153-157.
5. 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: 255-260.
6. Raghavan V. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press, Cambridge. 1997.
7. Turala-Szybowska K, Wedzony M. Endopolyploidy in the antipodals of *Ranunculus* subgenus *Batrachium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1981; 50: 161-164.
8. Turala-Szybowska K, Wolanska J. Two mechanisms of polyploidization of the antipodals in *Aquilegia vulgaris* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 1989; 31: 63-74.
9. Ghahreman A. Iranian Chormophytes (Plant Systematic). Vol. 2, University Publishing Center, Tehran. 1992.
10. Qasem JR. Fungicidal activity of extracts of *Ranunculus asiaticus* and other weeds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ann Applied Biol*. 1996; 128: 533-540.
11. Bhattacharyya PR, Nath SC, Bordoloi DN. Insecticidal activity of *Ranunculus sceleratus* (L.) against *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*. *Indian J Exp Biol*. 1993; 31: 85-86.

عملکردی کیسه رویانی هشت هسته‌ای را به وجود می‌آورد و سپس به کیسه رویانی بالغ تمایز می‌یابد. در کیسه رویانی بالغ سه یاخته در مجاورت مجرای سفت تمایز می‌یابند که شامل یک تخم‌زا و دو یاخته قرینه است. دو هسته آزاد و قطبی در بخش میانی کیسه رویانی قرار دارند و تلفیق آنها قبل از لقاح صورت می‌گیرد و هسته ثانویه را تشکیل می‌دهد که با گزارشات پیشین در مورد برخی از اعضای تیره آلاله همسو است (۴۴). در کیسه رویانی تیپ پلی‌گونوم سلول‌های آنتی‌پود سه عدد است (۳۸) ولی آن‌ها از نظر اندازه (۱۸) و تعداد (۴۳) در این تیره متنوع هستند. در گیاه مورد مطالعه تعداد آنتی‌پودها از ۶ تا ۸ متغیر است که با گزارشات پیشین در مورد برخی دیگر از گیاهان تیره آلاله همسویی دارد.

بر اساس مطالعات مرجع شناختی ما، اگرچه گونه‌هایی از گیاهان تیره آلاله از نظر تکوین تخمک و پرچم مورد مطالعه بوده‌اند (۱۳، ۲۱ و ۲۴)، ولی گزارش حاضر اولین گزارش در مورد توصیف دقیق مراحل تکوین تخمک و کیسه رویانی در گونه *R. arvensis* می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش به هزینه گرنت ارائه شده توسط معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است و نویسندگان مراتب تشکر خود را به خاطر حمایت‌های مالی آن دانشگاه اعلام می‌دارند.

نتیجه‌گیری

بررسی نتایج نشان می‌دهد در گونه مورد مطالعه مادگی متشکل از برچه‌های جدا از هم و بنیان تخمکی پایه‌گرا (Basipetal) است. هر برچه شامل ۶ تا ۸ تخمک واژگون، پرخورش و تک پوسته‌ای است. چندین سلول آرکنوسپوری وجود دارد که تنها یکی از این سلول‌ها به طور مستقیم (بدون تقسیم) به سلول مادر مگاسپور یا مگاسپوروسیت تمایز می‌یابد. وجود پوستامنت، هیپوستاز، سد پوسته‌ای و کلاهدک خورشی از ویژگی‌های این گونه است. بررسی نشان می‌دهد که انواع تتراد را در این نمونه می‌توان مشاهده کرد از جمله نوع خطی، T شکل، چهار وجهی (Tetrahedral) و چهار گوشه (Tetragonal). تکوین کیسه رویانی از تیپ پلی‌گونوم پیروی می‌کند اما یاخته‌های آنتی‌پود پس از بلوغ کیسه رویانی به تقسیم خودشان ادامه می‌دهند، تعداد آنها افزایش می‌یابد، حالت پلی‌پلوئیدی دارند و تا تشکیل

12. Cao BJ, Meng QY, Ji N. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Ranunculus japonicus* extract. *Planta Med.* 1992; 58: 496-498.
13. Wang Z-F, Ren Y. Ovule morphogenesis in Ranunculaceae and its systematic significance. *Ann Bot.* 2007; 101(3): 447-462.
14. Zhao L, Wang W, Ren Y, Bachelier JB. Floral development in *Asteropyrum* (Ranunculaceae): implications for its systematic position. *Ann Bot Fennici.* 2012; 49: 31-42.
15. Wagner J, Steinacher G, Ladinig U. *Ranunculus glacialis* L.: Successful reproduction at the altitudinal limits of higher plant life. *Protoplasma.* 2010; 243: 117-128.
16. Endress PK. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Ann Bot.* 2011; 107: 1465-1489.
17. Min SR, Liu JR, Kim SW. Plant regeneration from zygotic embryo-derived embryonic cell suspension cultures of *Ranunculus katusensis*. *Plant Biotech Reproduction.* 2000; 71: 57-60.
18. Cameron B, Prakash N. Variations of the megagametophyte in the Papilionoideae. In: Ferguson IK & Tucker S (eds) *Advances in Legume Systematics 6: Structural Botany*, pp. 97-115. Kew: Royal Botanic Gardens. 1994.
19. Xue CY, Li DZ. Embryology of *Megacodon stylophorus* and *Veratrilba baillonii* (Gentianaceae): description and systematic implication. *Bot J Linnean Society.* 2005; 147: 317-331.
20. Yeung EC, Cavey MG. Developmental changes in the inner epidermis of the bean seed coat. *Protoplasma.* 1990; 154: 45-52.
21. Ren Y, Chang HL, Tian XH, Song P, et al. Floral development in Adonideae (Ranunculaceae). *Flora.* 2009; 204: 506-517.
22. Endress PK. Floral structure and evolution in Ranunculanae. *Plant System Evol.* 1995; 9: 47-61.
23. Eames A. *Morphology of angiosperms*, McGraw-Hill, New York. 1961. 23: 237-249.
24. Ren Y, Li ZJ, Chang HL, Lei YJ, et al. Floral development of *Kingdonia* (Ranunculaceae, Ranunculales). *Plant System Evol.* 2004; 247: 145-153.
25. Batygina TB. *Embryology of flowering of plants: Terminology and concepts*. Edenbrig limited, Germany. 2002.
26. Mück M. Über den Bau und die Entwicklung der Früchte und über die Herkunft von *Acorus calamus* L. *Bot Zeitung.* 1980; 66: 1-23.
27. Joshi AC, Venkateswarlu J. Embryological studies in the Lythraceae. I. *Lawsonia inermis*. *Proc. Indian Acad. Science. Section B, Biological Sciences (Bangalore, India).* 1953; 2: 481-493.
28. Kamelina OP, Proskurina OB. Anther and pollen grain development in Elaeagnaceae family. *Bot Zh. SSSR.* 1987; 72: 909-917.
29. Alimova G.K. Family Alstroemeriaceae, pp. 74-76. In T B Batygina and M S Yakovlev. (eds). *Comparative Embryology of Flowering Plants. Butomaceae-Lemnaceae.* Nauka, Leningrad, Russia; 1990.
30. Alimova G.K. Family Haemodoraceae, pp. 134-138. In T. B. Batygina and M. S. Yakovlev. (eds). *Comparative Embryology of Flowering Plants. Butomaceae-Lemnaceae.* Nauka, Leningrad, Russia; 1990.
31. Shamrov II, Nikiticheva ZI. The ovule and seed morphogenesis in *Gymnadenia conopsea* (Orchidaceae): structural and histochemical investigation. *Bot Zhurnal.* 1992; 77: 45-60.
32. Batygina TB, Shamrov II. New approach to interpreting the ovular basic structures. *Phytomorphology.* 1999; 49: 223-231.
33. Bhargava HR. Contribution to the morphology of *Boerhaavia repanda*, *J Indian Bot Soc.* 1932; 11: 303-326.
34. Savchenko M.I, Komar G.A. 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.
35. Savchenko MI. *Morphology of the Flowering Plant Ovule*, Nauka, Leningrad, Russia. 1973.
36. Winter AN, Shamrov II. The development of ovule and embryo sac in *Nuphar lutea* (Nymphaeaceae). *Bot Zhurnal.* 1991a; 76: 378-390.
37. Winter AN, Shamrov II. Megasporogenesis and embryo sac development in members of genera *Nymphaea* and *Victoria* (Nymphaeaceae). *Bot Zhurnal.* 1991b; 76: 1716-1728.
38. Maheshwari P. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*, McGraw-Hill, New York. 1950.
39. Tilton VR, Wilcox LW, Palmer RG, Albertsen MC. Stigma, style and obturator of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae) and their function in the reproductive process. *Amer J Bot.* 1984; 71: 676-686.
40. Xiao DX, Xu FX. Megasporogenesis and development of female gametophyte in *Magnolia*

- decidua (Magnoliaceae). *Ann Bot Fennici*. 2005; 43: 437-444.
41. Trela Z. Embryological studies in *Anemone nemorosa* L. *Acta Biol Cracoviensia Series Botanica*. 1963; 6: 1-14.
42. Unal M. Cytological and embryological studies on *Anemone pavonina* Lam. *Istanbul Universitesi Fen Fakültesi Mecmuasi*. 1978; 43: 185-208.
43. Unal M. Embryological studies on *Anemone coronaria*. *Istanbul Universitesi Fen Fakültesi Mecmuasi*. 1984; 49: 89-97.
44. Turala-Szybowska K. Endopolyploidy in the antipodals of *Ranunculus peltatus* Schrank. and *R. Penicillatus* (Dumort.) Bab. *Acta Biol Cracoviensia Series Botanica*. 1980; 22: 163-173.
45. Wedzony, M. Endopolyploidy and structure of nuclei in the antipodals and synergids of *Ranunculus baudotii* Godr. *Acta Biol Cracoviensia Series Botanica*. 1982; 24: 43-62.
46. Tschermak-Woess E. Notizen über die Riesenkerne und "Riesenchromosomen" in den Antipoden von *Aconitum*. *Chromosoma*. 1956; 8: 114-134.
47. Kamelina O.P, Proskurina O.B. Family Elaeagnaceae, pp. 105-110. In TB Batygina and MS Yakovlev (eds.). *Comparative of Flowering Plant Davidiaceae-Asteraceae*. Nauka, Leningrad, Russia; 1987.
48. Öztürk R, Ünal M. Cytoembryological studies on *Paeonia peregrina* L. *J Cell Mol Biol*. 2003; 85-89.
49. Bhandari NN. Studies in the family Ranunculaceae - III. Development of the female gametophyte in *Adonis annua* L. *Phytomorphology*. 1962; 12: 70-74

Study on Developmental Stage of Gynoeceium and Megagametophyte in *Ranunculus arvensis* L.

Mohsenzadeh F. Ph.D^{1*}, Chehregani Rad A. Ph.D¹, Ekhtari S.²

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

2. M.Sc. Student in Cell & Development Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

* Email corresponding author: fmohsenzade@gmail.com

Received: 13 Mar. 2012

Accepted: 22 Aug. 2012

Abstract

Aim: Study of gynoeceium and female gametophyte is important in botany and plant taxonomy. This research was done for studying the developmental stages of ovule in *Ranunculus arvensis* and comparing with other reported taxa in this family.

Material and methods: Flowers and young buds were collected in different developmental stages, fixed in FAA₇₀ and stored in 70% ethanol. Specimens were sliced using microtome after dehydration and embedding in the paraffin wax and stained. Developmental stages of ovule and embryo sac were studied and photographed using a light monitoring microscope.

Results: Results showed that the ovule is anatropous, unitegmic with 4 or 5 layers and full-nucellus. Embryo sac development is followed monospori and polygonum type. Increasing of antipodal cells and in some cases increasing of synergids were observed. Also their nuclei were polyploid. Archeosporial cells were surrounded by callosic wall after their formation.

Megaspore's tetrads had linear and T-shaped ornamentations. Embryo sac was large with irregular shape and considerably grows longitudinal in its maturation step.

Discussion: Results showed that although the overall pattern of ovule development in the studied species is similar to previous reports, but the tetrad arrangement, increasing of antipodal and synergid cells, and the presence of Hypostase, Postament and Nucellar Cap is the specific characteristic for this species.

Keywords: Embryo sac, Gynoeceium, Megagametophyte, *Ranunculus arvensis*