

## تکوین پرچم، تخمک و گامتوفیت نر و ماده در آلاله آبی *Batrachium fluitans*

پگاه رجیبی فر<sup>۱</sup> و عبدالکریم چهرگانی راد<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۴

### چکیده

اگرچه تیره آلاله (Ranunculaceae) به دلیل داشتن ویژگیهای تکاملی جالب موضوع مطالعات مختلف بوده است، اما مطالعات تکوینی در برخی از سرده‌های آن به طور محدود صورت گرفته و برخی از سرده‌های آن تا کنون مطالعه نشده‌اند. در این پژوهش مراحل و چگونگی تکوین پرچم و تخمک در گیاه آلاله آبی *Batrachium fluitans* بررسی شد. گلها و غنچه‌ها در مراحل مختلف نموی برداشت، در فیکساتور FAA<sub>70</sub> تثبیت و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شد. نمونه‌ها پس از آب‌گیری و قالب‌گیری در پارافین با میکروتوم برش‌گیری و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت. لامهای تهیه شده از مراحل مختلف تکوینی با دقت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی، و از مراحل تکوینی مورد نظر عکس تهیه شد. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، در گونه مورد مطالعه تخمک از نوع واژگون است. سلول مگاسپور موقعیت لایه سوم تا چهارم زیر اپیدرمی دارد، تقسیم میوز منجر به تولید تترادهای خطی و یا T شکل می‌شود. موقعیت مگاسپور عملکردی از نوع بنی است، تکوین کیسه رویانی از تیپ پلی‌گونوم تبعیت می‌کند و لقاح سلول تخم ضمیمه بر تخم اصلی مقدم است. نتایج نشان داد تکوین پرچمها با پدید آمدن توده‌های سلولی بیضی‌شکلی بر روی نهنج آغاز می‌شود و تعداد پرچمها پنج عدد است که خامه را در بر گرفته‌اند. لایه‌های بساک از بیرون به داخل شامل یک لایه سلول اپیدرمی، یک لایه مکانیکی، یک لایه میانی (موقت) و یک لایه تاپی در مجاورت سلولهای مادر گرده می‌باشد. سلولهای لایه تاپی در مراحل مختلف نمو بساک و دانه‌های گرده در جای خود ثابت باقی مانده و تحلیل نمی‌روند و این لایه از نوع ترشچی است. تترادهای میکروسپوری از نوع تتراهدال هستند. میکروسپورها در زمان آزاد شدن واکوئله نبوده، دارای شکل منظم، سیتوپلاسم متراکم و هسته مشخص در وسط هستند. دانه‌های گرده بالغ از نوع دو سلولی هستند.

واژه‌های کلیدی: تیره آلاله، تکوین، تخمک، کیسه رویانی، دانه گرده.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۱۰۵۸، پست الکترونیکی: a.chehregani@gmail.com

### مقدمه

ویژگیهای ملکولی (۱۵،۲۵) و ترکیبی از ویژگیهای ریخت‌شناختی و ملکولی انجام شده است (۳۹). این تیره توسط Tamura (۲۹) بر اساس عدد کروموزومی، برچه و نوع میوه به سه زیر تیره و یازده طایفه تقسیم شده است.

گیاهان تیره آلاله همزمان دارای ویژگیهای متعدد ابتدایی و پیشرفته ریخت‌شناختی و رویان‌شناختی هستند: گل‌های منظم یا نامنظم دو یا تک جنسی، برچه‌های آزاد یا پیوسته،

در راسته Ranunculales تیره آلاله موقعیت فیلوژنتیک برجسته‌ای داشته و به نظر می‌رسد پایه و اساس یوذاکت‌ها باشد. این تیره یک تیره بزرگ با پراکنش جهانی است (۹،۱۲،۲۷،۲۸). این تیره تنوع وسیعی را در ویژگیهای ریختی به ویژه در نوع میوه و سازمان یابی گل نشان می‌دهد و به همین دلیل طبقه‌بندیهای متعددی براساس ویژگیهای ریخت‌شناختی (۱۳،۱۴،۲۹).

## نتایج

**تکوین تخمک:** تخمکها به صورت برجستگیهای کوچک کم و بیش کروی تا بیضی شکل در جدار تخمدان پدیدار می‌شود (شکل ۱). تخمدان از نوع فوقانی، تک برچه‌ای و تک‌خانه‌ای است و هر حفره تخمدان یک ردیف تخمکی دارد (شکل ۲). برچه شامل تعداد زیادی تخمک است. تخمکها در تخمدان به طور واژگون و آویخته در یک ردیف قرار دارند. جایگزینی تخمکها در تخمدان از نوع جداری است. پریموردیوم تخمک دارای ۷-۴ ردیف سلولی است (شکل ۲). در *B. fluitans* چندین سلول آرکتوسپوری وجود دارد (شکل ۳) و تنها یکی از این سلولها به طور مستقیم به مگاسپوروسیت تمایز می‌یابد. سلول مادر مگاسپور در نمونه مورد مطالعه، در لایه چهارم است (شکل ۴). پریموردیوم تخمک، خمیدگی را از همان مراحل اولیه آغاز می‌کند. هنگامی که پریموردیوم تخمکی کشیده می‌شود، در بخش میانی آن ابتدا پوسته خارجی بنیان‌گذاری می‌شود (شکل ۳). بعد از مدتی، با توسعه پوسته خارجی، پوسته درونی در بخش درونی پوسته خارجی تشکیل می‌شود (شکل ۴). در نمونه مورد مطالعه، تخمک از نوع دو پوششی، پرخورش و واژگون است (شکل ۵). میکروپیل به وسیله پوسته داخلی که متشکل از ۲ لایه است، شکل می‌گیرد و از نوع خطی صاف است (شکل ۶). پوسته خارجی ضخیم و متشکل از ۴ تا ۵ لایه سلولی است. از درونی‌ترین لایه پوسته درونی، لایه اندوتلیوم تشکیل می‌شود. سلولهای این لایه به صورت شعاعی امتداد یافته و دارای هسته کاملاً واضح و سیتوپلاسمی متراکم هستند (شکل ۷).

**مگاسپورزایی و نمو گامتوفیت ماده:** سلول مادر مگاسپور به وسیله چندین لایه از سلولهای خورش احاطه می‌شود، بنابراین تخمک از نوع پرخورش است. سلول مادر مگاسپور از نظر اندازه رشد می‌کند و با حجم زیاد، هسته درشت، سیتوپلاسم متراکم و شکل چند وجهی خود از

فولیکولهای چند برچه‌ای یا فندقه‌های تک برچه‌ای، تخمکهای کم یا پرخورش تک یا دو پوسته‌ای، تکوین کیسه رویانی از نوع Polygonum یا Allium، و آنتی-پوده‌های پایدار یا ناپایدار از آن جمله است (۱۶،۳۸).

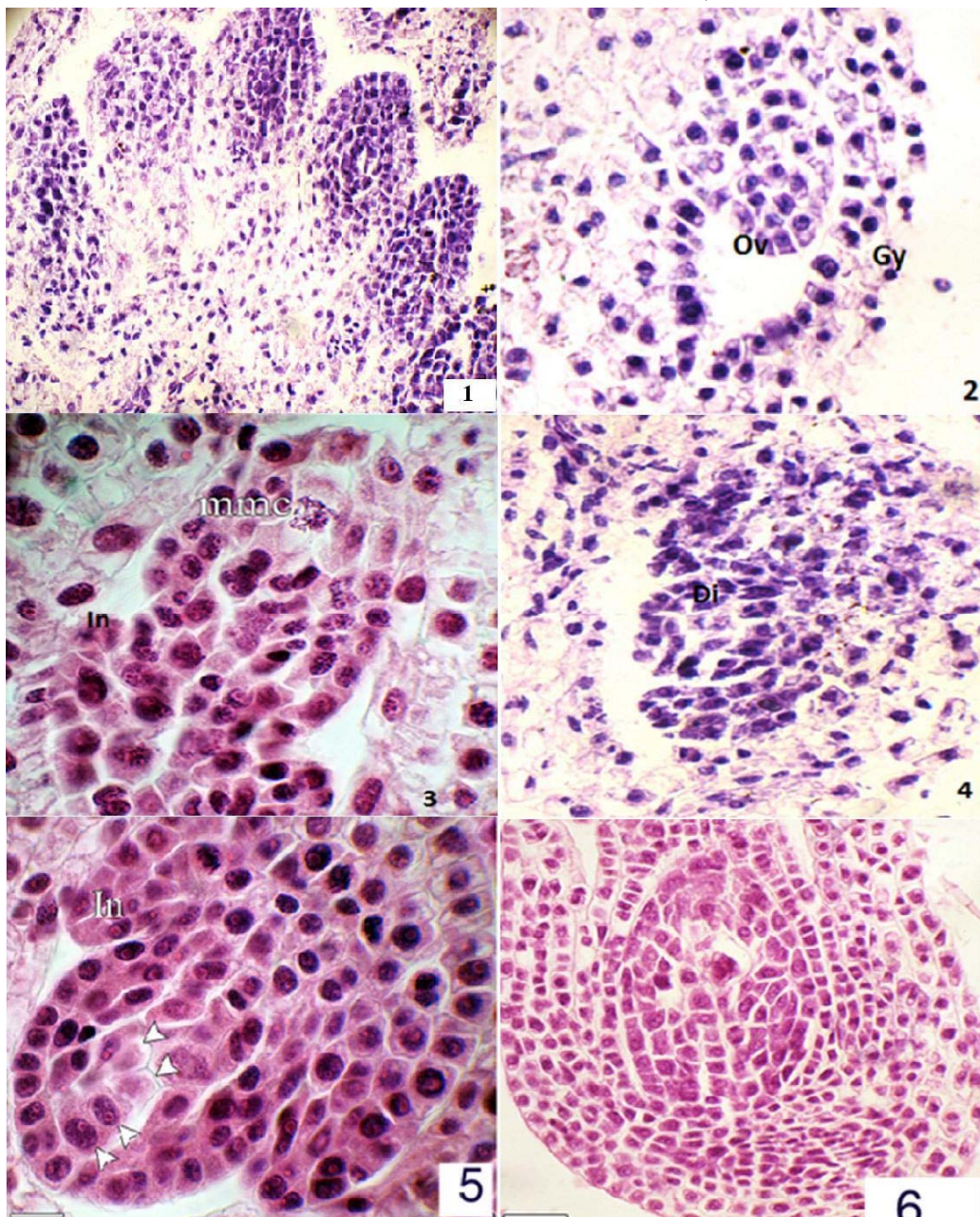
وجود پلی‌پلوئیدی مکرراً در انواع سلولهای کیسه رویانی نظیر آنتی‌پوده‌ها، سینرژیدها، آندوسپرم و سوسپانسور گزارش شده است (۱۹،۱۰) و ارتباط آشکاری بین درجه پلی‌پلوئیدی این سلولها و طول مدت زمان زندگی آنها وجود دارد، که نقش تغذیه‌ای آنها را پیشنهاد می‌کند (۲۲). وقوع آندو پلی‌پلوئیدی در سلولهای آنتی‌پود، در اعضای این خانواده بسیار شاخص است (۳۳،۳۴). سقط جنین و تخمک نیز در گیاهان این تیره گزارش شده است (۶). هدف این مقاله مطالعه مراحل تکوین تخمک، کیسه رویانی، پرچم و دانه‌گرده در گونه *B. fluitans* به منظور توسعه دانش رویان‌شناسی این تیره است. بعلاوه، آشکار ساختن خصوصیات تکوینی گامتوفیت نر و ماده سبب فهم بهتری از رده‌بندی تیره آلاله خواهد شد.

## مواد و روشها

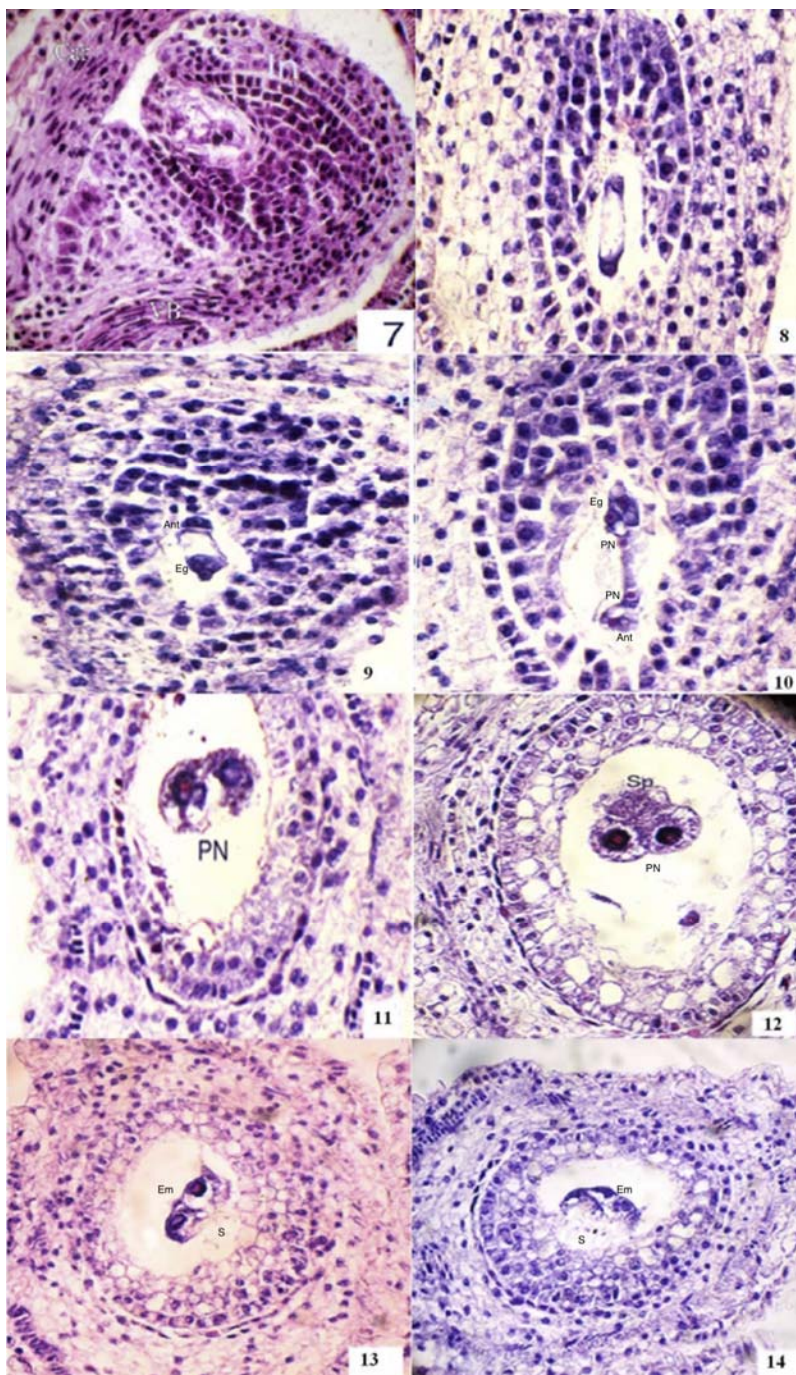
گلها و جوانه‌های گونه مورد مطالعه در اوایل بهار از زیستگاههای طبیعی این گونه در اطراف شهر بروجرد جمع‌آوری شد. گلها و غنچه‌ها در مراحل مختلف تکوین جهت تثبیت در (Formalin, Acetic acid, Ethanol) FAA<sub>70</sub> قرار داده شد، سپس ذخیره‌سازی در الکل ۷۰ درصد صورت گرفت. پس از قالب‌گیری با پارافین، برش‌گیری نمونه‌ها در قالب‌های پارافین با میکروتوم (Microm DC, Dideh Sabz, Iran) با ضخامت ۱۰-۷ μm صورت گرفت (۴۲). رنگ آمیزی برشهای تهیه شده پس از پارافین زدایی و آب‌دهی با روش رنگ‌آمیزی مضاعف هسته و سیتوپلاسم توسط هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت (۴۳). نمونه‌های مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری Zeiss Axiostar Plus (Germany) بررسی شد و عکس‌برداری به کمک دوربین دیجیتال مدل (Japan) Canon G<sub>11</sub> انجام گرفت.

تشکیل می‌دهد که ضمن رشد گامتوفیت ماده یا کیسه رویانی را تولید می‌کنند.

سایر سلولهای خورش قابل تشخیص است (شکل ۳). حضور کلاهک خورشی از این مرحله دیده می‌شود که بین ۲-۴ لایه است. مگاسپوروسیت با انجام میوز مگاسپورها را



شکل ۱-۶) مراحل بنیان‌گذاری مادگی و تخمک: (۱) تشکیل پریموردیوم‌های تخمکی در مادگی؛ (۲) رشد پریموردیوم تخمکی و بسته شدن برچه؛ (۳) بنیان‌گذاری سلول مگاسپوروسیت (mmc, NC) و پوسته تخمک (In)؛ (۴) دیاد خطی طولی؛ (F) دیاد خطی طولی؛ (۵) در این شکل تترادها از نوع T شکل هستند؛ (۶) تحلیل سه سلول تترادی و باقی ماندن یکی از آنها و عملکرد به عنوان سلول مادر کیسه رویانی (بزرگنمایی  $\times 400$ ).

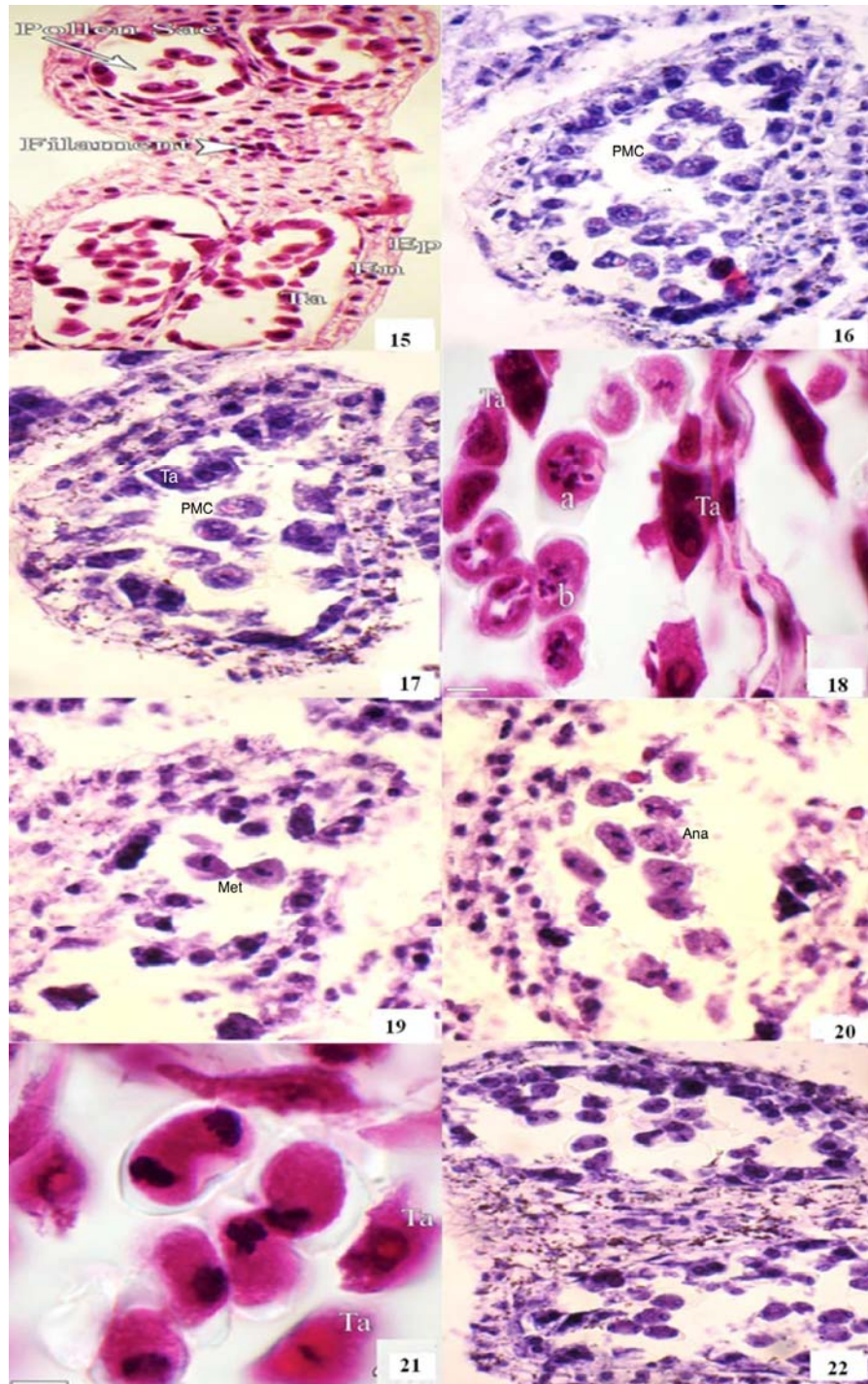


شکل‌های ۷-۱۴: برخی مراحل تکوینی تخمک و کیسه رویانی. ۷) کیسه رویانی دو هسته‌ای در تخمک با پوسته‌های (In) رشد یافته و دسته آوندی (VB) قابل مشاهده است؛ ۸) کیسه رویانی ۸ هسته‌ای قبل از بلوغ و سلولی شدن؛ ۹) آغاز سلولی شدن و بلوغ کیسه رویانی. دستگاه تخم (Eg) و سلول‌های آنتی‌پود (Ant) در حال سازمان‌یابی قابل مشاهده است؛ ۱۰) کیسه رویانی بالغ با ساختار سلولی شده. سه سلول آنتی-پود (Ant) با آرایش مثلثی به همراه زوائد سیتوپلاسمی در حال تحلیل در این شکل دیده می‌شود. هسته هر سه سلول قابل رؤیت می‌باشد. دستگاه تخم (Eg) متشکل از دو سلول همراه و سلول تخم‌زا و همچنین هسته‌های قطبی (PN) قابل مشاهده است. ۱۱) تلفیق دو هسته قطبی (PN) همزمان با لقاح آنها با اسپرم دیده می‌شود. ۱۲) مشاهده لقاح دو هسته قطبی با یک اسپرم (SP) قابل مشاهده است. ۱۳ و ۱۴) مراحل اولیه رویان‌زایی با تقسیمات سلول تخم پیش رویان (Em) و سوسپانسون (Su) به وجود آمده است (بزرگنمایی  $\times 400$ ).

دارند. شمار این سلولها و تعداد هسته آنها در طی تکوین (نموشان) افزایش نمی‌یابد اما آنها به طور قابل ملاحظه‌ای بزرگ می‌شوند و دارای هسته حجیمی هستند که نمایان‌گر وجود پلی‌پلوئیدی در آنها است. یک یا دو عدد از سلولهای آنتی‌پودی بعد از لقاح همچنان حضور دارند و در واقع پایا هستند. توسعه آنتی‌پودها همراه با واکوئل سازی در سیتوپلاسم و افزایش در ابعاد هسته و هستک است (شکل ۱۰). هسته‌های قطبی در کیسه رویانی در راس سلولهای آنتی‌پودی قرار گرفته (شکل ۱۱) و به زودی به هم ملحق می‌شوند تا هسته ثانویه و سلول مرکزی (شکل ۱۲) را تشکیل دهند. سلول مرکزی (هسته ثانویه) ارتباطات سیتوپلاسمی با آنتی‌پودها برقرار می‌نماید، در واقع این ارتباطات سیتوپلاسمی بین کلیه سلولهای کیسه رویانی برقرار است. سپس سلول مرکزی مهاجرت کرده و در زیر دستگاه تخم قرار می‌گیرد. در *B. fluitans* هسته ثانویه قبل از لقاح تشکیل می‌شود. به دنبال ورود لوله گرده به تخمک (شکل‌های ۱۲-۱۴) و انجام لقاح مضاعف، سلول تخم و سلول مادر آندوسپرم تشکیل می‌شود. با اولین تقسیم سلول تخم، سلول راسی و قاعده‌ای شکل می‌گیرد (شکل ۱۳). ادامه تقسیمات، رویان را ایجاد می‌کند (شکل ۱۴). 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 کلاهی خورشی تحلیل می‌رود. در این گونه تکوین کیسه‌رویانی از تیپ پلی‌گونوم پیروی می‌کند. کیسه رویانی در طی بلوغ گلابی شکل شده و بسیار عریض می‌گردد.

**تکوین پرچم، بساک و دانه گرده:** تکوین پرچمها با پدید آمدن توده‌های سلولی بیضی شکلی بر روی نهنج آغاز می‌شود، این توده‌ها از سلولهای مشابهی تشکیل شده‌اند (شکل ۱). این توده‌های سلولی شروع به رشد و تمایز می‌کنند و برجستگیهایی در طرفین آنها به وجود می‌آید که محل تشکیل بساک خواهند بود، بساک از نوع چهار کیسه گرده‌ای (تتراسپورانژی) است (شکل ۱۵).

اولین تقسیم میوزی مگاسپوروسیت موجب تشکیل دو هسته هاپلوئید و پس از سیتوکینز دو سلول دیاد هاپلوئید (شکل ۴) می‌گردد. در نمونه لام‌های تهیه شده از مراحل تکوین تخمک در این گیاه هم ازدیاد طولی و ازدیاد عرضی مشاهده شد. دومین تقسیم میوزی موجب تشکیل چهار سلول تتراد می‌شود. انواع تترادها را در این نمونه می‌توان مشاهده کرد از جمله نوع خطی طولی، خطی عرضی (۴ سلول کنار هم)، T شکل و چهار وجهی (شکل ۵). از چهار سلول حاصل از میوز، سه سلول تحلیل می‌روند و فقط یک سلول (مگاسپور عملکردی) باقی می‌ماند. در این نمونه موقعیت سلول باقیمانده یا مگاسپور عملکردی سفتی (میکروپیلی) است. در *B. fluitans* وقتی میوز با تشکیل تتراد به پایان می‌رسد، پوسته تخمک حدوداً  $\frac{3}{4}$  جسم تخمک را می‌پوشاند (شکل ۵ و ۶). مگاسپور عملکردی سه تقسیم میوزی متوالی را انجام می‌دهد و کیسه رویانی دو هسته‌ای، کیسه رویانی چهار هسته‌ای (شکل ۷) و در نهایت کیسه رویانی هشت هسته‌ای (شکل ۸) را به وجود می‌آورد سیتوکینز در کیسه رویانی رخ داده و منجر به سلولی شدن آن می‌شود و کیسه رویانی هفت سلولی (شکل ۹) به وجود می‌آید. سه سلول در قطب مجاور سفت استقرار می‌یابند و دستگاه تخم‌زا را به وجود می‌آورند. دستگاه تخم‌زا شامل یک سلول تخم‌زای بزرگ و گلابی شکل است و به واسطه داشتن یک هسته درشت و یک واکوئل بزرگ قابل تشخیص است، و دو سلول کناری (سینرژیدها) است (شکل ۱۰). در قطب بنی، سلولهای آنتی‌پود به وجود می‌آید که آنها نیز آرایشی مثلثی شکل دارند، در نمونه مورد بررسی این سلولها غول پیکر بوده، از قدرت رنگ پذیری بالایی برخوردارند و به سمت مرکز کیسه رویانی مهاجرت می‌کنند (شکل ۱۰). سلولهای آنتی‌پودی بر روی پوستامنت واقع شده‌اند. پوستامنت برجسته می‌شود و آنتی‌پودها را به طرف مرکز کیسه رویانی می‌راند. سلولهای آنتی‌پود، بزرگترین سلولهای کیسه رویانی هستند. سیتوپلاسم آنها متراکم است و هسته کروی یا بیضی شکل



شکلهای ۱۵-۲۲) برخی از مراحل تکوین دانه گرده و بساک در آله آبی

۱۵) بساک در حال تکوین دارای چهار کیسه گرده. ۱۶) سلولهای مادر گرده (PMC) در یک کیسه گرده بساک دیده می‌شوند که آماده تقسیم میوز هستند. در اطراف آنها لایه کالوزی تشکیل شده است (۱۷) (۴۰۰X) اوایل مرحله پروفاز I در سلولهای مادر گرده (۱۸) (۱۰۰۰X). ۱۸) سلولهای مادر گرده در اواخر مرحله پروفاز میوز I. ۱۹) مرحله متافاز در سلولهای مادر گرده و صفحه متافازی از زوایای مختلف قابل رویت است. ۲۰) سلولهای مادر گرده در مرحله آنافاز میوز. ۲۱) سلولهای مادر گرده در مرحله آنافاز میوز. سلولهای تاپی نیز در تصویر دیده می‌شوند. ۲۲) دو کیسه گرده با سلولهای در حال میوز دیده می‌شوند (بزرگنمایی ۴۰۰X).

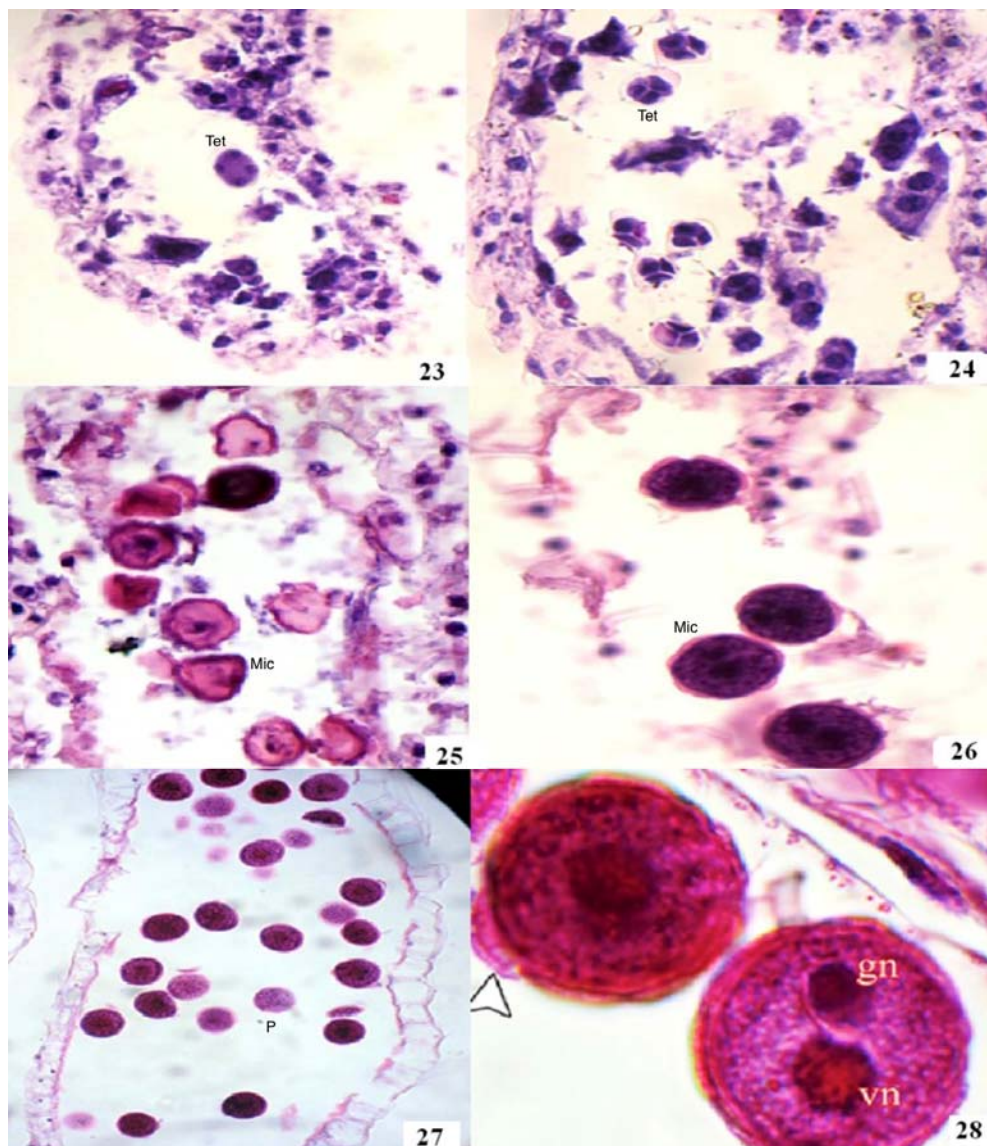
تقسیم می‌باشد (شکل ۱۶). در طی فرآیند میکروسپورزایی، میوز در هر میکروسپور آغاز می‌شود به طوری که پروفاز I (شکل ۱۷ و ۱۸)، متافاز I (شکل ۱۹)، آنافاز I (شکل ۲۰) و تلوفاز I (شکل ۲۱) دو سلول  $n$  کروموزومی تشکیل می‌دهند. سپس وارد دومین تقسیم میوزی می‌شوند و در طی مراحل متافاز II، آنافاز II و تلوفاز II (شکل ۲۲) تتراده‌ها را به وجود می‌آورند. تتراده‌های میکروسپوری از نوع تتراهدرال (شکل ۲۳) هستند. کمی بعد از ورود سلولهای مادر گرده به میوز دیواره کالوزی با حجم زیاد در اطراف آنها تشکیل می‌شود. در مرحله بعد دیواره کالوزی تحلیل رفته و سلولهای تشکیل دهنده تتراده‌ها از هم جدا می‌شوند و میکروسپورهای جوان آزاد می‌شوند، که در زمان آزاد شدن واکنش داده، دارای شکل منظم، سیتوپلاسم متراکم و هسته مشخص در وسط هستند (شکل ۲۵). میکروسپورها میزان نشاسته‌ای شدن بالایی را نشان می‌دهند. به تدریج تزئینات آگزین در میکروسپورها تشکیل می‌شود (شکل ۲۶). تقسیم سلول میکروسپوروسیت دو هسته نابرابر را به وجود می‌آورد: یک هسته بزرگ رویشی و یک هسته زایشی کوچک که منجر به تشکیل دانه گرده دو هسته‌ای و در نهایت دو یاخته‌ای می‌شود (شکل‌های ۲۷ و ۲۸). دانه‌های گرده بالغ سه شیاره بوده که محل رویش لوله گرده هستند، اما در این گونه دانه گرده از نظر اندازه و تعداد شیارها متفاوت بوده، تعداد شیارها از ۳-۵ متغیر بوده و همچنین در مقایسه با دانه‌های گرده سه شیاره دارای اندازه بزرگتری هستند (شکل ۲۸).

### بحث

در خانواده Ranunculaceae توالی بنیان گذاری ماریچی اندامهای گل یک الگو است (۲۳) و یک سطح سیستماتیکی پایین را نشان می‌دهد (۸). در بازال آنژیوسپرم‌ها تخمکهای پرخورش غالب هستند (۲۴) و تیره آلاله در بین تاکسونهای ابتدایی دو لپه‌ای حجیم‌ترین خورش را دارد.

تعداد پرچمها در گونه مورد بررسی پنج عدد است که خامه را در بر گرفته‌اند. در طرح اولیه پرچمها برخی از سلولهای زیر اپیدرمی به آرکتوسپورها تمایز می‌یابند، سپس هر یک از آنها با تقسیمات مماسی خود بافت هاگ زا و لایه‌های جداری میکروسپورانژ را به وجود می‌آورند. سلول هاگ زا با تقسیمات میتوزی تکثیر می‌یابد و توده‌ای از سلولهای مادر گرده را با هسته حجیم ایجاد می‌کنند که رنگ‌پذیری بالایی را نشان می‌دهند (شکل ۱۵). سلولهای حاشیه‌ای نیز با تقسیمات میتوزی خود لایه‌های تشکیل-دهنده دیواره بساک را بنیان‌گذاری می‌کند (شکل ۱۵). این لایه‌ها از بیرون به داخل شامل یک لایه سلول اپیدرمی، یک لایه مکانیکی، یک لایه میانی (موقت) و یک لایه تاپی در مجاورت سلولهای مادر گرده می‌باشد. اپیدرم در این گونه فاقد هر گونه تزئین و کرک می‌باشد. لایه میانی در این نمونه نازک و دارای یاخته‌های کشیده می‌باشد. یاخته‌های لایه تاپی کروی-بیضی، غالباً دو هسته‌ای یا تک هسته‌ای هستند و به سمت حفره داخل بساک رشد می‌کنند (شکل ۱۷ و ۱۶). یاخته‌های لایه تاپی در مراحل مختلف نمو بساک و دانه‌های گرده در جای خود ثابت باقی مانده و تحلیل نمی‌روند (شکل‌های ۱۸-۱۹) بنابراین این لایه از نوع ترشحاتی است. همزمان با بلوغ میکروسپورها به دانه گرده ترشحات لایه تاپی در لابه لای میکروسپورها قابل مشاهده است (شکل ۲۴). در مرحله دانه‌های گرده تک یاخته‌ای و دو یاخته‌ای، یاخته‌های لایه تاپی تقریباً تحلیل می‌روند اما هنوز بقایایی از آنها قابل مشاهده است (شکل ۲۵). لایه موقت در همان مراحل اولیه تکوین گرده‌ها به مصرف می‌رسد. لایه مکانیکی هم در مرحله دانه‌های گرده تک یاخته‌ای و دو یاخته‌ای ضخیم شدگی فیبری را تشکیل می‌دهد (شکل ۲۷).

یاخته‌های هاگ زای تشکیل یافته از یاخته‌های آرکتوسپور مستقیماً به میکروسپوروسیت تمایز می‌یابد، این سلولها دارای هسته درشت و رنگ‌پذیری بالایی دارند و هسته در وسط واقع شده که نشان‌دهنده آمادگی این سلولها برای



شکل‌های ۲۳-۲۸) برخی از مراحل تکوین دامنه‌گرده آلاله آبی

۲۳) تقسیم دوم میوز همراه با سیتوکینز همزمان موجب تشکیل تتراد در بساک شده است. ۲۴) لایه کالوزی اطراف تترادها در حال تحلیل است و میکروسپورهای در حال رهایی دیده می‌شوند. ۲۵) میکروسپورهای آزاد شده تک هسته ای دیده می‌شوند. ۲۶) میکروسپورهای در حال بلوغ دیده می‌شوند. آنها با یک تقسیم میتوز به حالت دوهسته ای در آمده‌اند. بقایای سلولهای لایه تاپی هنوز قابل رویت است. ۲۷) کیسه‌گرده بالغ که فقط لایه مکانیکی آن باقی مانده است و بقیه لایه‌های دیواره بساک از بین رفته‌اند. دانه‌های گرده بالغ دو هسته ای در آن مشهود است. ۲۸) دانه‌های گرده بالغ دو سلولی در این گونه قابل رویت است (بزرگنمایی تصاویر ۲۳ تا ۲۷  $\times 400$  بزرگنمایی تصویر ۲۸،  $\times 400$ ).



وجود چندین آرکتوسپور، از ویژگی‌های تیره آلاله و به طور کلی از خصوصیات تخمک‌های با خورش حجیم و چند لایه-ای است. اما فقط یکی از آنها به سلول مادر مگاسپور (mmc) تمایز می‌یابد. مگاسپوروزن با الگوی رایج در نهاندانگان دولپه انجام می‌شود. مطالعه بر روی مگاسپورائز نشان می‌دهد که شکل تترادها در این تیره دارای تنوع بسیار زیادی است (۷). در *B. fluitans* مگاسپور پس از تشکیل به کیسه رویانی نمو می‌کند و الگوی تکوین کیسه رویانی از تیپ پلی‌گونوم پیروی می‌کند که تیپ رایج در اکثر نهاندانگان است (۱۸).

طول عمر آنتی‌پودها در گیاهان مختلف متفاوت بوده و با تکوین عملکرد ساختارهای خورشی دیگر در ارتباط است. در بین سلولهای کیسه رویانی میزان پایداری آنتی‌پودها بیشترین تنوع را نشان می‌دهد. به طور بسیار رایج آنها مدت کوتاهی پس از لقاح تحلیل می‌روند، اما می‌توانند تا مدت طولانی حتی بعد از لقاح نیز باقی بمانند (۱۱، ۳۵). در این خانواده دو تیپ پلی‌پلوئیدی در سلولهای آنتی‌پود گزارش شده است. پدیده پلی‌پلوئیدی ممکن است در نتیجه اختلال در میتوز باشد برای مثال در برخی از گونه‌های *Anemon* (۳۰، ۳۵، ۱۱)، یا حاصل از اندومیتوز باشد به عنوان مثال در *Ranunculus peltatus* (۳۲) و *Aconitum* (۳۱).

پدیده درون همانند سازی در ۴ گونه از گیاهان تیره آلاله مانند *Aconitum* (۳۲)، در *Helleborus niger* (۱۱) (۳۳) و *R. baudotii* (۴۱) گزارش شده است. در گونه *B. fluitans* آنتی‌پودها از نظر اندازه مساوی هستند و سیتوپلاسم متراکم و هسته هم اندازه دارند و در واقع درجه پلوئیدی یکسانی دارند. توسعه این سلولها در نتیجه ایجاد واکوئل در سیتوپلاسم آنها و نیز افزایش ابعاد هسته‌ها و هستک‌های آنها می‌باشد. در نمونه مورد مطالعه تعدادی از آنتی‌پودها تا مدتی پس از لقاح پایا می‌مانند. بررسیهای سیتوشیمیایی حضور مقادیر بالایی از پروتئینها، لیپیدها، پلی

وضعیت دو پوسته‌ای و میکروپیل اندوستومیک، ویژگیهای ابتدایی هستند و میکروپیل bistomic و تخمک تک پوسته‌ای ویژگیهای اشتقاق یافته اند (۴۰). در نمونه مورد مطالعه تخمک دو پوسته‌ای است و ابتدا پوسته درونی و سپس پوسته بیرونی بنیان گذاری می‌شود. به علاوه پوسته بیرونی از رشد زیادی برخوردار بوده و تعداد لایه‌های آن بیش از دو عدد می‌باشد در حالی که پوسته درونی دو لایه است. در پوسته‌های چند لایه‌ای، اپیدرم و پارانشیم دیده می‌شود (۱). در تشکیل میکروپیل فقط پوسته داخلی دخالت دارد، به عبارتی میکروپیل اندوستومیک است که یک ویژگی ابتدایی محسوب می‌شود. در تیره آلاله تقسیمات مماسی سلولهای اپیدرمی منجر به تشکیل کلاهک خورشی می‌شود. درجه نمو کلاهک، یک ویژگی مخصوص گونه است. کلاهک خورشی در *B. fluitans* ۲-۴ لایه است. در خانواده آلاله کلاهک خورشی می‌تواند موجب تشکیل ایستاز شود (۳۷) که بافتی با دیواره سلولی ضخیم است و در دانه‌های بالغ نیز پایدار می‌ماند. ساختارهای هیپوستاز و پوستامنت در گونه *B. fluitans* مشاهده شد. در واقع در تخمکهای پر خورش، سلولهای بخش نزدیک (به سلولهای آرکتوسپوری) به پوستامنت، سلولهای ناحیه دور به دسته آوندی و سلولهای ناحیه میانی (منطقه مرکزی) به پودیوم و هیپوستاز نمو می‌یابند. همه این ساختارها در حالی که عملکردهای مشابه را انجام می‌دهند از نظر الگوی تشکیل متفاوت هستند. پوستامنت، بافتی با خاستگاه خورشی است که 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 متراکم‌تر و دیواره‌های رنگ پذیرتر قابل تشخیص هستند. پوستامنت در تیره آلاله از لایه‌های محدودی تشکیل شده است و به سمت هیپوستاز توسعه یافته و از نظر ساختاری با سلولهای پروکامبیومی قابل مقایسه هستند (۱۷، ۲۰، ۲۶، ۲).

ویژگی ابتدایی است (۳۶، ۲۱، ۴، ۳، ۵). این دستجات همان تراکئیدها هستند. در نمونه مورد مطالعه دستجات آوندی به خوبی در پوسته‌های تخمک قابل رؤیت است.

ساکاریدها، RNA و DNA را در این سلولها نشان داده است. این سلولها در مرحله اندوسپرم سلولی رو به انحطاط می‌گذارند (۴۱). حضور دستجات آوندی در پوسته‌ها یک

## منابع

- ۱- رضانژاد، ف.، چهرگانی، ع. (مترجم). ۱۳۸۷. رویان‌شناسی گیاهان گلدار (جلد ۱ و ۲). مؤلف: تی.بی.باتی. گینا. انتشارات دانشگاه باهنر کرمان.
- 2- Alimova, G. K. (1990). Family Haemodorace, In T. B. Batygina and M. S. Yakovlev. (eds). Comparative Embryology of Flowering Plants. Butomaceae-Lemnaceae. Nauka, Leningrad, Russia.
- 3- Bhandari, N.N. (1962). Studies in the family Ranunculaceae. III. Development of the female gametophyte in *Adonis annua* L. Phytomorphology, 12: 70-74.
- 4- Bhandari, N.N. (1963). Studies in the family Ranunculaceae. V. The female gametophyte of *Adonis aestivalis* L. A reinvestigation. Phytomorphology, 13: 317-320
- 5- Bhandari, N.N., and Kaplin, R.N. (1964). Studies in the family Ranunculaceae. VII. Two types of embryo sacs in *Trollius* Linn. Beitrage zur Biologie Pflanzen, 40: 113-120.
- 6- Chehregani Rad, A., Mohsenzade, F., Ekhtari, S. and Tajik Esmaeili, S. (2014). Ovule and Megagametophyte Development in *Adonis flamma* Jacqu: Report of Ovule and Embryo Abortion. Journal of Cell & Tissue, 4: 397-405.
- 7- Chehregani Rad, A., Mohsenzadeh, F., Ekhtari, S. (2015). Developmental stages of ovule and embryo sac in *Cosolida orientalis* Schrodinger (Ranunculaceae). Nova Biologica Reporta, 1: 67-76.
- 8- Endress, P.K. (1995). Floral structure and evolution in Ranunculanae. Plant Systematic and Evolution, Suppl., 9: 47-61.
- 9- Ghahremaninegad, F., Nejad Falatoury, A. (2016). An update on the flora of Iran: Iranian angiosperm orders in accordance with APCIV. Nova Biologica Reporta, 3: 80-107.
- 10- Greilhuber, J., Dolezel, J., Lysak, M.A., and Bennett, M.D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. Annals of Botany, 95: 255-260.
- 11- Hasitschka-Janschke, G. (1959). Vergleichende karyologische Untersuchungen an Antipoden. Chromosoma, 15: 229-267.
- 12- Heywood, V.H., Brummitt, R., and Culham, A. (2007). Flowering plant Families of the world. Buffalo, N.Y., USA.
- 13- Hotchinson, J. (1923). Contributions towards a phylogenetic classification of flowering plants. Kew Bulletin, 1:65-89.
- 14- Jennsen, U., Hoot, S.B., Johansson, J.T., Kosuge, K. (1995). Systematics and phylogeny of the Ranunculaceae – a revised family concept on the basis of molecular data. Plant Systematics and Evolution, 9:273-280.
- 15- Johansson, J.T., and Jansen, R.K. (1993). Chloroplast DNA variation and phylogeny of the Ranunculaceae. Plant Systematics and Evolution, 187:29-49.
- 16- Johri, B.M., and Ambegaokar, K.B. (1992). Srivastava PS. Comparative embryology of angiosperms. 1 and 2. Berlin: Springer-Verlag, Germany.
- 17- Joshi, A.C. and Venkateswarlu, J. (1935). Embryological studies in the Lythraceae. I. *Lawsonia inermis*. Proc. Indian Acad. Science. Setion B, Biological Sciences (Bangalore, Lndia), 2: 481-493.
- 18- Kordyum, E.L. (1959). On the modes of reproduction of endosperm nuclei in *Nigella sativa*. Ukrainskyi Botanichnyi Zhurnal, 14: 40-46.
- 19- Kozieradzka-Kiskurno, M, and Bohdanwicz, J. (2003). *Sedum acre* embryogenesis: Polyploidization in the suspensor Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45: 153-157.
- 20- Mück, M. (1980). Über den Bau und die Entwicklung der Früchte und über die Herkunft von *Acorus calamus* L. Bot. Zeitung, 66: 1-23.

- 21- Öztürk, R., Ünal, M. (2003). Cytoembryological studies on *Paeonia peregrina* L. Journal of Cell and Molecular Biology, 2: 85-89.
- 22- Raghavan, V. (1997). *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 23- Ren, Y., Chang, H.-L., Tian, X.-H., Song, P., and Endress, P.K. (2009). Floral development in *Adonideae* (Ranunculaceae). *Flora*, 204: 506-517.
- 24- Ren, Y., Li, Z.J., Chang, H.L., Lei, Y.J., and Lu, A.M. (2004). Floral development of *Kingdonia* (Ranunculaceae s. l., Ranunculales). *Plant Systematic and Evolution*, 247: 145-153.
- 25- Ro, K.E., Keener, C.S., and McPherson, B.A. (1997). Molecular phylogenetic study of the Ranunculaceae: Utility of the nuclear 26S Ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8:117-12
- 26- Shamrov, I. I. and Nikiticheva, Z. I. (1992). The ovule and seed morphogenesis in *Gymnadenia conopsea* (Orchidaceae): structural and histochemical investigation. *Bot. Zhurnal*, 77: 45-60.
- 27- Simpson, M.G. (2006). *Plant Systematics*. Academic Press, USA.
- 28- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W. and P. K. Endress. 2004. Angiosperm phylogeny, classification, and evolution. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA.
- 29- Tamura, M. (1966). Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae. VI. Science Reports Osaka University, 15:13-35.
- 30- Trela, Z. (1963). Embryological studies in *Anemone nemorosa* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 6: 1-14.
- 31- Tschermak-Woess, E. (1956). Notizen über die Riesenkerne und "Riesenchromosomen" in den Antipoden von *Aconitum*. *Chromosoma*, 8: 114-134.
- 32- Turala-Szybrowskak, A. and Wedzony, M. (1981). Endopolyploidy in the antipodals of *Ranunculus subgenus Batrachium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 50: 161-164.
- 33- Turala-Szybrowskak, and Wolanska, J. (1989). Two mechanisms of polyploidization of the antipodals in *Aquilegia vulgaris* L. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 31: 63-74.
- 34- Turala-Szybrowskak. (1980). Endopolyploidy in the antipodals of *Ranunculus peltatus* Schrank. and *R. penicillatus* (Dumort.) Bab. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 22: 163-173.
- 35- Unal, M. (1984). Embryological studies on *Anemone coronaria*. *Istanbul Universitesi Fen Fakültesi Mecmuasi*, 49: 89-97.
- 36- Unal, M., Vardar, F. (2006). Embryological Analysis of *Consolida Regalis* L.(Ranunculaceae). *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 48: 27-32.
- 37- Van Tieghem, Ph. (1951). Epideeapharide genre nouveau Luxembourgiciées. *J. Bot. France*, 15: 375-389.
- 38- Vijayaraghavan, M.R. and Bhandari, N.N. (1970). Studies in the family Ranunculaceae: Embryology of *Thalictrum japonicum* Bl. *Flora*, 159: 450-458.
- 39- Wang, W., and Chen, Z.D. (2007). Generic level phylogeny of Thalictroideae (Ranunculaceae) – implications for the taxonomic status of *Paropyrum* and petal evolution. *Taxon*, 56:811-821.
- 40- Wang, Z., Ren, Y. (2007): Ovule Morphogenesis in Ranunculaceae and its Systematic Significance. *Oxford Journals* 101:447-464.
- 41- Wedzony, M. (1982). Endopolyploidy and structure of nuclei in the antipodals and synergids of *Ranunculus baudotii* Godr. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 24: 43-62.
- 42- Xue, C.Y., Li, D.Z. (2005). Embryology of *Megacodon stylophorus* and *Veratrilla baillonii* (Gentianaceae): Descriptions and systematic.
- 43- Yeung, E.C. 1984. – Histological and histochemical staining procedures. In: Vasil, IK. (ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press. Orlando, Florida. 689-697.

## Development of anther, ovule, male and female gametophytes in *Batrachium fluitans*

Rajabifar P.<sup>1</sup> and Chehregani Rad A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Broujerd Branch, Islamic Azad University, Broujerd, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biology Dept., Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

### Abstract

Although there is extensive literature on aspects of floral structure and embryology in Ranunculaceae, the distribution of developmental studies in the family is unequal. There are several studies on some genera but some other genera including *Batrachium* are less investigated or even unstudied. Embryological characteristics of *Batrachium fluitans* were studied in this research. The flowers and buds, in different developmental stages, were removed, fixed in FAA<sub>70</sub>, stored in 70% ethanol, embedded in paraffin and sliced with a microtome. Staining was carried out with Hematoxylin and Eosine. Results indicated that ovules are anatropous, bitegmic and crassinucellate. The megaspore tetrads are linear or T-shaped. The development of embryo sac conform to the Polygonum type and fertilization of central cell is prior to ovule. Results showed that development of stamens is beginning with the formation of ovular shaped cell mass on the receptacle. They are five in number and surrounding style. Anther wall composed of an epidermis, an endothecium, a transitional layer and a tapetum layer adjusted to pollen mother cells. Tapetum cells remain in their position, at the developmental stages, and they are of secretory ones. Microspore tetrads are tetrahedral. Microspores are not vacuolated and showed regular shape with condensed cytoplasm and centrally located nucleus. Mature pollen grains are two-celled one.

**Key words:** Ranunculaceae; Development, Ovule, Embryo sac, Pollen grain