

Ontogenetic Study of Pollen Grain in *Tribulus terrestris* of the family Zygophyllaceae

Somayeh Asghari^{*1}, Mahdieh Houshani²

1. Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Health Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
som.asghari28@yahoo.com

2. Department of Plant Physiology, To.C., Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
mhoshani@yahoo.com

* Corresponding Author: som.asghari28@yahoo.com, ORCID: 0000-0002-0458-2496

Received: 04/04/2026 Revised: 08/04/2026 Accepted: 13/04/2026

Abstract

Aim and Background: Pollen grain, the male gametophyte of flowering plants, is a microscopic structure that completes its development in the anther of the stamen and plays a key role in the reproductive cycle of higher plants. Therefore, an increasing number of studies have been focused on its development. The aim of the present research was the ontogenetic study of pollen and anther development in *Tribulus terrestris*. *Tribulus terrestris* is an annual herb of the family Zygophyllaceae, native to warm temperate and tropical regions of southern Europe, southern Asia, throughout Africa and Australia.

Materials and Methods: Young buds and flowers of the species were collected at different stages of anther development and were immediately fixed in FAA (formalin, glacial acetic acid, alcohol) fixator. The anther and pollen development were studied using light and epi-illumination microscopy technique after preparing the samples and standard staining methods.

Results: Our results revealed that the anther is tetrasporangiated. The anther wall development follows the basic type, which is composed of an epidermal layer, an endothelial layer, two middle layers and tapetum. The tapetum is of secretory type and its cells are uniseriate and uninucleate. The meiosis of microspore mother cells (MMC)s is of the simultaneous type and the microspore tetrads are tetrahedral. Pollen grains are spheroidal, pantoporate and shed at the tricellular stage.

Conclusion: The obtained results shed novel information on the development of pollen and anther in the family Zygophyllaceae.

Keywords: Anther, Ontogeny, Pollen, *Tribulus terrestris*

مطالعه تکوین دانه گرده در گیاه خارخسک (*Tribulus terrestris*) از

تیره اسپند (Zygophyllaceae)

سمیه اصغری^{۱*}، مهدیه هوشنی^۲

۱. دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. som.asghari28@yahoo.com

۲. گروه فیزیولوژی گیاهی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. mhoshani@yahoo.com

* نویسنده مسئول: som.asghari28@yahoo.com, ORCID: 0000-0002-0458-2496

تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۵/۰۱/۱۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۱/۲۴

چکیده

سابقه و هدف: دانه گرده یا گامتوفیت نر، یک ساختار میکروسکوپی است که مراحل نمو خود را در بساک پرچم کامل می‌کند و نقش مهمی در چرخه تولیدمثلی گیاهان عالی ایفا می‌کند. از این رو تعداد زیادی از مطالعات بر روی نمو دانه گرده متمرکز شده‌اند. هدف از پژوهش حاضر مطالعه تکوین دانه گرده و بساک در گیاه خارخسک است. گونه خارخسک گیاهی یک‌ساله از خانواده اسپند است که بومی نواحی گرمسیری و معتدل گرم در جنوب اروپا و آسیا، سراسر آفریقا و استرالیا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: جوانه‌ها و گل‌های خارخسک در مراحل مختلف نمو بساک جمع‌آوری و بلافاصله در فیکساتور فرمالین استیک الکل (FAA) تثبیت شدند. نمو بساک و دانه گرده پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و رنگ‌آمیزی متعارف، با استفاده از میکروسکوپ نوری و انعکاسی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج به‌دست‌آمده بساک متشکل از چهار کیسه گرده است و نمو دیواره آن از نوع اولیه می‌باشد که شامل یک لایه اپیدرمی، یک لایه آندوتسیومی، دو لایه میانی و تپتوم می‌باشد. تپتوم از نوع ترش‌حی است و سلول‌های تپتومی

تک‌هسته‌ای‌اند و در یک لایه قرار می‌گیرند. میوز سلول‌های مادر میکروسپور از نوع هم‌زمان و تتراد میکروسپورها از نوع تتراهیدرال می‌باشد. دانه‌های گرده کروی‌شکل و دارای منافذ متعدد در تمام سطح خود می‌باشند و در مرحله سه‌سلولی از بساک آزاد می‌شوند.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده اطلاعات تازه‌ای را در مورد تکوین بساک و دانه گرده در خانواده اسپند ارائه می‌دهد.

کلمات کلیدی: بساک، تکوین، خارخسک، دانه گرده.

۱. مقدمه

چرخه زندگی گیاهان گلدار با یک تناوب بین نسل غالب اسپوروفیتی و نسل بسیار کاهش‌یافته گامتوفیتی مشخص می‌شود. نسل اسپوروفیت، اسپورها را به‌دنبال تقسیمات میوزی سلول‌های مادر اسپور تولید می‌کند. اسپورها نیز از طریق تقسیمات میتوزی ساده نسل گامتوفیت را تشکیل می‌دهند [۱]. تولید اسپورها و تشکیل گامت‌ها وقایع مهم در چرخه تولیدمثل جنسی در گیاهان هستند. گیاهان گلدار از لحاظ مورفولوژیکی دو نوع گامتوفیت متفاوت دارند: گامتوفیت نر و گامتوفیت ماده، کیسه جنینی، گامتوفیت ماده و دانه گرده، گامتوفیت نر (میکروگامتوفیت) است. یک میکروگامتوفیت، گامتوفیت تولیدکننده گامت‌های کوچک (سلول‌های اسپرم) می‌باشد [۲].

دانه گرده یک نسل گامتوفیتی هاپلوئید کوچک با عمر کوتاه و شامل دو یا سه سلول می‌باشد. مهم‌ترین ویژگی دانه گرده، دیواره آن است که از دیواره هر سلول گیاهی دیگر کاملاً متفاوت می‌باشد [۳ و ۴]. در نهان‌دانگان، دیواره دانه گرده معمولاً دو لایه‌ای است. لایه داخلی که پروتوپلاست دانه گرده را احاطه می‌کند، انتین و لایه خارجی که دارای تزئینات فراوان و متنوعی است، اگزین نام دارد. اگزین از نظر ساختاری پیچیده‌ترین دیواره سلول گیاهی است و تنوع مورفولوژیکی بسیار زیاد آن اساس علم گرده‌شناسی است. ویژگی‌های ساختاری دانه‌های گرده در مرزبندی تاکسون‌ها یا بررسی‌های فیلوژنتیکی بسیار بارزش‌اند. تقریباً تمام خانواده‌های گیاهی، بیشتر جنس‌ها و تعدادی از

گونه‌های گیاهی را می‌توان از روی دانه گرده آن‌ها برپایه ویژگی‌هایی مانند اندازه، شکل، تعداد دریچه‌ها و تزئینات روی اگزین شناسایی کرد [۵ و ۶].

مطالعه جنبه‌های سیتولوژیکی و تکوینی میکروسپورزایی و میکروگامتوفیت‌زایی در سطح میکروسکوپ نوری، از قرن نوزدهم شروع شده است و تاکنون نیز ادامه دارد. در سال‌های اخیر مطالعات بیوشیمیایی، هیستوشیمیایی و فراساختاری اطلاعات جدیدی را در مورد چگونگی توزیع ارگانل‌ها و تجزیه و سنتز ماکروملکول‌ها در جریان میکروسپورزایی و نمو گرده، سیتوشیمی و بیوشیمی سلول‌های گرده و ساختار اسپرم فراهم آورده‌اند [۱]. با توجه به این‌که تکثیر جنسی در گیاهان به ساختار و عملکرد دانه گرده وابسته است و همچنین با توجه به اهمیت مورفولوژی دانه گرده در بررسی‌های سیستماتیکی و فیلوژنتیکی و اهمیت مطالعه تکوین دانه گرده در بررسی جنبه‌های مختلف مطالعه بیولوژی گیاه مانند تعیین سرنوشت سلول، تمایز سلول و مطالعه قطبیت سلول، در این تحقیق سعی شده است مراحل نمو دانه گرده در گونه خارخسک مورد بررسی قرار گیرد؛ با اطلاع از این‌که تاکنون این موضوع مورد تحقیق قرار نگرفته است. خارخسک گیاهی علفی و یک‌ساله با انشعابات گسترده بر سطح خاک از تیره اسپند است [۷]. بیشتر اعضای متعلق به تیره اسپند به‌خاطر داشتن ترکیباتی از قبیل آلکالوئیدها و ساپونین‌ها دارای کاربرد دارویی هستند و در طب سنتی و نوین مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ بنابراین مورد توجه خاص می‌باشند [۸].

دلایل مهمی که علاوه بر اهمیت دارویی باعث شده تا این گیاه به‌عنوان نمونه مطلوب در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گیرد عبارت‌اند از گل‌دهی فراوان در زمان نسبتاً طولانی از سال توسط بوته‌های گیاه و درشت بودن سلول‌های تشکیل‌دهنده بساک که امکان سهولت مطالعه مراحل نمو دانه گرده را فراهم می‌آورند [۹].

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی شامل غنچه‌ها در مراحل مختلف نمو و گل‌های نیمه‌شکفته گیاه خارخسک جهت مطالعات نمو، هیستولوژیکی و سیتوشیمیایی از محوطه دانشگاه

تبریز جمع‌آوری شد.

۲-۲. بررسی‌های بافت شناختی

نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به مدت حداقل ۲۴ ساعت در استیک فرمالین الکلی (۵ درصد اسید استیک، ۵ درصد فرمالین، ۹۰ درصد الکلی ۵۰ درجه) تثبیت شدند و پس از شست‌وشو در آب مقطر در سری‌های اتانول با درجات فزاینده، آبگیری شدند. سپس جهت شفاف‌سازی به گزیزول منتقل شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در پارافین مذاب با درجه حرارت ۶۰ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس برش‌هایی با ضخامت ۱۰-۸ میکرومتر با استفاده از میکروتوم R-Jung-Heidelberg تهیه شدند. در نهایت لام‌ها در گزیزول شفاف‌سازی و به‌دنبال آن در سری‌های اتانول هیدراته شده و رنگ‌آمیزی شدند. جهت مطالعات هیستولوژیکی از دو روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و روش مضاعف پرئودیک اسید شیف-هماتوکسیلین طبق روش پیشنهادی توسط جنسن (Jensen, 1962) استفاده شد [۱۰]. در این روش پلی‌ساکاریدها با رنگ ارغوانی و هسته و هستک‌ها با رنگ بنفش تیره مشخص می‌شوند. در نهایت نمونه‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ SMZ 1500 Nikon مجهز به دوربین دیجیتال کانن (Canon) بررسی و عکسبرداری شدند. هر یک از مراحل تکوین دانه‌گرده و بساک در چندین برش (حداقل ده نمونه برای هر مرحله) بررسی شد.

۲-۳. آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعه با میکروسکوپ انعکاسی

نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل شده و حداقل به مدت ۲۴ ساعت در استیک فرمالین الکلی (۵ درصد اسید استیک، ۵ درصد فرمالین، ۹۰ درصد الکلی ۵۰ درجه) تثبیت شدند. پس از شست‌وشو با آب جاری به مدت ۱۵ دقیقه، نمونه‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در الکلی ۷۰ درجه آبگیری و به منظور آبگیری بیشتر به الکلی ۹۶ درجه انتقال یافتند. سپس با استفاده از سوزن‌های نوک‌تیز ویژه از جنس آلایژ نیکل-کروم فلس‌برداری و حذف کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها جهت آشکار شدن پرچم‌ها انجام گردید. در نهایت رنگ‌آمیزی نمونه‌های گیاهی طبق روش پیشنهادی چارتون و همکاران

(Charlton et.al, 1989) درون نیگروزین ۵/۰٪ محلول در الکل ۱۰۰٪ به مدت ۷۲ ساعت انجام شد [۱۱]. نمونه‌ها قبل از بررسی میکروسکوپی در اتانول ۹۶٪ به مدت ۲۴ ساعت شست‌وشو شدند. مشاهدات میکروسکوپی نمونه‌ها در حالی که در اتانول غوطه‌ور بودند با استفاده از میکروسکوپ تحقیقاتی نیکون مدل E600 مجهز به دوربین دیجیتالی DXM-1200 با وضوح تصویری ۱۲ میلیون پیکسل انجام گرفت. در این میکروسکوپ از منبع نور مرکوری با شدت نور بالا در حالت زمینه تاریک استفاده شد که ابژکتیوهای آن مخصوص نور بازتابشی با تصحیح نوری بالا بودند. قدرت تفکیک این ابژکتیوها امکان مشاهده سلول‌های سطحی اندام‌ها را کاملاً مهیا می‌سازد. تصاویر دیجیتالی که به‌صورت سری تهیه شده بود با درجه وضوح ۱۲ مگاپیکسل با فرمت TIFF ذخیره شدند و توسط نرم‌افزار Helicon Focus و 7 Photoshop ادغام شدند [۱۲].

۳. نتایج

۳-۱. **تمایز بساک و میکروسپورزایی:** در برش‌های تهیه شده از غنچه‌های بسیار کوچک، سه لایه سلولی مشخص را در پریموردیوم نواخته بساک این گیاه می‌توان مشاهده کرد که از بیرون به درون عبارت‌اند از: L1، L2 و L3 (شکل ۱-۱). سلول‌های لایه L1 به‌صورت آنتی‌کلینال تقسیم می‌شوند و در نهایت به اپیدرم تمایز می‌یابند. سلول‌های لایه L2 منشأ تشکیل سلول‌های آرکسپورال می‌شوند. سلول‌های لایه L3 که نسبت به دو لایه دیگر کوچک‌تر هستند، سیستم آوندی و بافت رابط بساک را تشکیل می‌دهند.

با رشد پریموردیوم بساک، سلول‌های هیپودرمی در چهار گوشه پریموردیوم در جهت شعاعی توسعه می‌یابند و سلول‌های آرکسپورال را با هسته مشخص و سیتوپلاسم متراکم به‌وجود می‌آورند (شکل ۱-۲). سپس هر سلول آرکسپورال به‌صورت پری‌کلینال تقسیم می‌شود و یک سلول کناری اولیه را به‌سمت بیرون و یک سلول اسپورزای اولیه را به‌سمت درون تشکیل می‌دهد (شکل ۱-۳). همان‌گونه که در شکل ۱-۲ مشاهده می‌شود فرایند تقسیم در سلول‌های آرکسپورال به‌صورت هم‌زمان رخ نمی‌دهد. یکی از سلول‌های آرکسپورال در مرحله آنافاز و دیگری در مرحله متافاز قرار دارد. سلول‌های

کناری اولیه در مرحله بعد به صورت پری‌کلینال تقسیم می‌گردند (شکل D-۱) و در نتیجه این تقسیمات، دو دسته سلول کناری ثانویه به سمت بیرون و درون تشکیل می‌شود (شکل E-۱). دسته داخلی سلول‌های کناری ثانویه که مجاور سلول‌های اسپورزا قرار می‌گیرند، به صورت پری‌کلینال تقسیم شده (شکل F-۱) که در نتیجه این تقسیم نیز دو لایه سلول حاصل می‌شود. سلول‌های لایه داخلی به سلول‌های تپتومی نمو می‌یابند و سلول‌های لایه بیرونی منشأ تشکیل یک لایه میانی می‌شوند. در نهایت بساک در این مرحله به ساختار دولوبی با دو کیسه گرده متقارن شعاعی در هر لوب نمو می‌یابد به طوری که در هر کیسه گرده، ۵ لایه سلول را می‌توان به خوبی تشخیص داد (شکل ۱-۱-F). دسته بیرونی سلول‌های کناری ثانویه نیز به صورت پری‌کلینال تقسیم می‌شوند و دومین لایه میانی را به سمت داخل و آندوتسیوم را به سمت بیرون به وجود می‌آورند. سلول‌های اسپورزای اولیه نیز طی این مراحل با تقسیمات میتوزی در سطوح مختلف به میکروسپوروسیت‌ها (سلول‌های مادر دانه گرده) نمو می‌یابند (شکل A-۲).

با توجه به شکل A-۲، در هر لوب بساک ۶ لایه سلول مشاهده می‌شود که از خارج به داخل عبارت‌اند از: اپیدرم، آندوتسیوم، دو لایه میانی، تپتوم و میکروسپوروسیت‌ها. میکروسپوروسیت‌ها به طور شاخص نسبت به سلول‌های دیگر بزرگ‌تر هستند و در اشکال زاویه‌دار با سیتوپلاسم متراکم، یک هسته بزرگ، اکثراً دارای یک هستک و به ندرت دو هستک تیره‌رنگ در مرکز هر لوکول قرار می‌گیرند. سلول‌های تپتومی به واسطه شکل و موقعیت خود بین میکروسپوروسیت‌های درشت‌تر و لایه میانی باریک‌تر از دیگر سلول‌ها متمایز می‌شوند. این سلول‌ها در اشکال مستطیلی و با سیتوپلاسم متراکم، یک هسته بزرگ و هستک‌های متعدد مشاهده می‌شوند. برخی از سلول‌های تپتومی در این مرحله واکوئلیزه‌اند (شکل A-۲). سلول‌های اپیدرمی در اشکال تیپیک مکعبی شکل که به طور منظم کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند، مشاهده می‌شوند و بسیاری از آن‌ها واکوئلیزه می‌باشند. (شکل A-۲). خارجی‌ترین لایه حاصل از تقسیم سلول کناری که بلافاصله زیر اپیدرم بساک قرار می‌گیرد، آندوتسیوم نام دارد. همچنین بسیاری از سلول‌های آندوتسیومی نیز در این مرحله واکوئلیزه می‌باشند. در زیر آندوتسیوم دو لایه سلول پارانشیمی با دیواره نازک به نام لایه‌های میانی وجود دارد که در طی نمو دانه گرده به هم

فشرده می‌شوند و در نهایت در بساک بالغ از بین می‌روند (شکل ۲-۲A).

همان‌طور که در تصویر ۲-۲B نشان داده شده درست قبل از میوز هر یک از میکروسپوروسیت‌ها، یک دیواره کالوزی ضخیم را بین غشای پلاسمایی و دیواره سلولزی اولیه ترشح می‌کنند. همچنین سیتوپلاسم سلول‌های مادر میکروسپور در این مرحله نسبت به مرحله قبل متراکم‌تر و هسته نیز تیره‌تر می‌باشد. از تغییرات مشاهده شده در سلول‌های تپتومی در این مرحله می‌توان به افزایش تراکم سیتوپلاسم، افزایش حجم و اندازه در جهت شعاعی و قطبی شدن این سلول‌ها به صورت تشکیل یک واکوئل درشت به طرف لوکول و رانده شدن هسته به همراه بقیه سیتوپلاسم به طرف لایه میانی اشاره کرد (شکل ۲-۲B).

سلول‌های مادر میکروسپور در مرحله بعدی نمو، متحمل تقسیم میوزی شده و تتراد میکروسپورها را تشکیل می‌دهند. در نتیجه میوز، هر یک از میکروسپورهای هاپلوئید در تتراد، با دیواره کالوزی پوشیده می‌شوند. با توجه به آرایش فضایی میکروسپورها در تتراد، تترادها از نوع تتراهیدرال می‌باشند (شکل ۲-۲C). تغییرات عمده و چشمگیری در هسته و سیتوپلاسم سلول‌های تپتومی در این مرحله مشاهده می‌شود که از آن میان می‌توان به آغاز جمع‌شدگی‌های سیتوپلاسمی و تشکیل فضاهای بین غشایی در فاصله میان دیواره و سیتوپلاسم اشاره کرد (شکل ۲-۲D). به دنبال کامل شدن سیتوکینز در شروع مرحله تتراد، لایه اگزین دیواره دانه گرده در اطراف هر میکروسپور شروع به شکل‌گیری می‌کند (شکل ۲-۲D). بر این اساس الگوی شکاف‌ها (نوع، تعداد و موقعیت شکاف‌ها) در اواخر مرحله تتراد کاملاً مشهود می‌باشد. شکاف‌ها در اشکال مدور و به تعداد فراوان در تمام سطح میکروسپور دیده می‌شوند. ویژگی قابل مشاهده دیگر در این مرحله افزایش قابل توجه جمع‌شدگی‌های سیتوپلاسمی در سلول‌های تپتومی می‌باشد (شکل ۲-۲E). در مرحله بعد میکروسپورهای هر تتراد به واسطه انحلال دیواره کالوزی از تتراد آزاد و به درون لوکول بساک رها می‌شوند (شکل ۲-۲F). میکروسپور سلول مدوری است که شامل یک هسته بزرگ، یک هستک برجسته و سیتوپلاسم متراکم می‌باشد. همچنین دیواره اگزین دانه گرده در این مرحله به شکل گرفتن ادامه می‌دهد و به تدریج بخش‌های سازنده آن مشخص می‌شوند (شکل ۲-۲F).

۲-۳. میکروگامتوفیت‌زایی

۳-۲-۱. نخستین میتوز دانه گرده، تشکیل سلول رویشی و زایشی و ویژگی‌های سیتولوژیکی آن‌ها

در ابتدای میکروگامتوفیت‌زایی، میکروسپورها با جذب و ذخیره آب در واکوئل توسعه می‌یابند. در اوایل مرحله میکروسپور واکوئله، یک یا چند واکوئل کوچک در سیتوپلاسم میکروسپور تشکیل می‌شود. همچنین میکروسپورها به‌طور قابل توجهی دارای دیواره ضخیم‌تری هستند به‌طوری‌که تزئینات لایه اگزین در آن‌ها کاملاً مشخص می‌باشد و می‌توان بخش‌های سگزین و نگزین را در آن تشخیص داد. سیتوپلاسم میکروسپور به تدریج تراکم خود را از دست می‌دهد و ذخایر غذایی آن جهت ضخیم شدن دیواره دانه گرده مورد استفاده قرار می‌گیرد. مضافاً از تراکم سیتوپلاسم سلول‌های تیتومی نیز کاسته می‌شود و به‌نظر می‌رسد که محتویات سیتوپلاسمی این سلول‌ها از این مرحله شروع به ناپدید شدن می‌کنند (شکل ۳-۳A).

در اواخر مرحله میکروسپور واکوئله، واکوئل‌های کوچک یک میکروسپور به یکدیگر می‌پیوندند و یک واکوئل بزرگ را تشکیل می‌دهند که بخش اعظم سیتوپلاسم دانه گرده را اشغال می‌کند. هسته به همراه بقیه سیتوپلاسم در موقعیت جانبی قرار می‌گیرد. میکروسپورها در این مرحله به دلیل تشکیل واکوئل بزرگ، تقریباً از ذخایر غذایی تهی می‌شوند. رخداد قابل توجه دیگر در این مرحله، آغاز شکل‌گیری دیواره انتین دانه گرده است که به صورت لایه نازک پیوسته بین اگزین و غشای پلاسمایی مشاهده می‌شود و ضخامت آن در مراحل بعدی نمو افزایش می‌یابد. این دیواره به رنگ ارغوانی مشاهده می‌شود و بنابراین دارای ماهیت پکتوسلولوزی است (شکل ۳-۳B).

در مرحله بعد، میکروسپور یک تقسیم میتوزی نامتقارن انجام می‌دهد که نتیجه این تقسیم تشکیل یک سلول رویشی واکوئلیزه بزرگ و یک سلول زایشی عدسی شکل کوچک می‌باشد که به غشای سلول رویشی متصل است و توسط یک دیواره نازک کالوزی از آن جدا می‌شود. به عبارت دیگر در این مرحله دانه گرده دو سلولی واکوئله تشکیل می‌گردد (شکل ۳-۳C). سپس سلول زایشی پس از انحلال دیواره کالوزی، از دیواره دانه گرده جدا می‌شود و در سیتوپلاسم سلول رویشی قرار می‌گیرد و شکل آن

به تدریج از کروی شکل به دوکی شکل تغییر می‌کند. ذخایر غذایی جدید در دانه گرده شروع به انباشته شدن می‌کنند. همچنین سلول‌های تپتومی که بخش عمده محتویات خود را از دست داده‌اند، از این مرحله شروع به متلاشی شدن می‌کنند. رخداد مهم و قابل توجه دیگر در سلول‌های تشکیل‌دهنده دیواره بساک در این مرحله، آغاز توسعه یافتگی سلول‌های آندوتسیومی جهت شکوفایی بساک می‌باشد و یک هسته بزرگ در برخی از این سلول‌ها مشاهده می‌شود. علاوه بر این ضخیم‌شدگی‌های رشته‌ای دیواره نیز در این سلول‌ها پدیدار می‌گردد. همچنین سلول‌های تپتومی در این مرحله تقریباً تمام محتویات خود را از دست داده و متلاشی می‌شوند و مواد حاصل از آن بر روی دیواره اگزین دانه گرده قرار می‌گیرند (شکل ۳-۳D).

۳-۲-۲. دومین میتوز دانه گرده و تشکیل اسپرم‌ها

براساس مشاهده برش‌های متعدد، دانه گرده خارخسک از نوع سه سلولی است. به عبارت دیگر سلول زایشی در این مرحله متحمل یک تقسیم میتوزی متقارن شده و در نتیجه آن دو سلول اسپرم تشکیل می‌شود که به یکدیگر متصل می‌باشند (شکل ۴-۳A). همچنین سلول‌های تشکیل‌دهنده لایه میانی مجاور تپتوم در این مرحله از بین می‌روند. رخداد مهم دیگر در این مرحله از بین رفتن سپتوم و الحاق دو کیسه گرده در هر لوب و در نهایت تشکیل بساک دو لوکولی می‌باشد (شکل ۴-۳B). در مرحله آخر، دو سلول اسپرم از یکدیگر جدا شده و دانه گرده سه سلولی تشکیل می‌شود. در این مرحله نیز واکوئل سلول رویشی مشاهده می‌شود، اما اندازه آن بسیار کاهش یافته است (شکل ۴-۳C). همچنین دومین لایه میانی تشکیل‌دهنده دیواره بساک از بین رفته و دانه گرده سه سلولی پس از شکافته شدن استومیوم و شکوفایی کامل بساک آزاد می‌شود (شکل ۴-۳D).

۳-۳. بررسی فرایند شکوفایی بساک توسط میکروسکوپ انعکاسی

براساس نتایج به دست آمده از مطالعات میکروسکوپ نوری، وقایع اصلی که طی فرایند شکوفایی بساک در خارخسک روی می‌دهد شامل از بین رفتن تپتوم و لایه میانی،

توسعه لایه آندوتسیومی و تشکیل نوارهای رشته‌ای در این سلول‌ها جهت افزایش ضخامت دیواره، از بین رفتن سپتوم و الحاق دو کیسه‌گرده در هر لوب و در نهایت گسستگی استومیوم و آزاد شدن دانه‌های گرده از بساک می‌باشد. همچنین این فرایند در دو مرحله درست قبل از شکوفایی کامل و مرحله پس از شکوفایی کامل بساک با استفاده از میکروسکوپ انعکاسی مورد مطالعه قرار گرفت. شکل A-۵ مقطع عرضی یک بساک چهارلوبی را در مرحله‌ای که سپتوم در آن مشاهده می‌شود، نشان می‌دهد. در تصاویر B-۵ و C ناپدید شدن سپتوم و دو لوبی شدن بساک مشاهده می‌گردد. سرانجام گشودگی استومیوم در تمام طول هر جفت کیسه‌گرده رخ می‌دهد، بساک به‌طور کامل شکوفا می‌گردد و دانه‌های گرده از آن آزاد می‌شوند و بر روی کلاله مادگی قرار می‌گیرند (شکل D-۵، E و F).

۴. بحث

۴-۱. کاربرد مطالعه تکوین دانه‌گرده گونه خارخسک در بررسی‌های سیستماتیکی و فیلوژنتیکی

مطالعات جنین‌شناسی در گیاهان گلدار شامل نمو کیسه‌های گرده، میکروسپورها، دانه‌های گرده، تخمک‌ها، مگاسپورها، گامتوفیت ماده و دانه‌ها می‌باشد. اطلاعات جنین‌شناسی در بررسی‌های سیستماتیکی و فیلوژنتیکی به‌خصوص در سطوح بالاتر تاکسونومی بسیار باارزش می‌باشند [۶]. براساس نتایج ما نمو بساک و تکوین دانه‌گرده در خارخسک براساس تیپ دو لپه‌ای انجام می‌گیرد و می‌تواند به دو مرحله کلی تقسیم شود [۱۳]. طی مرحله یک مورفولوژی بساک شکل می‌گیرد، تمایز سلول و بافت رخ می‌دهد و سلول‌های مادر میکروسپور متحمل می‌شوند و تتراد میکروسپورها را به‌وجود می‌آورند؛ بنابراین در پایان مرحله یک، بساک بیشترین بافت‌ها و سلول‌های تخصص‌یافته را شامل می‌شود طی مرحله دو بساک توسعه می‌یابد، دانه‌های گرده تمایز حاصل می‌کنند و دژنره شدن بافت، شکوفایی بساک و آزاد شدن دانه‌های گرده رخ می‌دهد. فرایندهای تمایز سلولی و شکوفایی از لحاظ زمانی به‌طور منظم صورت می‌گیرند و با اندازه‌ها ارتباط دارند. براساس نتایج حاصل از این بررسی، بساک

تریبولوس ترستریس یک ساختار چهار لوبی با تقارن دوجانبه است و نمو دیواره آن از نوع اولیه می باشد که شامل اپیدرم، آندوتسیوم، لایه میانی و تپتوم می باشد که با برخی گزارشات قبلی همسو است. Sood و Neelam (۲۰۰۰) و Pullaiah (۱۹۷۹) با مطالعه روی تعدادی از جنس ها و گونه های خانواده Asteracea وجود چهار لایه بساک را برای این گونه ها گزارش کردند [۱۵ و ۱۴].

دو نوع اصلی میکروسپوروژن براساس زمان سیتوکینز که فرایند تقسیم سلول های مادر میکروسپور به میکروسپورهای مجزا پس از تولید دو یا چهار هسته طی میوز می باشد، وجود دارد. طی میکروسپوروژن متوالی یک صفحه سلولی پس از هر تقسیم میوزی تشکیل می شود که کاملاً مشابه تشکیل صفحه سلولی در تقسیمات میتوزی سلول های رویشی می باشد. نوع بسیار رایج میکروسپوروژن، نوع همزمان است که طی آن سیتوکینز تنها پس از پایان میوز II رخ می دهد [۲]. آرایش مختلف چهار میکروسپور در تترادها به دو نوع سیتوکینز (همزمان و متوالی) و چگونگی تشکیل دیواره بین اسپوری وابسته است. آرایش فضایی میکروسپورها بعد از سیتوکینز همزمان معمولاً یک تتراد چهاروجهی می باشد که دارای اهمیت سیستماتیکی می باشد. آرایش فضایی میکروسپورها بعد از سیتوکینز متوالی می تواند انواع مختلف تترادها باشد که شامل تترادهای مسطح (لوزی شکل، T شکل و خطی) و تترادهای غیرمسطح (مقاطع یا چهاروجهی) می باشد [۵]. براساس نتایج این مطالعه سیتوکینز در خارخسک از نوع همزمان و تترادها از نوع چهاروجهی می باشد که وجود این نوع تترادها برای برخی از گونه های Asteracea مانند گونه *Inula cuspidate* گزارش شده است [۱۶]. همچنین تعداد هسته ها در زمان آزاد شدن دانه های گرده از بساک به لحاظ فیلوژنتیکی می تواند حائز اهمیت باشد. در نهان دانگان دو نوع دانه گرده بر این اساس وجود دارد. دانه های گرده دو هسته ای متشکل از یک سلول رویشی و یک سلول زایشی که نوع متداول تر و نیایی است و دانه های گرده سه هسته ای دارای یک سلول رویشی و دو سلول اسپرم حاصل از تقسیم سلول زایشی که در نهاندان گان نسبتاً نادر بوده و برای برخی از اعضای راسته میخک یک ویژگی تشخیصی و آپومورفی ممکن می باشند [۵]. نتایج این پژوهش نشان داد در گونه مورد مطالعه هسته میکروسپورها با روش میتوز تقسیم شده و دو

هسته نابرابر را به وجود می‌آورند که هسته بزرگ‌تر رویشی و هسته کوچک‌تر زایشی است. همچنین دانه گرده در مرحله سه سلولی یا سه هسته‌ای از بساک آزاد می‌گردد که با نتایج پژوهش‌های Sood و Neelam هم‌سویی دارد [۱۴].

۴-۲. کالوز در خارخسک

کالوز یک ترشح معمول از انواع مختلف سلول‌ها در همه اندام‌های گیاهی است و نقش حفاظتی دارد، ولی در هیچ مکانی به فراوانی کیسه‌های گرده رسوب نمی‌کند. ترشح کالوز ممکن است هم‌زمان با میوز یا قبل از شروع میوز صورت گیرد و معمولاً به صورت یکنواخت اطراف هر سلول مادر رسوب می‌کند، اما ضخامت آن در میان گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد [۲]. مطالعات بافت‌شناسی در بساک خارخسک نشان داد که کالوز در این گیاه قبل از میوز و به طور تقریباً یکنواخت بین غشای پلاسمایی و دیواره اولیه میکروسپوروسیت‌ها رسوب می‌کند و ضخامت آن نسبتاً زیاد می‌باشد. البته تشخیص نقش کالوز در نمو دانه گرده در خارخسک نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

چند عملکرد بیولوژیکی مهم برای دیواره کالوزی مطرح شده است. مشارکت دیواره کالوزی در ایجاد الگوی تزئینات اگزین در سطح میکروسپور بسیار مطرح شده است؛ مثلاً در جنس نیلوفر پیچ به عنوان یک شابلون جهت تنظیم رسوب اگزین اولیه عمل می‌کند و در دانه گرده تیره آفتابگردان سطح داخلی دیواره کالوزی الگوی مشخص خارها را نشان می‌دهد. کالوز برای الگویابی دیواره دانه گرده آرابیدوپسیس نیز ضروری است به طوری که جهش در یکی از چند ژن بتا ۱ و ۳ کالوز سنتاز آرابیدوپسیس جهت اختلال در تشکیل کالوز اطراف میکروسپورها، موجب ناهنجاری در الگویابی اگزین، انحطاط میکروسپورهای در حال نمو و عقیمی دانه گرده می‌شود [۱۸ و ۱۷].

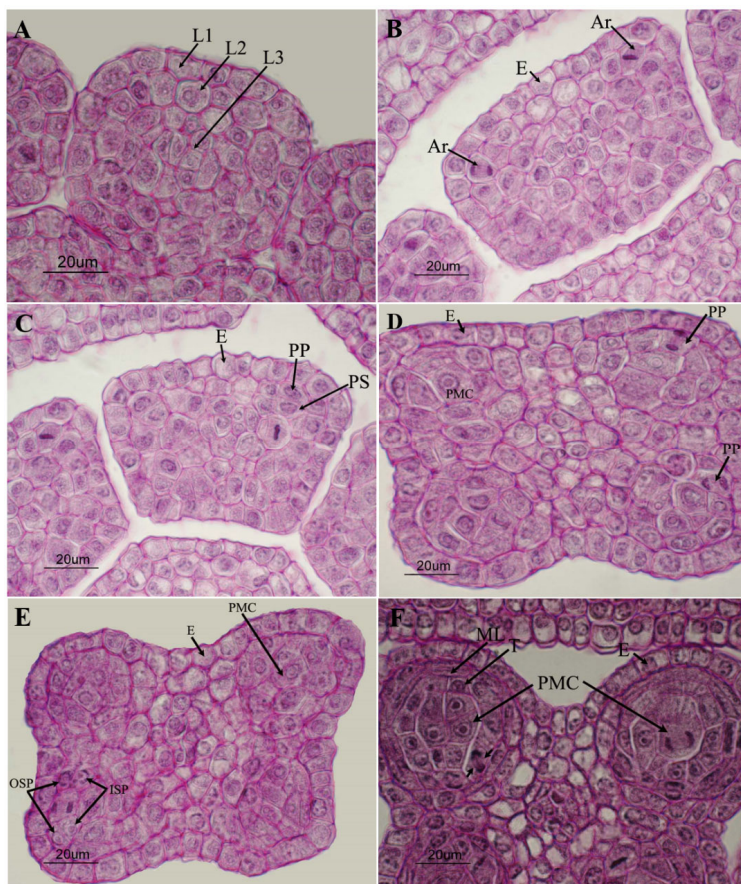
۴-۳. نوع تپتوم در خارخسک

درونی‌ترین لایه تشکیل‌دهنده دیواره کیسه گرده تپتوم نام دارد. سلول‌های این لایه کالاز و دیگر پروتئین‌های لازم برای آزاد شدن میکروسپورها از تتراد را ترشح می‌کنند و همچنین برای تشکیل دیواره بیرونی دانه‌های گرده ضروری می‌باشند؛ بنابراین نقش

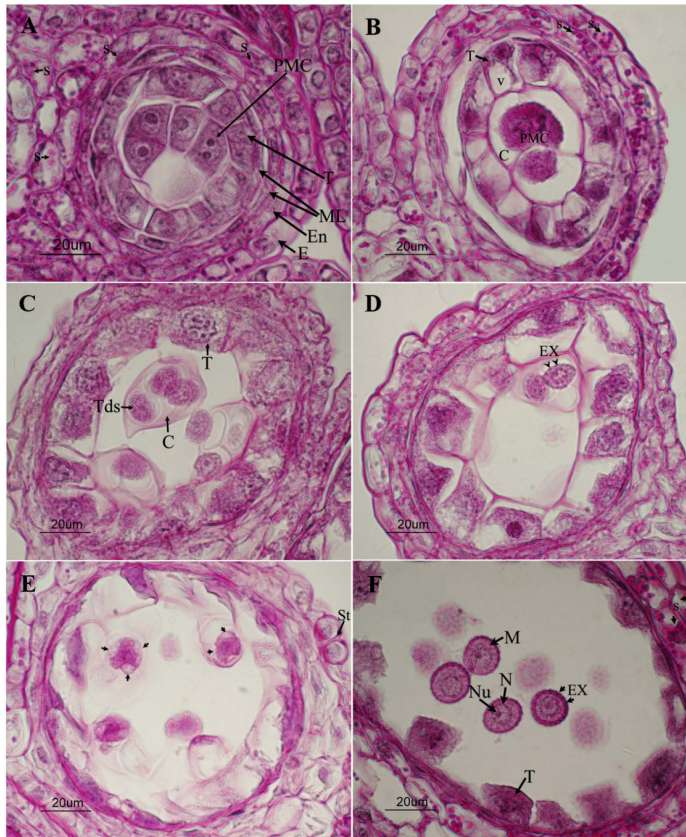
مهمی در تکوین دانه‌های گرده ایفا می‌کنند. سلول‌های تپتومی بسته به گونه‌های مختلف، ممکن است از نوع جداری باشند و شکل و موقعیت خود را در دیواره کیسه گرده طی تکوین دانه گرده حفظ کنند یا پس از انحلال کالوز به داخل لوکول حرکت کنند و پروتوپلاست‌های آن‌ها جهت تشکیل پلاسمودیوم تپتومی چند هسته‌ای در اطراف میکروسپورها با یکدیگر ترکیب می‌شوند که نوع تهاجمی نامیده می‌شود [۱۹]. در گیاه مورد مطالعه لایه تپتوم از نوع ترش‌حی یا جداری است که رایج‌ترین نوع تپتوم است که به ۱۹۵ خانواده که ۹۰٪ آن‌ها دولپه‌ای می‌باشند، اختصاص دارد. تپتوم تهاجمی کمتر رایج است و در تنها ۳۲ تیره که ۲۱ از آن‌ها تک‌لپه‌ای می‌باشند، یافت می‌شود [۲].

۵. نتیجه‌گیری

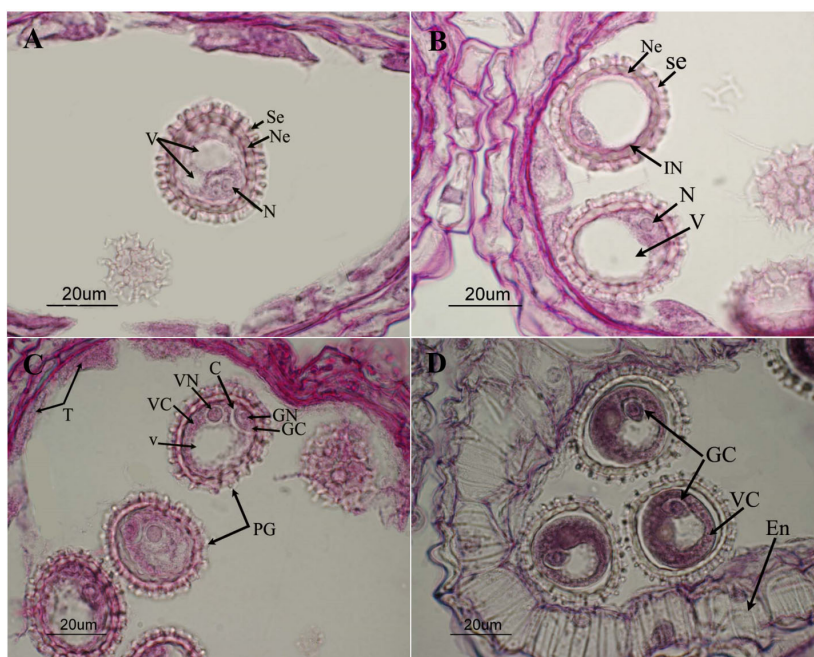
نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سیتوکینز در خارخسک از نوع هم‌زمان و تتراده‌ها از نوع چهاروجهی می‌باشد. همچنین دانه‌های گرده در مرحله سه هسته‌ای یا سه سلولی از بساک آزاد می‌باشند. مطالعات بافت‌شناسی در بساک خارخسک نشان داد که کالوز در این گیاه قبل از میوز و به‌طور تقریباً یکنواخت بین غشای پلاسمایی و دیواره اولیه میکروسپوروسیت‌ها رسوب می‌کند و ضخامت آن نسبتاً زیاد می‌باشد. البته تشخیص نقش کالوز در نمو دانه گرده در خارخسک نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. همچنین براساس نتایج پژوهش حاضر تپتوم در خارخسک از نوع ترش‌حی یا جداری است. در این نوع تپتوم همان‌طور که در بیشتر گونه‌ها با تپتوم ترش‌حی دیده می‌شود، سلول‌ها هنگامی که دیواره‌های سلولی را از دست می‌دهند، شکل و موقعیت خود را در دیواره کیسه گرده طی تکوین دانه گرده حفظ می‌کنند.



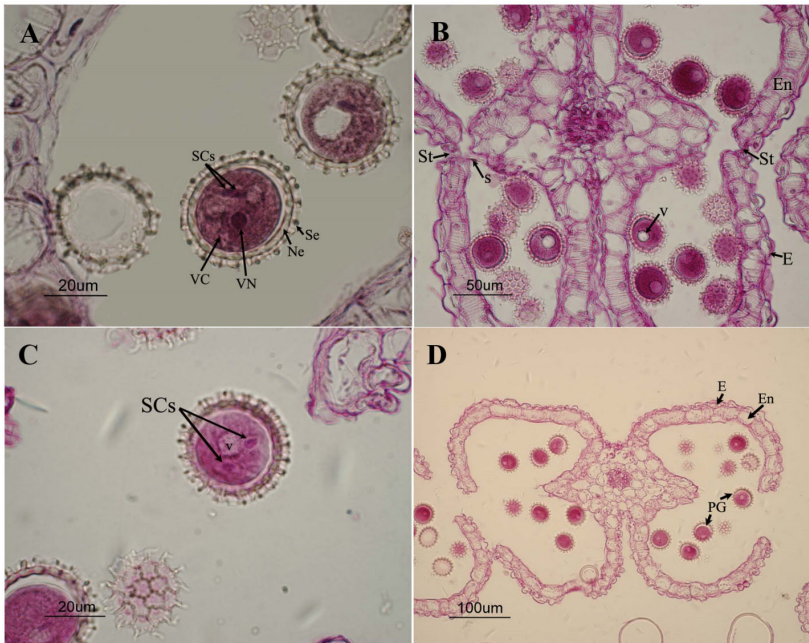
شکل ۱. (A) مرحله ۱ نمو بساک، **(B)** نمو بساک در مرحله ۲ و سلول‌های آرکسپورال در حال تقسیم، **(C)** نمو بساک در مرحله ۳ و سلول‌های کناری اولیه و سلول‌های اسپورزای اولیه حاصل از تقسیم سلول‌های آرکسپورال، **(D)** تقسیمات میتوزی پری‌کلینال در سلول‌های کناری اولیه در اوایل مرحله ۴ نمو بساک درشت‌نمایی بیشتر، **(E)** سلول‌های کناری ثانویه بیرونی و درونی حاصل از تقسیم سلول‌های کناری اولیه در اواخر مرحله ۴ نمو بساک، **(F)** تقسیم پری‌کلینال دسته داخلی سلول کناری ثانویه (نوک فلش) و سازمان‌یابی ۵ لایه سلولی مشخص در هر لوب بساک در مرحله ۵ نمو. P: پریموردیوم‌های پرچم، Ar: سلول‌های آرکسپورال، E: اپیدرم، PP: سلول‌های کناری اولیه، PS: سلول‌های اسپورزای اولیه، E: اپیدرم، PP: سلول‌های کناری اولیه، PMC: سلول‌های مادر میکروسپور، ISP: سلول‌های کناری ثانویه درونی، OSP: سلول‌های کناری ثانویه بیرونی، ML: لایه میانی.



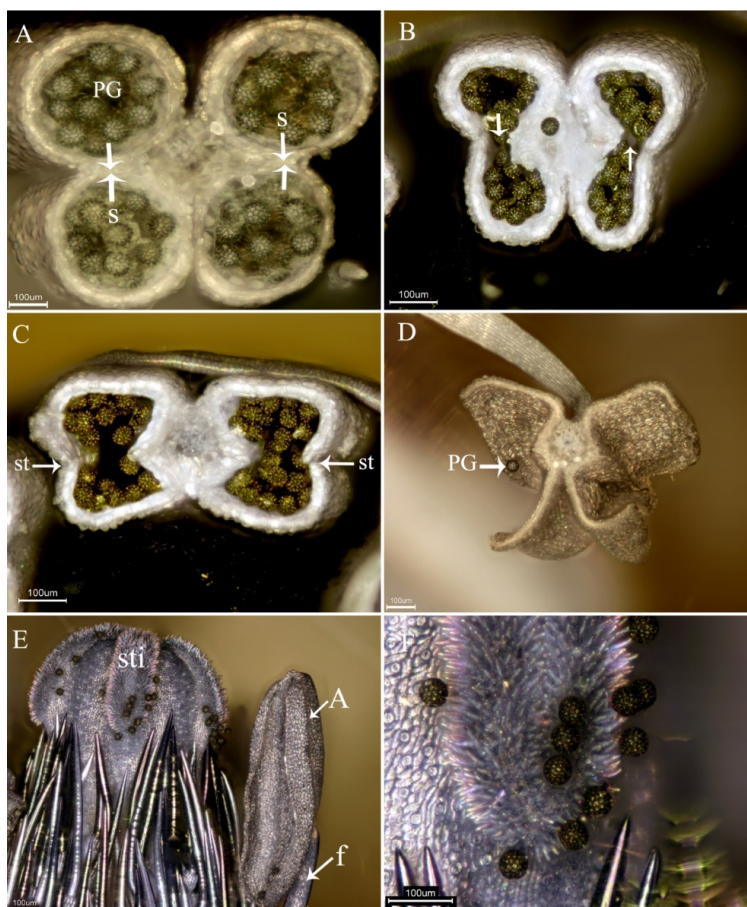
شکل ۲. A) سازمان‌یابی ۶ لایه سلول مشخص در هر لوب بساک و آغاز تجمع دانه‌های نشاسته در سلول‌های اپیدرمی، آندوتسیومی و بافت رابط بساک در مرحله ۶ نمو بساک، **(B)** رسوب دیواره کالوزی ضخیم بین غشای پلاسمایی و دیواره سلولزی اولیه سلول‌های مادر میکروสปور و افزایش تراکم و فراوانی دانه‌های نشاسته در سلول‌های اپیدرمی، آندوتسیومی و بافت رابط بساک در مرحله ۷ نمو و افزایش حجم و قطبی شدن سلول‌های تپتومی **(C)** تشکیل تترادهای تتراهیدرال، افزایش حجم هسته و تشکیل هستک‌های متعدد در سلول‌های تپتومی، **(D)** آغاز شکل‌گیری دیواره اگزین دانه گرده در مرحله تتراد، **(E)** آگویابی شکاف‌ها (تعداد، نوع و موقعیت شکاف‌ها) در اواخر مرحله تتراد (نوکلئوس) و افزایش جمع‌شدگی‌های سیتوپلاسمی در سلول‌های تپتومی، **(F)** هسته بزرگ و هستک برجسته در میکروสปورها، نمو بیشتر دیواره اگزین و تشکیل احتمالی هتروکروماتین در سلول‌های تپتومی. ML: لایه میانی، T: تپتوم، E: اپیدرم، En: آندوتسیوم، Tds: تترادها، S: دانه‌های نشاسته، PMC: سلول‌های مادر میکروสปور، C: دیواره کالوزی، V: واکوئل، M: میکروสปور، N: هسته، Nu: هستک، EX: دیواره اگزین.



شکل ۳. A) تشکیل واکوئل‌های کوچک در میکروسپور، افزایش ضخامت دیواره اگزین و مشخص شدن بخش‌های سگزین و نگزین در آن و شروع ناپدید شدن محتویات سیتوپلاسم در سلول‌های تیتومی، **B)** تشکیل واکوئل بزرگ در میکروسپور، مهاجرت هسته به همراه بقیه سیتوپلاسم به موقعیت کناری و آغاز شکل‌گیری دیواره انتین دانه‌گرده بین اگزین و غشای پلاسمایی میکروسپور، **C)** تقسیم میتوزی نامتقارن میکروسپور و تشکیل یک سلول رویشی واکوئله بزرگ و یک سلول زایشی عدسی شکل کوچک متصل به غشای سلول رویشی، **D)** سلول زایشی کاملاً دوکی شکل. T: تیتوم، En: آندوتسیوم، N: هسته، V: واکوئل، Se: سگزین، Ne: نگزین، GC: سلول زایشی، VC: سلول رویشی، VN: هسته رویشی، IN: انتین، GN: هسته زایشی، VN: هسته رویشی.



شکل ۴. A) تقسیم میتوزی متقارن سلول زایشی و تشکیل دو سلول اسپرم متصل به هم، **(B)** از بین رفتن لایه میانی مجاور تپتوم، پاره شدن سپتوم و تشکیل بساک دو لوکولی، **(C)** جدا شدن دو سلول اسپرم از یکدیگر و تشکیل دانه گرده سه سلولی، **(D)** از بین رفتن دومین لایه میانی، پاره شدن استومیوم و شکوفایی کامل بساک و آزاد شدن دانه‌های گرده. E: اپیدرم، En: آندوتسیوم، S: سپتوم، St: استومیوم، V: واکوئل، VC: سلول رویشی، VN: هسته رویشی، SCs: سلول‌های اسپرم متصل به هم، Se: سگزین، Ne: نگزین، SCs: سلول‌های اسپرم جدا از هم، PG: دانه‌های گرده.



شکل ۵. (A) مقطع عرضی دستی یک بساک در مرحله قبل از بین رفتن سپتوم، (B و C) مقطع عرضی دستی یک بساک در مرحله از بین رفتن سپتوم، (D) مقطع عرضی دستی یک بساک در مرحله گشودگی استومیوم و شکوفایی کامل، (E) گشودگی استومیوم در تمام طول هر جفت کیسه گرده، (F) قرارگیری دانه‌های گرده بر روی کلاله مادگی. S: سپتوم، St: استومیوم، PG: دانه گرده، A: بساک، f: میله، sti: کلاله.

منابع

- اخیانی خ. (۱۳۷۱). *فلور ایران: تیره/سپند، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع*.
- قهرمان ا. (۱۳۷۳). *گیاه‌شناسی پایه، ج ۲، انتشارات دانشگاه تهران*.
1. Raghavan, V. (1999). "Developmental biology of flowering Plants", *Springer Verlag*, Berlin.
 2. Lersten, N.R. (2004). "Flowering plant embryology .Black well publishing". London.
 3. Meuter-Gerhards, A., Rigert, S., Wiermann, R. (1999). "Studies on sporopollenin biosynthesis in Cucurbita maxima (DUCH.) – II", The involvement of aliphatic metabolism, *Journal of Plant Physiology*, 154: 431–436.
 4. Bubert, H., Lambert, J., Steuernagel, S., Ahlers, F., Wiermann, R. (2002). "Continuous decomposition of sporopollenin from pollen of Typhaangustifolia L. by acidic methanolysis". *Zeitschrift für Naturforschung, C 57*: 1035–1041.
 5. Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch- Radivo, A., Ulrich, S. (2009). "Pollen Terminology", SpringerWien, NewYork.
 6. Simpson, M.G. (2006). "Plant Systematics", Elsevier Academic Press, USA.
 7. Fukuda, Y. (1982). "Morphological and Anatomical Studies in *Tribulus terrestris*. II. Vascular Course Through Cotyledonary and Foliar Nodes", *The Botanical Magazine Tokyo*, 95: 183-196.
 8. Mohamed, A.H. (2006). "Taxonomic Significance of Seed Proteins and Iso-enzymes in *Tribulus* (Zygophyllaceae)", *International journal of agriculture & Biology*, 52: 573-575.
 9. Decraene, L.P.R., Laet, J.D., Smets, E.F. (1996). "Morphological studies in Zygophyllaceae. II. The Floral Development and Vascular Anatomy of *Peganum Harmala*", *American Journal of Botany*, 83: 201-215.
 10. Jensen W.A. (1962). "Botanical histochemistry", Freeman, W.H. and Company.
 11. Charlton W.A., Macdonald A.D., Posluszny U., Wilkins C.P. (1989). "Additionsto the technique of epi-illumination light microscopy for the study of floral andvegetative apices", *Canadian Journal of Botany*, 67, 1739–1743.
 12. Dadpour M.R., Grigorian W., Nazemieh A., Valizadeh M. (2008). "Application of epi-illumination light microscopy for study of floral ontogeny in fruit trees", *International Journal of Botany*, 4, 49–55.
 13. Davis G. L. (1968). "Apomixis and abnormal anther development in *Calotis lappulacea* Benth", (Compositae) *Australian Journal of Botany*, 16: 1-17.
 14. Sood S.K., Neelam K. (2000). "Investigations on embryology of *Inula cuspidata* Clarke (Asteraceae)", *Journal of Indian Botanical Society*, 79: 93-95.
 15. Pullaiah T. (1979). "Studies in the Embryology of Compositae. IV", *The Tribe Inuleae American Journal of Botany*, 66:1119-1127.

16. Maheshwari P. (1950). *An Introduction to the embryology of angiosperms*, Mc Graw Hill, New York.
17. Goodwin H., Echlin P., Chapman B. (1967). "The development of the pollen grain wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth", *Review of Palaeobotany and Palynology*, 3: 181–195.
18. Waterkeyn L., Bienfait A. (1970). "On a possible function of the callosic special cell wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth", *Grana*, 10: 13–20.
19. Scott R.G.J., Spielman M., H. G. Dickinson H.G. (2004). "Stamen Structure and Function", *The Plant Cell*, 16: S46–S60.