بررسی ریزریخت شناسی سطح بذر و گرده شناسی گونه های شمال شرق جنس *Veronica* (L.) بخش *Beccabunga*

جمیل واعظی، دریه امیری مقدم، حمید اجتهادی، شیما صدیقی

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
Email: vaezi@um.ac.ir

چکیده

مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که صفات ریزریخت شناسی سطح بذر و نیز گرده شناسی از کارایی بالایی در تاکسونومی دارند. در این مطالعه سه زیر گونه‌ی *Veronica anagalis-aquatica* subsp. *oxycarpa*، *Veronica beccabunga* subsp. *muscosa* و *Veronica anagalloides* subsp. *heureka* در شمال شرق ایران مورد بررسی ریزریخت شناسی سطح بذر و نیز مطالعات گرده شناسی قرار گرفتند. این سه زیرگونه به لحاظ مورفولوژی و تشریحی شباهتهای فراوانی به یکدیگر داشته و صفاتی مانند کرک، شکل برگها، تعداد دانه های موجود در دانه، وضعیت دمبرگها مقطع ساقه، ضخامت آئرانشیم و ضخامت آوندهای چوب و آبکش آنها را از یکدیگر جدا می‌سازد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اندازه، تعداد، شکل، رنگ، و تزئینات سطح دانه در تفکیک سه زیر گونه‌ی فوق الذکر کارآمد هستند. از طرف دیگر، مطالعات گرده شناسی نشان داد که صفات بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ نوری باعث تفکیک گونه‌های مورد مطالعه نمی‌شوند.

کلمات کلیدی: ریزریخت شناسی، بذر، *Veronica* ، گرده شناسی، *Beccabunga*

۱. مقدمه

جنوب غربی آسیا مرکز تنوع برای جنس *Veronica* است. تقریباً نیمی از گونه های جنس *Veronica* در این ناحیه وجود دارد [۹]. در ایران ۶۰ گونه *Veronica* گزارش شده است که در بین آنها ۱۸ گونه اندمیک است. محل سکونت این گونه ها زمین های مرطوب، مزارع کشت شده و شیب های پرصخره است. در چاپ جدید مقاله های سیستماتیک، یک تاکسون جدید برای جنس *Veronica* کشف شده است [۶]. و این تاکسون جدید برای ایران گزارش داده شده است [۵ و ۶] قبیله *Veroniceae* در تیره Plantaginaceae، (قبلاً بخشی از Scrophulariaceae) شامل ۵۰۰ گونه است که بیشتر در نواحی معتدل نیمکره شمالی و استرالیا توزیع شده اند. بزرگترین جنس در این قبیله، *Veronica* با ۴۵۰ گونه است. اخیراً شامل گونه های استرالیایی از کمپلکس *hebe* می باشد [۱].

نتایج به دست آمده از مطالعات ماکرو و میکرومورفولوژی نشان داده است که اندازه دانه ها در *V.* subsect. *Serpyllifoliae* بین 0.76-1.77 (طول) و 1.41 -0.53 (عرض) هستند. کاراکتر دانه در این گروه خیلی یکنواخت است [۴]. پوشش دانه در ۴۱ تاکسون از Plantaginaceae (۳۱ تاکسون *Plantago* و۱۰ تاکسون به نمایندگی جنس های *Digitalis*، *Linaria*، *Veronica* که قبلاً به Scrophulariaceae تعلق داشتند) توسط میکروسکپ الکترونی مورد مطالعه قرارگرفته است.

تأیید شده است که مورفولوژی گرده صفات معتبر مفیدی را در تعیین حدود گونه ها و طبقه بندی زیرجنس ایجاد می کند [۲ و ۸]. Hong [۳] مورفولوژی گرده ۱۹ جنس از قبیله *Veroniceae* را که شامل ۴۹ گونه بود با استفاده از میکروسکپ الکترونی (SEM) و میکروسکپ نوری (LM) مطالعه کرد.

آنالیز مورفولوژی گرده روی ۱۷ گونه از *Veronica* که در ایران پراکنده هستند انجام شد. هدف از این کار : پیدا کردن صفات پالینولوژیکی که از نظر سیستماتیکی مهم هستند واینکه تعیین کنیم چه صفات گرده ای در تاکسونومی زیرجنسی از این جنس مفید هستند [۷]. مشخص شد که گرده از نوع مشبک–سوراخ دار بیشترین فراوانی را بین گونه های آزمایش شده دارد. بزرگترین گرده متعلق به *V. gentianoides* است و کوچکترین گرده در *V. khorassanica* مشاهده می شود. همچنین گرده از نوع Microreticulate (ریزشبکه ای) این نوع گرده فقط در *V.beccabunga* مشاهده می شود. قطر سوراخ ها کمتر از Mm ۱ است. نوع سوم گرده Scabrate (پوسته پوسته) این نوع گرده فقط در *V.hederifolia* مشاهده می شود. این گونه گرده چهار شکافی دارد.

در این مطالعه با کمک ریزریخت شناسی بذر و ویژگیهای میکروسکوپی گرده سعی بر این است تا بتوان صفات مناسبی را جهت تشخیص میکروسکوپی سه زیر گونه‌ی *Veronica anagalis-aquatica* subsp. *oxycarpa*، *Veronica beccabunga* subsp. *muscosa* و *Veronica anagalloides* subsp. *heureka* بدست آورد.

۲. مواد و روشها

در ابتدا اندازه‌گیری صفات عمومی مربوط به بذرها، نظیر طول و عرض، با استفاده از استریومیکروسکوپ انجام گرفت. سپس به بررسی ویژگی‌های سطح آن‌ها با استفاده از میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره پرداخته شد. به این منظور بذرها از نمونه‌های هرباریومی و نمونه های جمع آوری شده جدا شدند و پس از قرارگیری بر روی استاب‌ها، سطح بذرها توسط دستگاه SPUTTER COATER مدل SC 7620 با لایه نازکی از طلا و پالادیوم به مدت ۱۲۰ ثانیه در محفظه خلاء پوشش داده شد. سپس توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره اسکن شدند. نمونه ها وارد میکروسکوپ مدل LEO VP 1450 با قدرت تفکیک ۲/۵ نانومتر و ولتاژ حداکثر ۳۵ کیلو ولت شدند. تصاویر مربوطه در بزرگنمایی های مختلف با ولتاژ ۱۵ کیلو وات تهیه شدند. درشت نمایی کم نمایشگر نمای کلی بذر بود و درشت نمایی بالاتر تزئینات سطح بذر را نشان داد.

برای بررسی خصوصیات دانه های گرده توسط میکروسکپ نوری ابتدا از هر نمونه ۱۰تا ۱۵ عدد غنچه جدا می کنیم و در شیشه ساعت تمیز حاوی مقداری محلول شوینده قرار داده شدند. سپس با در پوش شیشه‌ای پوشانده و با توجه به نوع گونه کد گذاری گردید. استفاده از مایع ظرف شویی به منظور تمیزی بهتر سطح دانه‌های گرده استفاده می شود. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه که گلها به طور کامل نرم شدند، بساک‌های بالغ از گلها جدا شده و با استفاده از سوزن تشریح و پنس

ضدعفونی شده، درمحلول شوینده قرار داده شدند و با مشاهده توسط استریومیکروسکوپ[1] له شده و دانه های گرده از بساک خارج شدند، سپس بساک ها و سایر قطعات خرد شده آنها از گرده ها جدا شدند. مایع حاوی ماده شوینده و دانه های گرده توسط سمپلر[2] به درون میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. استفاده از میکروتیوب به جای لوله آزمایش شیشه‌ای از تخلیه شدن دانه‌های گرده به همراه محلول رویی در مراحل مختلف سانتریفوژ تا میزان قابل توجهی جلوگیری می‌کند. سپس میکروتیوبها به مدت سه دقیقه در۴۰۰۰ دور[3] (rpm) سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خیلی آرام تخلیه شد به طوری که دانه های گرده در ته میکروتیوب باقی ماندند، سپس به درون میکروتیوب‌ها آب مقطر اضافه گردید و به مدت سه دقیقه در همان دور سانتریفیوژ شدند و مجدداً محلول رویی به دقت خالی شد. به خاطر آلودگی و کثیف بودن دانه‌های گرده این مرحله برای دو تا سه بار تکرار شد. در آخرین مرحله شستشو پس از تخلیه محلول رویی، ۲/۵ میلی لیتر محلول اسید استیک گلاسیال به درون میکروتیوبها اضافه شد و به مدت سه دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه محلول رویی محلول استولیز تازه تهیه شده به درون میکروتیوب ها ریخته شد و سپس به داخل ظرف حاوی آب درحال جوش قرارگرفتند. قابل توجه است که محلول استولیز از ترکیب کردن نه حجم اسید استیک گلاسیال به اضافه یک حجم اسید سولفوریک غلیظ تهیه میشود. با قرار گرفتن دانه‌های گرده درمجاورت با استولیز، رنگ محلول به قهوه ای کم رنگ تا پررنگ تغییر پیدا میکند. زمان این مرحله با توجه به تغییر رنگ صورت گرفته از سه تا پنج دقیقه برای گونه‌های مختلف متفاوت است. طی این زمان محلول استولیز بر روی پروتوپلاست دانه گرده، بخشی از دیواره گرده و موادی که ممکن است سطح دانه های گرده را بپوشانند نظیر قطره های روغن و پروتئین اثر گذاشته و آنها را بر طرف می نماید. در ضمن با تغییر رنگ لایه خارجی دیواره گرده [4] از سبز مایل به زرد به رنگ کهربایی تیره باعث ایجاد وضوح دقیق تر و بهتر دانه های گرده می‌شود پس از سه دقیقه سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور، محلول رویی تخلیه شده و برای از بین بردن اثر آنتی اکسیدانی استولیز، حدود دو میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به درون میکروتیوب ها اضافه ودوباره مطابق با شرایط قبل سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه محلول رویی، به میکروتیوب ها دو میلی لیتر محلول پتاس (KOH)۱۰ درصد اضافه گردید و دوباره به مدت سه دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ صورت گرفت.پس از اینکه مایع رویی به آرامی تخلیه شد جهت شستشوی نهایی از آب مقطر استفاده شد.

آماده سازی دانه گرده برای میکروسکپ نوری (LM)

پس از خالی کردن محلول رویی تیوب ها از گلیسیرین ،با استفاده از پنست یک قطعه ژلاتین آماده شده را وارد تیوب کرده و مقداری دانه گرده همراه با ژلاتین روی لام قرار می گیرد. لام را کمی گرم کرده تا ژلاتین موجود برروی آن تا اندازه ای ذوب گردد، سپس چهار قطعه خمیر گرد کوچک در اطراف ژلاتین بر روی لام قرار داده و لاملی را روی آن می گذاریم و سپس روی کمی حرارت قرار می دهیم تا ژلاتین باز شود ودانه های گرده در تمام سطح لام گسترش یابد. برای ممانعت از خشک شدن لام‌های تهیه شده لاک بی‌رنگ اطراف لامل استفاده شد سپس با استفاده از میکروسکپ نوری با عدسی 100× تعداد ۱۵ گرده را از نمای قطبی (polar view) و نمای استوایی (equatorial view) و همچنین نسبت P به E اندازه گیری گردید.

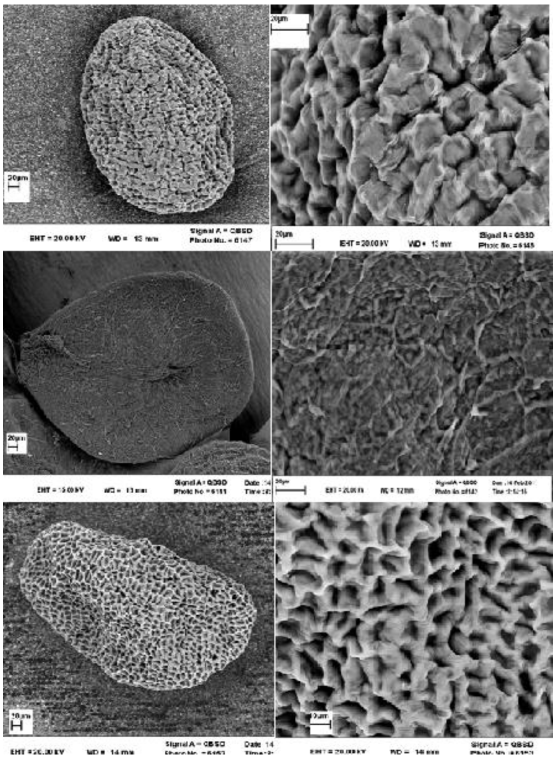
۳. نتایج

1 Stereo microscope
2 Sampler
3 Revolutions per minute
4 exine

در تاکسون‌های مورد مطالعه شکل و پوشش سطح بذر مورد بررسی قرار گرفت. بذرها به اشکال کروی تا کلیوی کشیده دیده می شوند. شکل سلول‌های اپیدرمی به صورت چند وجهی منظم مربعی است ولی در *V. beccabunga* subsp.*muscosa* سلولهای اپیدرمی از سلولهای چندوجهی بزرگ تشکیل شده که دارای دیواره های شعاعی با عمق متوسط که به طور نامنظم ضخیم شده است. عرض بذرها در این گونه ها بین (۵۰۰-۲۰۰ میکرومتر) و طول بذرها از (۶۰۰-۳۰۰ میکرومتر) متغیر است (جدول ۱؛ شکل ۱).

جدول ۱. ویژگی‌های بذر در گونه‌های *Veronica*

section	species	subspecies	General shape	Testa surface
beccabunga	*V.anagalis-aquatica*	*oxycarpa*	Plano- convex; ± smooth	Reticulate
beccabunga	*V.beccabunga*	*muscosa*	flat,± convex	Reticulate-striate
beccabunga	*V.anagalloides*	*heureka*	Plano- convex	Reticulate-corrugate

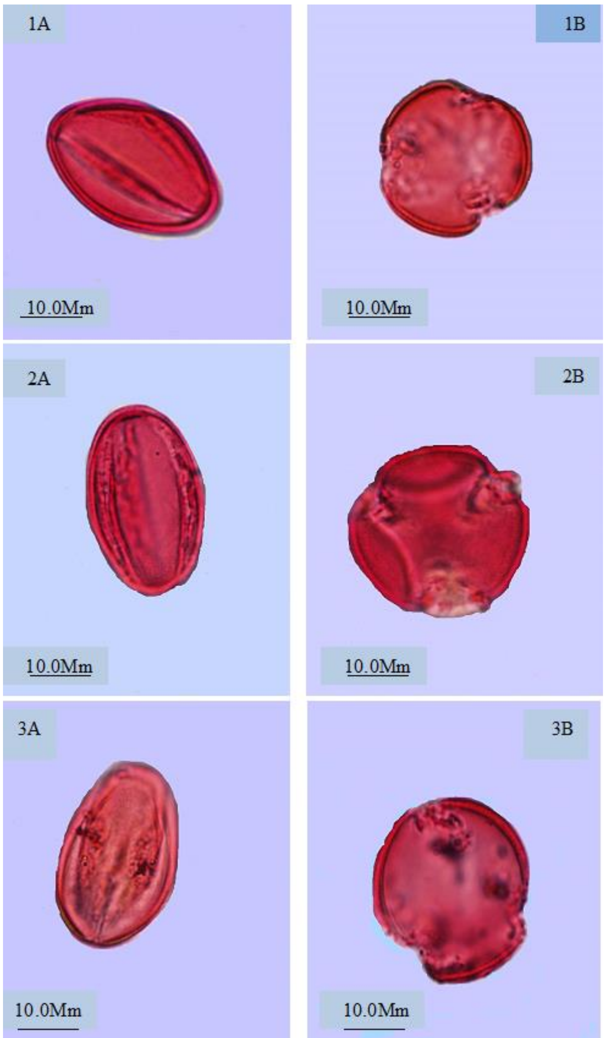


شکل ۳-۱۲ تصاویر سطح بذر در بخش *V.beccabunga* با استفاده از میکروسکپ الکترونی(A، نمای کلی، B ، سطح مقطع)1– *V.anagalis-aquatica*,subsp.*oxycarpa* 2– *V.beccabunga*,subsp.*muscosa* 3– *V.anagalloides*,subsp *heureka*

بررسی دانه گرده توسط میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد که دانه گرده در گونه های بخش *beccabunga* به صورت tricolpate هستند. شکل دانه گرده در دید قطبی کروی به نظر می رسد و در دید استوایی بر اساس نسبت طول محور قطبی به محور استوایی، استوانه‌ای شکل است. بزرگ‌ترین دانه گرده در *V.beccabunga* (طول محور قطبی برابر۲۲/۳ میکرومتر و محور استوایی برابر ۲۳/۹ میکرومتر) و کوچک‌ترین دانه گرده در *V.anagalloides* (طول محور قطبی برابر۱۹/۵ میکرومتر و محور استوایی برابر ۲۰ میکرومتر) مشاهده شد (جدول ۲، شکل ۲).

جدول ۲. مشخصات دانه های گرده گونه های سیزاب بر اساس میکروسکوپ نوری

Species	P (µm)	E (µm)	P/E (µm)	Shape (in polar view)	Shape (in equatorial view)
V.anagalis-aquatica subsp.*oxycarpa*	21.7	20.2	1.07	Oblate	Spheroidal to suboblat
V.beccabunga subsp.*muscosa*	22.3	23.9	0.93	Oblate	Spheroidal to suboblat
V.anagalloides subsp.*heureka*	19.5	20	0.97	Oblate	Spheroidal to suboblat



شکل ۲. تصاویر میکروسکپ نوری دانه گرده در بخش *beccabunga* از جنس *Veronica*(A از نمای استوایی،B نمای قطبی) 1- *V.anagalis-aquatica*,subsp.*oxycarpa* 2- *V.beccabunga*,subsp.*muscosa* 3- *V.anagalloides*,subsp *heureka* (بزرگنمایی 100X).

۴. بحث

اندازه، تعداد، شکل، رنگ، و تزئینات سطح دانه از ارزش تاکسونومیکی بالایی برخوردار است .اندازه دانه ها در این بخش کوچک است و به طول ۰/۳ تا ۰/۶ میلیمتر و عرض ۰/۲ تا ۰/۵ میلیمتر تغییر می کند. تعداد بذرها در سه گونه متفاوت است بطوریکه تعداد بذرها در *V.beccabunga* subsp.*muscosa* بین ۵۵ تا ۶۵ عدد ، در *V.anagalloides* subsp.*heureka* ۴۰ عدد و در *V.anagalis-aquatica* subsp.*oxycarpa* بین ۳۵ تا ۷۰ عدد مشاهده شده است.شکل دانه در این بخش به صورت تخت-محدب ویا از یک سو پهن و از طرف دیگر محدب است. دانه به رنگهای زرد و قهوه ای دیده می شود. علاوه بر این صفات متمایز کننده که در دانه باعث تشخیص گونه ها از یکدیگر می شود ، سطح قشر خارجی دانه صفت قابل توجه دیگری است. این سطح به صورت مشبک دیده می شود که در دو نوع Reticulate-(striate) و (Reticulate-corrugate) تقسیم شده است.

نتایج به دست آمده از مطالعه دانه گرده که با میکروسکپ نوری انجام شد، نشان داد که صفات گرده شناسی در نظر گرفته شده به خوبی باعث تفکیک گونه های این بخش نمی شوند و حائز اهمیت نیستند. با بررسی این صفات مشاهده شد که شکل این گونه ها از دید محور قطبی و استوایی تقریباً مشابه است. تنها اندازه دانه گرده در این بخش قابل توجه است. اندازه دانه گرده (E)23.9× (P)22.3 در *V.beccabunga* subsp.*muscosa* که بیشترین اندازه را دارد و 20(E) ×(P)19.5 در *V.anagalloides* subsp.*heureka* کمترین اندازه را دارد.

۵. نتیجه‌گیری

در این تحقیق جداسازی تاکسونومیکی سه زیرگونه‌ی *Veronica anagalis-aquatica* subsp. *oxycarpa*، *Veronica beccabunga* subsp. *muscosa* و *Veronica anagalloides* subsp. *heureka* با کمک ریز ریخت شناسی سطح بذر و مطالعات میکروسکوپ نوری دانه گرده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که اندازه، تعداد، شکل، رنگ، و تزئینات سطح دانه در تفکیک سه زیر گونه‌ی فوق الذکر کارآمد هستند. از طرف دیگر، مطالعات گرده شناسی نشان داد که صفات بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ نوری باعث تفکیک گونه‌های مورد مطالعه نمی‌شوند.

۷. مراجع

1. *Albach, D.C., Martínez-Ortega, M.M. & Chase, M.W. Veronica: Parallel morphological evolution and phylogeography in the Mediterranean. – Pl. Syst. Evol., 2004, 246: 177-194.*
2. *Erdtman G. Handbook ofpalynology. –København: Munksgaard, 1969.*
3. *Hong,D. Taxonomy and evolution of Veronica (Scrophulariaceae) with special reference to palynology. Opera Bot. 1984, 75: 5–60.*
4. *Martínez-Ortega, M.M. & Rico, E. Taxonomy of Veronica subsect. Serpyllifolia (Scrophulariaceae). – Bot. J. Linn. Soc., 2001, 135: 179-194.*
5. *Saeidi- Mehrvarz. Sh. & Assadi .M. New Veronica (Scrophulariaceae) records for the flora of Iran. Turkish. J. Bot . 2003, 27(4): 393-342.*
6. *Saeidi-Mehrvarz, S., Ghahreman, A., Assadi, M. A new species of Veronica (Scrophulariaceae) from Iran. Nordic Journal of Botany. 2008, 21 (6): 581-584.*
7. *Saeidi-Mehrvarz, S. and M. Zarrei " Pollen morphology of some species of the genus Veronica (Scrophulariaceae) in Iran." Wulfenia, 2006, 13:33-50.*

8. Walker J. W. & Doyle J. A. The bases of angiosperm phylogeny: Palynology. –Ann. Missouri Bot. Gard. 1975, 62: 664–723.
9. Willis, K.J. Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. – Endeavour, 1996, 20: 110−114.