بررسی وابستگی مراحل تکوین دانه‌های گرده و گرده‌افشانی آن‌ها توسط زنبورهای عسل

راضیه تقوی‌زاد[۱،*]، احمد مجد[۲]، حسن نظریان[۳]

۱- استادیار تکوین گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرری
۲- استاد تکوین گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۳- استادیار سیستماتیک گیاهی، مرکز آموزش عالی امام خمینی(ره)، وزارت جهاد کشاورزی

***مسئول مکاتبات:** راضیه تقوی‌زاد، تهران، بزرگراه خلیج فارس، جاده قم، نرسیده به حرم مطهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری (مجتمع یادگار امام)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن همراه: ۰۹۱۲۱۴۶۳۵۷۵، پست الکترونیکی:
ra_taghavizad@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، مجتمع آزمایشگاهی

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۳

چکیده

بسیاری از مطالعات انجام شده، حاکی از نقش مثبت زنبورهای عسل در گرده افشانی، لقاح و افزایش محصولات باغی، زراعی و زینتی است. بررسی وضعیت نموی گرده‌ها نیز می‌تواند نتایج حاصل را رد، تأیید و یا توجیه نماید. در این پژوهش، با کندوگذاری درکوهپایه‌های استان تهران، برداشت عسل از ماه‌های خرداد تا شهریور و انجام روش‌های مقایسه‌ای گرده شناختی بین گیاهان منطقه و گرده‌های موجود در عسل، بعد از تخلیص گرده‌های گیاهان با روش Acetolysis توانستیم ابتدا گیاهان تولید کننده گرده‌های عسل را شناسایی کنیم. سپس با رقیق کردن عسل و شمارش گرده‌های عسل، به روش Sawyer و به‌کارگیری رنگ آمیزی‌های مختلف، هسته یا هسته‌ها و آمیلوپلاست را در گرده‌های عسل شناسایی و مراحل نموی آن‌ها را بررسی نماییم. سنجش پروتئین به روش Bradford انجام شد. به‌کارگیری تکرار آزمایش‌ها و انجام تست T در هر مورد این نتایج را به دنبال داشت: به طور میانگین ۸۰ درصد گرده‌ها در مرحله تک هسته‌ای بودند. حجیم بودن هسته‌ها و موقعیت مرکزی آن‌ها در دانه‌های گرده نشانگر وضعیت قبل از تقسیم بود. حالت دو هسته‌ای گرده‌ها ۲۰ درصد موارد را تشکیل می‌داد و معلوم می‌کرد که این گرده‌ها در اواخر مرحله بلوغ به سرمی‌برند. به طور میانگین، ۹۳ درصد گرده‌های موجود در عسل، فاقد نشاسته بودند و ۳ درصد نشاسته کمی داشتند. همچنین ۸۶/۵۵ درصد گرده‌ها بسیار کوچک بودند. در مجموع، بیشتر بودن حالت تک-هسته‌ای درگرده‌ها، نداشتن یا کمبود نشاسته در دانه‌های گرده و بسیار کوچک بودن آن‌ها حاکی از این است که گرده‌ها یا در مراحل اولیه نموی به سر می‌برند و تا بلوغ کامل فاصله دارند یا برای خود لقاحی با مشکل مواجه‌اند. بنابراین، گرده‌افشانی با زنبور عسل، فرصت بیشتری برای لقاح فراهم می‌کند و این امکان را فراهم می‌سازد تا بقیه مراحل تکوین گرده، روی کلاله سپری شود. همچنین با دگرلقاحی، ممانعت خود ناسازگاری گرده‌ای در لقاح از بین می‌رود. این امر سبب می‌شود تا گیاهان حاصل نیز تکامل یافته‌تر شوند.

واژه‌های کلیدی: زنبورهای عسل، گرده افشانی، گرده شناسی، هسته

مقدمه

دانه گرده، مولد سلول‌های جنسی نر در گیاهان پیدازاد (فانروگام) است. بنا به نظر Shivanna (۲۰۰۳) «درگرده افشانی نوع حیوان پسندی، گیاهان با به کارگیری هدیه‌های غذایی شامل شهد و

گرده و موقعیت‌یابی خاص بساک و کلاله، سعی در جذب حشرات گرده افشان دارند» (۱). بعضی از رنگ‌ها مثل رنگ زرد گل‌ها بیشتر مورد توجه گرده-افشان‌ها و زنبورعسل است (۲، ۳). در این تحقیق سعی شده است به جنبه‌های دیگری به جز ویژگی-های ریخت‌شناختی گرده توجه شود و تا حد امکان به این سؤال پاسخ داده شود که آیا زنبورعسل در انتخاب خود به مرحله نموی گرده‌ها توجه و یا از آن خبر دارد؟ به عبارت دیگر، آیا در جمع‌آوری‌های خود، نمو گرده را ملاک قرارمی‌دهد یا خیر؟

دانه گرده دارای دو سلول زایشی و رویشی است که بر اثر تقسیم نامتقارن یا سیتوکینز هسته میکروسپور ایجاد می‌شوند (۴). سلول زایشی در ابتدا به انتین دانه گرده متصل است (۵، ۶). سپس از انتین جدا شده و در سیتوپلاسم سلول رویشی قرارمی‌گیرد (۹-۷). سلول زایشی، ابتدا کروی است ولی خیلی زود با جهت‌گیری میکروتوبول‌های موازی به محور طولی، دوکی می‌شود (۱۲-۱۰). سیتوپلاسم سلول رویشی، شامل تمام اندامک‌های طبیعی است (۱۳). پلاستیدها در مرحله واکوئلی میکروسپور، بدون دانه‌های نشاسته هستند. بعد از تقسیم، دانه-های نشاسته، ساخته شده و در آمیلوپلاست‌ها ذخیره می‌شوند. مواد غذایی به شکل لیپید یا نشاسته در سلول رویشی تجمع می‌یابند (۱۲،۱۴). گرده‌های بالغ به طور معمول دارای مقداری ذخایر پروتئینی و پروتئین‌های ضد تنشی نیز هستند (۱۵). در ذرت، دانه‌های نشاسته در مراحل آخر نمو دانه گرده با بیان ژن‌های مسئول تولید می‌شوند (۱۶). وجود نشاسته در دانه‌های گرده نه تنها تأمین کننده انرژی برای رویش گرده است، بلکه نشانه بلوغ گرده نیز هست (۱۷).

از دیگر ویژگی‌های گرده که در مطالعات ریخت-شناختی و هم در بحث تکوین گرده مطرح می‌باشد، اندازه گرده است. Sawyer (۱۹۸۸) گرده‌ها را از نظر اندازه به پنج گروه تقسیم کرد. او اندازه‌های زیر ۲۰µm را بسیار کوچک، بین ۳۰µm- ۲۰ را کوچک، بین ۵۰µm- ۳۰ را متوسط، بین ۱۰۰µm- ۵۰ را بزرگ و بیشترتر از ۱۰۰µm را بسیار بزرگ دانست (۱۹).

چون نوع و ساختار ترکیبات گرده‌ای در مراحل مختلف تکوینی گرده‌ها تغییر می‌کند، کسب آگاهی-های علمی در مورد این سؤال که آیا بین گرده افشان‌ها و مراحل تکوین گرده‌ها انتخابی وجود دارد یا نه، می‌تواند مورد توجه قرار گیرد و در تغذیه مصنوعی گرده افشان‌ها جنبه کاربردی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، کوهپایه‌های استان تهران که در قسمت شمالی استان تهران قرار دارند و ارتفاع آن‌ها بیش از ۱۵۰۰متر است، انتخاب شدند. ارتفاعات و قله‌های بلند این نواحی به صورت کانون‌های آبگیری دائمی، رودهایی را که از این ارتفاعات سرچشمه می-گیرند در طول سال پرآب می‌کنند. پوشش گیاهی استان تهران، از آب و هوا، وضعیت ناهمواری‌ها، خاک و منابع آب استان تأثیر می‌پذیرد. در مناطق شمالی استان، بارش بیش از ۳۰۰ میلی‌متر در سال، پوشش گیاهی مناسبی را به صورت مراتع بهاری و تابستانی در کوه و دشت فراهم آورده است. سطح جنگل‌های طبیعی استان را ۳۸ هزار هکتار تخمین زده‌اند (۲۰).

از ماه اردیبهشت تا آخر شهریور، تعداد ۱۰ کندو در منطقه گذاشته شد و از آخر خرداد، عسل‌های هر ماه تا شهریور به طور جداگانه برداشت گردید تا گرده‌های تازه، مورد سنجش قرار گیرند. با توجه به دوره رویش و گل‌دهی در بازدیدهای متوالی، نمونه-های تمامی گیاهان منطقه جمع‌آوری و خشک گردید و پس از شناسایی و نام‌گذاری به کمک کلید معتبر«فلورا ایرانیکا» (۲۰) و «فلور ایران» (۲۱) در هرباریوم مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور نگهداری شدند. سپس گرده‌های این گیاهان نیز برداشت شدند. تخلیص گرده‌ها به روش Acetolysis (۲۱) و مشاهده‌ها و تهیه عکس‌ها با میکروسکوپ نوری OLYMPUS و میکروسکوپ آنالیز تصویری مجهز به نرم‌افزار LIVE 3000 انجام گرفت، تا در شناسایی گرده‌های عسل به طور مقایسه‌ای به کار آید. ۱۰ گرم عسل از هر نمونه برداشت شد و با رقیق کردن به کمک اسید سولفوریک رقیق و سانتریفیوژ کردن با روش Sawyer (۱۹) و رنگ‌آمیزی، گرده-های عسل، از نظر سیتوکینز، تعداد و نوع هسته و

کروماتین، مورد شناسایی و شمارش قرار گرفتند. برای رنگ‌آمیزی با توجه به تفاوت میزان رنگ‌پذیری و قابلیت رؤیت گرده‌ها در مراحل تکوینی، لام‌های میکروسکوپی آماده شده به طور جداگانه با یکی از رنگ‌های اورسئین، استوکارمن، کریستال ویوله و یا سبزمتیل رنگ‌آمیزی شدند. تکرار آزمایش‌ها به صورت تهیه ۱۰ لام میکروسکوپی از عسل هر ماه صورت گرفت. شمارش میکروسکوپی گرده‌های تک-هسته‌ای و دوهسته‌ای با روش مخصوص شمارش Sawyer برای گرده‌های عسل انجام شد (۱۹) و از آزمون T برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

برای مشاهده نشاسته در آمیلوپلاست گرده‌ها، از محلول رقیق لوگل و روش Sawyer استفاده گردید (۱۹). تکرارها به صورت تهیه ۱۰ لام میکروسکوپی از عسل هر ماه صورت گرفت. شمارش میکروسکوپی گرده‌های فاقد نشاسته و دارای نشاسته نیز با روش مخصوص شمارش Sawyer برای گرده‌های عسل انجام (۱۹) و آزمون T عمل شد. مشاهدات و تهیه عکس‌ها با میکروسکوپ آنالیز تصویری انجام پذیرفت.

در آزمایش دیگری، ۱۰ گرم عسل رقیق شده از هر نمونه بعد از افزودن لوگل، سانتریفیوژ شد و رسوب‌های حاصل بر اساس طیف رنگ، مورد بررسی قرار گرفتند. ترتیب لایه‌های رسوبی به جا مانده در ته لوله آزمایش از لحاظ رابطه رنگ با درشتی دانه-های گرده، بررسی و عکس‌برداری شد. همچنین اندازه دانه‌های گرده دارای نشاسته و فاقد آن، توسط عدسی چشمی و گراتیکول مدرج سنجش شد.

برای سنجش میزان پروتئین گرده‌ها از روش برادفورد استفاده شد (۲۲). در این روش، بعد از تهیه عصاره گرده‌ها با بافر فسفات نمکی حجم‌های مختلفی از عصاره گرده با بافرعصاره تهیه شد و در نهایت از معرف رنگ «کوماسی بلو» G 250 (معرف برادفورد) استفاده شد و بالاخره طیف جذبی تمام ترکیبات در ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

نتایج

گرده‌های گیاهان شناسایی شده در نمونه‌های عسل، همراه با تعداد، تراکم و اندازه آن‌ها در جدول ۱ فهرست شده است. همچنین تصاویری از برخی دانه‌های گرده و گیاهان مربوط به آن‌ها در تصاویر ۱و۲ آورده شده است.

دانه‌های گرده از نظر تک‌هسته‌ای یا دوهسته‌ای بودن و به عبارتی یک سلولی یا دو سلولی بودن، مورد بررسی قرار گرفتند. ۸۰ درصد دانه‌های گرده در مرحله یک سلولی بودند (تصاویر ۳ و ۴). البته تعدادی گرده‌های دو سلولی هم دیده می‌شد و سلول زایشی هنوز به صورت کروی بود (تصویر ۵). در بعضی از نمونه‌ها هم کروموزوم‌ها قابل مشاهده بودند (تصویر ۶).

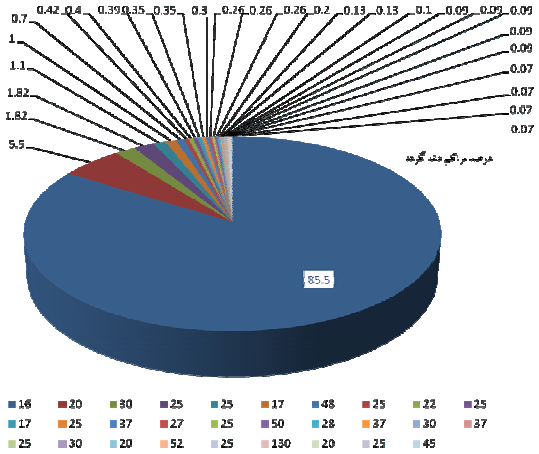
با بررسی‌های به‌عمل آمده، اکثر دانه‌های گرده (۹۳ درصد) در رنگ‌آمیزی با لوگل رنگ نگرفتند؛ به این معنی که فاقد نشاسته بودند. ۳ درصد بقیه به رنگ قهوه‌ای در آمدند و نشاسته کمی داشتند. ۴ درصد دیگر، آبی تیره تا سیاه شدند؛ به این معنی که نشاسته بیشتری داشتند (تصویر ۷). تعدادی از دانه-های گرده کم نشاسته یا فاقد نشاسته از نظر مقدار پروتئین، سنجش شدند (جدول ۲).

۱۰ گرم عسل رقیق شده بعد از افزودن لوگل و سانتریفیوژ، رسوب شیری رنگ در بالا، رسوب قهوه‌ای کم رنگ در زیر آن و سپس رسوب سیاه ایجاد کرد (تصویر ۸). همچنین با اندازه‌گیری قطر دانه‌های گرده، مشخص شد که گرده‌های تک هسته‌ای و رنگ‌پذیر نشده با معرف نشاسته، کوچکتر از بقیه بودند. به عبارتی ۸۶/۵۵ درصد گرده‌ها اندازه بسیار کوچک، یعنی زیر ۲۰µm قطر داشته‌اند. به طور مثال، زرشک (*Berberis vulgaris*) که ۸۵/۵ درصد گرده‌های هر ۱۰ گرم عسل را تشکیل می‌دهد با میانگین قطر ۱۶µm از کوچکترین گرده-هاست و گرده‌هایی مانند ختمی پنجه‌ای بریده (*Alcea ficifolia*)که بسیار بزرگ است، با میانگین قطر ۱۳۰µm از کمترین تراکم در عسل برخودار است (جدول ۱ و نمودار ۱).

جدول ۱- گرده‌های گیاهان شناسایی شده درنمونه‌های عسل، میانگین تعداد و تراکم گرده‌های شمارش شده در ۱۰ گرم عسل همراه با اندازه دانه گرده در برداشت ماه‌های تیر تا مهر.

گرده گیاهان (چیدمان براساس تراکم در عسل)	نام فارسی گیاهان	تعداد گرده	تراکم گرده(٪)	قطر گرده(μm)
Berberis vulgaris L.	زرشک	۲۱۹۱۶۲۶/۵۹۲	۸۵/۵	۱۶
Isatis kotschyana Boiss. & Hohen.	وسمه دماوندی	۱۴۰۴۶۷/۰۴۲۸	۵/۵	۲۰
Acanthophyllum microcephalum Boiss.	چوبک ایرانی	۴۶۵۴۰/۳۱۸۷۵	۱/۸۲	۳۰
Cerasus microcarpa (C. A. Mey.) Boiss.	راناس	۲۸۷۷۰/۳۲۳۶۷	۱/۱	۲۵
Cotoneaster ovata Pojark.	شیرخشت خراسانی	۲۵۳۸۸/۴۶۱۷	۱	۲۵
Eupatorium cannabinum L.	-	۱۸۰۵۲	۰/۷	۱۷
Epilobium hirsutum L.	بید علفی کرکی	۱۰۷۱۸/۳۷۶۱	۰/۴۲	۴۸
Cardaria draba (L.) Desv.	ازمک	۱۰۱۵۴/۲۵	۰/۴	۲۵
Melilolotus officinalis (L.) Desr.	یونجه زرد	۷۳۳۳/۶۲۸۰۶۷	۰/۳۹	۲۲
Astragalus aureus willd.	گون طلایی	۹۰۲۶/۰۰۳	۰/۳۵	۲۵
Reseda lutea L.	ورث زرد چهره	۹۰۲۶	۰/۳۵	۱۷
Centaurea virgata Lam.	گل گندم بوته‌ای	۸۴۶۱/۸۷۶۱	۰/۳	۲۵
Salvia virgata Jacq.	مریم گلی هرز	۶۷۷۸/۷۶	۰/۲۶	۴۰
Phlomis olivieri Benth.	گوش بره	۶۷۶۹/۵	۰/۲۶	۲۷
Chaerophyllum macropodum Boiss.	جعفری فرنگی کوهستانی	۶۷۶۹/۵	۰/۲۶	۲۵
Pterocephalus canus Coult. ex DC.	سربال	۵۰۷۷/۱۲۶۱	۰/۲	۵۰
Hippomarathrum microcarpum (M.B.) B. Fedtsch.	شوید اسبی	۳۳۸۴/۷۵	۰/۱۳	۲۸
Cousinia nekarmanica Rech. f.	هزار خار نکارمنی	۳۳۸۴/۷۵	۰/۱۳	۳۷
Bromus danthoniae Trin.	جارو علفی هرز	۳۳۸۴/۷۵	۰/۱	۳۰
Dianthus orientalis Adams subsp. *orientalis*	میخک شرقی	۲۲۵۶/۵	۰/۰۹	۳۷
Crepis sancta (L.) Babcock	ریش قوش	۲۲۵۶/۵	۰/۰۹	۲۵
Rosa iberica Stev.	رزذوالفقاری	۲۲۵۶/۵	۰/۰۹	۳۰
Astragalus microcephalus Willd.	گون زرد	۲۲۵۶/۵	۰/۰۹	۲۰
Lonicera iberica M. B.	پلاخور بوته ای	۲۲۶۵/۵	۰/۰۹	۵۲
Unknown	-	۲۲۵۶/۵	۰/۰۹	۲۵
*Gypsophila bicolor (*Freyn & Sint.) Grossh.	گچ دوست	۱۶۹۲/۳۷۶۱	۰/۰۷	۲۵
Alcea ficifolia L.	ختمی پنجه‌ای بریده	۱۶۹۲/۳۷۵۸۳۳	۰/۰۷	۱۳۰
Achillea vermicularis Trin.	بومادران کوهستانی	۱۶۹۲/۳۷۵۸۳۳	۰/۰۷	۲۰
Allium erubescens C. Koch.	پیاز رودباری	۱۶۹۲/۳۷۵۸۳۳	۰/۰۷	۲۵
Convolvulus chondrilloides Boiss.	پیچک قندرونی	۱۶۹۲/۳۷۵۸۳۳	۰/۰۷	۴۵
جمع		۲۵۶۳۱۱۵/۰۶۷	۱۰۰	M=۳۴/۳۲

M= میانگین



قطر دانه گرده (میکرون)

نمودار ۱- ارتباط قطر دانه‌های گرده با درصد تراکم آن‌ها در عسل‌های ماه‌های تیر تا مهر. راهنمای طیف رنگ، قطر دانه‌های گرده و اعداد روی نمودار، درصد تراکم دانه‌های گرده را نشان می‌دهند.

تصاویر میکروسکوپ نوری و شمارش گرده نیز این مطالب را تأیید کرد. همچنین دانه‌های گرده‌ای که بیشترین فراوانی را در جمع‌آوری گرده‌ها از گیاهان یا در عسل داشته‌اند، با لوگل رنگ نگرفتند؛ به این معنی که فاقد نشاسته بودند. فراوان‌ترین این گرده‌ها متعلق به گیاهان زرشک (*Berberis* vulgaris)، چوبک (*Acanthophyllum micrpcephalum*)، ریش‌قوش (*Crepis sancta*)، بارهنگ (*Plantago lanceolata*) و بید علفی‌کرکی (*Epilobium hirsutum*) هستند. برخی دیگر از دانه‌های گرده که فراوانی کمتری در جمع‌آوری توسط زنبورها داشتند، گرده‌های گیاهان بومادران کوهستانی (*Achillea vermicularis*) و گون طلایی *Astragalus aureus* هستند (جدول ۱).

برخی از گرده‌ها که سنجش پروتئین شدند، در جدول ۲ آمده‌اند. همان گونه که مشاهده می‌شود، دانه‌های گرده زرشک که بیشترین تراکم را در عسل داشتند، حدود ۳۴ درصد پروتئین دارند. همچنین دانه‌های گرده چوبک که در مرتبه بعدی تراکم قرار داشتند، حدود ۵۴ درصد پروتئین دارند.

جدول ۲- میزان پروتئین گرده برخی از گیاهان با میانگین تراکم گرده در نمونه های عسل از تیر تا مهر.

گونه گیاهی (جیدمان بر اساس تراکم)	میانگین تراکم گرده در نمونه‌های عسل(٪)	تراکم پروتئین گرده (٪)
Berberis vulgaris	۸۵/۵	۳۳/۸۶ ±۱/۲۴
Acanthophyllum microcephalum	۱/۸۲	۵۳/۸۳ ±۱/۹۲
Crepis sancta	۰/۰۹	۲۲/۱ ±۰/۸۴

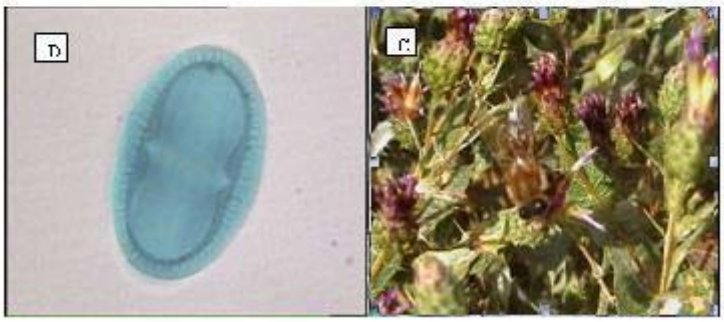
بحث و تفسیر

سیتوکینز نامتقارن در گامتوفیت نر اکثر نهاندانگان روی می‌دهد و می‌تواند یک نکته تکاملی باشد. نتیجه سیتوکینز نامتقارن، به‌وجود آمدن دو هسته و سپس دو سلول زایشی و رویشی است (۲۲). وجود یا عدم وجود نشاسته در دانه‌های گرده، یک نکته تکاملی به شمار می‌آید و با اندازه دانه گرده در ارتباط است (۲۳).

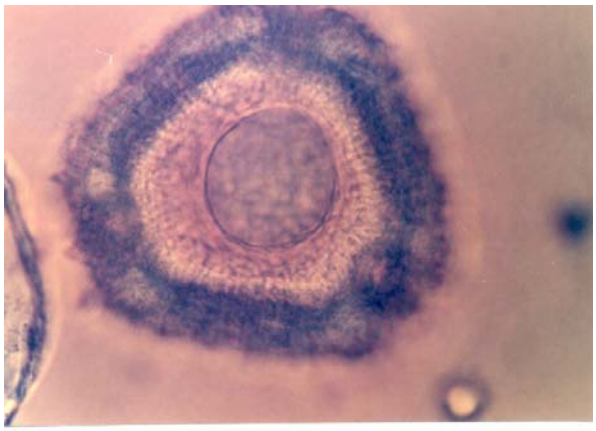
تفسیر مربوط به مرحله تکوینی گرده‌ها (وضعیت هسته ها)

به‌طور معمول، تک‌هسته‌ای‌بودن دانه گرده، موقعیت مرکزی هسته و حجیم بودن آن می‌تواند نشانگر وضعیت قبل از تقسیم باشد. در حالی که اگر دو هسته در گرده مشاهده شود (هسته بزرگ رویشی و هسته کوچک زایشی) دانه گرده در اواخر مرحله بلوغ به‌سر می‌برد و آماده رویش و لقاح است. در این پژوهش، گرده‌های موجود در عسل و تله گرده‌گیر، هم در مرحله تک هسته‌ای (تصاویر ۱و۲) و هم در مرحله دو هسته‌ای مشاهده شدند (تصویر ۳)، ولی بیشتر گرده‌ها در مرحله تک هسته‌ای بودند (حدود ۸۰ ٪).

تصویر ۱ - A: گیاه میخک شرقی (*Dianthus orientalis*) و B: گرده چند منفذی (polyporate) آن (۱۸۰۰×).



تصویر ۲ – C: گیاه هزارخارنکارمنی (*Cousinia nekarmanica*) D : گرده آن که منفذدار (porate) است (۷۲۰×).



تصویر ۳- دانه گرده گیاه سربال (*Pterocephalus canus*) در مرحله یک هسته‌ای (۱۰۰۰ ×) .

زنبورهای عسل چون حجم وسیعی از گـرده‌هـا را جابه‌جا می‌کنند، نقش مهمی در ازدیاد باروری دارند. از نتیجه بررسی‌هایی کـه در ایـن پـژوهش بـه عمـل آمده به‌نظر می رسد دانه‌های گرده تک‌هـسته‌ای کـه قبل از تقسیم و در حال آمـاده شـدن بـرای تقـسیم هستند، برای انتقال به کلاله مناسب‌تر باشـند؛ چـون هنوز تا پیر شدن فاصله دارند و فرصت بیشتری برای رویش و لقاح دارند، در ضمن می‌توانند بقیـه مراحـل تکوینی را بر روی کلاله طی کنند.

تصاویری که از این بخش از کار پژوهشی ما وجود دارد در بعضی از نمونه‌ها نشان دهنده تحلیل رفتن و تخریب پوشش هسته یا هسته‌ها و پراکنده شدن کروموزوم‌ها در سلول است (تصویر ۴). می‌توان این طور توجیه کرد که شرایط نگهدارنده عسل تا مدتی موجب حفاظت گرده‌ها می‌شود و سپس با از دست دادن آب عسل و به‌هم خوردن شرایط اسمتیک، گرده‌ها شروع به تخریب می‌کنند؛ چون در مراحل و مشاهدات اولیه پژوهش، همه گرده ها سالم بودند.

تصویر۴- دانه گرده در گیاه زرشک (*Berberis vulgaris*) در مرحله یک هسته‌ای از تکوین گرده دیده می‌شود (۱۰۰۰ ×).

همان‌طور که بیان شد در عسل، عده‌ای از گرده‌ها سالم و عده‌ای در حال فروپاشی بودند. دلیل آن را می‌توان چنین تفسیر کرد که ۱) گرده‌ها همزمان به عسل آورده نشده‌اند؛ ۲) گرده‌ها در یک مرحله تکوینی نبوده، به همین دلیل، مقاومت یکسان نداشته‌اند. بنابراین، هر چه گرده‌ها زمان بیشتری در عسل بمانند بیشتر آب از دست می‌دهند و با از دست دادن آب، شروع به تحلیل رفتن و فرو پاشی می‌کنند.

به طورکلی، زنبورهای عسل با پراکنش اکثر دانه-های گرده‌ای که آماده بـرای بلـوغ هـستند، تـضمین خوبی برای لقاح موفق به شمار می آیند.

تفسیر مربوط به ذخیره نشاسته در تکوین گرده

اکثر گرده‌های جمع‌آوری شـده توسـط زنبورهـای عسل در این پژوهش، یا فاقد نـشاسته‌انـد (۹۳ ٪) یـا نشاسته کمی دارند (۳٪) که با گـزارش Shivanna (۲۰۰۳) همـسویی دارد (۵). او اظهـار داشـته اسـت: «گونه‌های حشره‌پسند که عموماً به وسیله پرده‌بالان (Hymenoptera) و دوبـــــــالان (Diptera) گرده‌افشانی می‌شوند گرده‌های کم نشاسته‌ای تولیـد مـی‌کننـد و آن‌هـایی کـه بـه وسـیله فلـس بـالان (Lepidoptera) و همین‌طور پرندگان گرده‌افشانی می‌شوند، گرده نشاسته‌ای تولید می‌کنند». طبق ایـن نظر، زنبورهای عسل باید بیشتر طالب گرده‌های کم-نشاسته باشند که پژوهش‌های ما نیز چنین مطلبی را تأیید می‌کند. به این ترتیب، منطقی خواهد بـود کـه تراکم سایر ترکیبات مثل لیپیدها و به ویژه پروتئین-ها در دانه‌های کم‌نشاسته افزایش داشته باشد.

در بررسی‌های ما، دانه‌های گـرده گیاهـانی نظیـر زرشک، بومادران، چوبک با محلول لوگل رنگ نگرفته و آبی نشده‌انـد؛ یعنـی فاقـد نـشاسته‌انـد. از طرفـی، آزمایش‌های تشخیص میزان پروتئین در این دانه‌های گرده نشان داد که عموماً دانه‌های گرده کم نـشاسته یا فاقد نشاسته، از میزان پـروتئین قابـل ملاحظـه‌ای برخوردار هـستند (جـدول ۲). پژوهـشگران زیـادی، افزایش پروتئین‌ها در دانه‌های گـرده را مـورد توجـه قرار داده و برای آن دلایل متفاوتی مطرح کرده‌اند، از

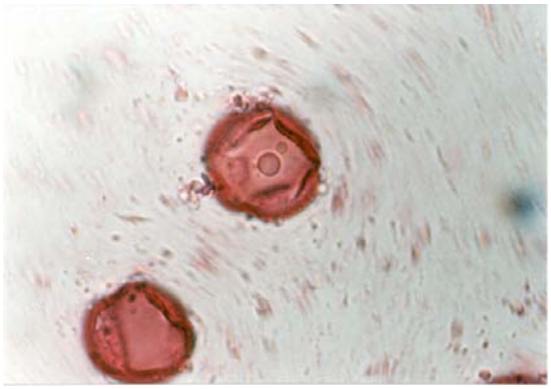
جمله Polya و همکاران (۱۹۸۶)، پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم را در گرده تشخیص داده و پیشنهاد می‌دارند «به هنگام گرده‌افشانی ممکن است یک مسیر عبور با راهنمایی کلسیم میانجی، صورت پذیرد» (۲۴). همچنین ثابت شده است در پاسخ به خود ناسازگاری، فسفریلاسیون یک پروتئین گرده‌ای ۲۶ کیلو دالتونی در گیاه شقایق *Papaver rhoeas* افزایش می‌یابد که در گرده‌افشانی نقش مهمی دارد (۲۵). بنا به تحقیقات Goring و Rothstein (۱۹۹۲): «پروتئین کیناز سرین/ترئونین در گرده کلزا (*Brassica napus*) کُد می شود» (۲۶). متفقاً Goring و همکاران (۱۹۹۳) و Nasrallah و همکاران (۱۹۹۴) اعلام داشته‌اند: «پروتئین کیناز سرین/ترئونین برای پاسخ به خود ناسازگاری گرده‌ای کلزا لازم است» (۲۷ و ۲۸). همچنین Rudd و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کرده اند: «پروتئین کینازها به یقین در پاسخ به خود ناسازگاری گرده‌ای در گونه‌هایی از شلغم (*Brassica spp.*) دخالت دارند» (۲۵).

این شواهد نشان می‌دهند که افزایش پروتئین در دانه‌های گرده می‌تواند به دلیل نوعی مقابله به خودناسازگاری گرده‌ای نیز باشد. در واقع، برخی از دانه‌های گرده پروتئین‌دار به نوعی با خود ناسازگاری گرده‌ای مواجه‌اند و برای لقاح مشکل دارند.

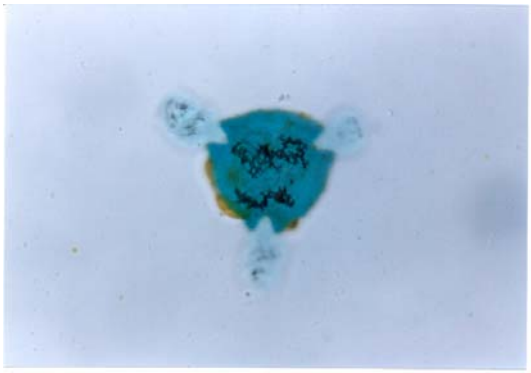
در پژوهش‌های ما، افزایش پروتئین به جای افزایش نشاسته در دانه‌های گرده خود عاملی می‌گردد تا توجه زنبور عسل به چنین دانه‌های گرده‌ای بیشتر جلب شود و امکان لقاح را در آن‌ها که به دلیل خود ناسازگاری سلب شده بود جبران و حتی بیشتر نماید. این مطلب یک نکته تکاملی مهم هم در مراحل نموی گرده‌ها و هم در حفظ حیات گیاهانی است که دانه‌های گرده خود ناسازگار دارند و نمی‌توانند در امر خودلقاحی موفق باشند. بنابراین، زنبور عسل با علاقه‌مندی به گرده‌های پروتئین‌دار، شانس دگرلقاحی را در آن‌ها افزایش می‌دهد. پژوهش‌های ما نیز نشان داد که زنبورهای عسل، بیشتر دانه‌های گرده‌ای را بر می‌گزینند که فاقد نشاسته یا کم نشاسته باشند. تغییر فعالیت‌های بیوسنتزی از بیوسنتز نشاسته به سنتز پروتئین‌ها می‌تواند نوعی سازگاری برای افزایش انتخاب گرده‌ها و بالا بردن شانس لقاح و پایداری گونه‌ای در عده‌ای از گیاهان خود ناسازگار باشد

مطالب فوق نشان دهنده این است که زنبورعسل در تکامل این گیاهان نقش داشته است و این امر با گزارش‌های Baker and Baker (۱۹۷۹) مطابقت دارد که اظهارمی‌دارند: «تیره‌های گیاهی ابتدایی تمایل به داشتن گرده‌های نشاسته‌ای دارند و دانه‌های گرده تیره‌های پیشرفته گیاهی نشاسته کمتری دارند» (۲۹) و نیز با گزارش Endress (۱۹۹۴) که می‌گوید: « تکامل و تنوع گیاهان گل‌دار به خاطر حشراتی است که ۱۴۰ میلیون سال از این تکامل توأم نتیجه شده‌اند (فلس بالان *Lepidoptera*، دوبالان *Diptera* و پرده بالان *Hymenoptera*)» (۲۳) همسویی دارد.

آزمایش‌های ما با سانتریفیوژ عسل رقیق شده، نشان داده است که گرده‌های فاقد نشاسته، مقدار زیادی از رسوبات را در لوله سانتریفیوژ تشکیل می‌دهند و بنابراین باید کوچک‌تر باشند. گرده‌های کم نشاسته، بخش میانی رسوبات را اشغال می‌کنند، بنابراین از نظر اندازه باید کمی بزرگ بوده و گرده‌های دارای نشاسته زیاد که لایه نازکی را در پایین‌ترین بخش رسوبات تشکیل می‌دهند طبیعی است که باید از نظر اندازه، بزرگ باشند (تصویر ۵). اندازه‌گیری قطر گرده‌ها، ثابت نمود که اکثر (۹۳٪) گرده‌های فاقد نشاسته، قطری در حد ۳۰µm - ۲۰ داشته اند (جدول ۱). این نتایج با گزارش Endress (۱۹۹۴) تطابق دارد که اظهار داشته است: «دانه‌های گرده نشاسته‌دار، تمایل بیشتری به بزرگ شدن دارند تا گرده‌های کم نشاسته‌ای» (۲۳). زنبورهای عسل در هر بار جمع‌آوری از دانه‌های گرده با ابعاد کوچک، می‌توانند تعداد بیشتری از آن‌ها را انتقال داده و امکان لقاح را افزایش دهند. این وضعیت برای دانه‌های گرده کم نشاسته که در ضمن کوچکند، نوعی تکامل نموی محسوب می‌شود.



تصویر ۵- دانه گرده در گیاه زرشک (*Berberis vulgaris*) در مرحله دو هسته‌ای از تکوین گرده دیده می شود (هسته زایشی کوچک و هسته رویشی بزرگ) (۱۰۰۰×).



تصویر ۶- دانه گرده در گیاه پلاخور بوته‌ای (*Lonicera iberica*). غشای هسته‌ها از بین رفته و کروموزوم‌ها قابل مشاهده‌اند (۴۰۰ ×).

تصویر ۷- مقایسه دانه‌های گرده نشاسته‌ای(سیاه رنگ) و غیر نشاسته‌ای(شیری رنگ) (۲۰۰ ×).

B= Berberis vulgaris , P=Phlomis olivieri , S=Salvia virgata, C =Convolvulus chondrilloides

تصویر ۸- رسوب گرده‌ها در لوله آزمایش بعد از رنگ‌آمیزی با لوگل و سانتریفوژ. A: رسوبات شیری رنگ در بالا(فاقد نشاسته)؛ B: ر سوب قهوه‌ای در وسط (کم نشاسته)؛ C: رسو ب سیاه در زیر آن (نشاسته‌ای) و D: سایر مواد در پایین‌ترین بخش دیده می‌شوند.

از دیگر موارد بررسی شده در گیاهان با گرده کم-نشاسته‌ای که Pacini (۱۹۹۷) و Franchi و همکاران (۱۹۹۶) عنوان کرده‌اند این است که: «دانه-های گرده کم نشاسته‌ای، مقاومت به خشکی بهتری دارند تا دانه‌های گرده نشاسته‌ای» (۳۱ ،۳۰). این مطلب نیز با نتایج ما همسویی دارد، زیرا منطقه مورد مطالعه، دارای اقلیم سرد و خشک است و طبیعتاً گیاهان آن نیز با منطقه سازگار هستند. عامل دیگر برای مقاومت به خشکی این دانه‌های گرده، آب-دوست‌بودن محتوای پروتئینی آن‌ها ست که در دانه-های گرده کم نشاسته بیشتر است و قدرت جذب آب را در آنان بیشتر می‌کند. داشتن پتانسیل آبی بیشتر، این امکان را می‌دهد تا در فرایند دگرلقاحی که به هر حال امری زمان‌بر است، دانه‌های گرده در انتقال از گلی به گل دیگر، خشک و بی مصرف نگردند.

از سوی دیگر، Datta و همکاران (۲۰۰۲) اعلام داشته‌اند که «سنتز نشاسته در آخرین مرحله بلوغ گرده، آن را برای لقاح آماده می‌سازد» (۱۸). بنابراین، عدم وجود نشاسته در اکثر گرده‌های جمع-آوری شده توسط زنبورهای عسل، خود حاکی از آن است که حتی اگر زنبورهای عسل به سراغ گرده‌های نشاسته‌ای بروند، غالباً در مراحل اولیه تکوین گرده که هنوز نشاسته در آن‌ها تشکیل نشده است این کار را انجام می‌دهند. این مسأله توان زیستی گرده‌ها را بالا می‌برد و شانس لقاح موفق را افزایش می‌دهد.

با توجه به مجموع نتایج به دست آمده از بررسی فراوانی گرده‌های موجود در عسل‌های مورد آزمایش در پژوهش حاضر، گرده‌های موجود در منطقه با توجه به پوشش گیاهی آن به نظر می‌رسد نوعی سازگاری (گزینش) بین مراحل تکوینی دانه‌های گرده و انتخاب آن‌ها توسط زنبورهای عسل وجود دارد و اغلب گرده‌ها در مرحله تک هسته‌ای توسط زنبورها گرده افشانی می‌شوند تا فرصت کافی برای زنده ماندن، رویش و شرکت در لقاح را داشته باشند. همچنین زنبورها گرده‌های کم نشاسته و به عبارتی کم حجم‌تر را ترجیح می‌دهند که این امر نیز با مراحل تکوینی گرده‌ها سازگار است. زیرا گرده‌های دو هسته‌ای و رشد یافته، در پایان مراحل نموی، حجم و وزن بیشتری نسبت به گرده‌های تک هسته-ای دارند.

منابع مورد استفاده

۱. تقوی‌زاد راضیه، احمد مجد، فتح الله فلاحیان، حسن نظریان و صدیقه مهرابیان، ۱۳۸۶، بررسی ویژگی-های گیاهان شهدزا و گرده‌زا درجلب زنبورعسل در منطقه سبراچال، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۴.

۲. مجد احمد، ۱۳۷۶، جزوه درسی گرده شناسی، دانشگاه تربیت معلم.

۳. اکبرزاده قره تپه، مرتضی، ۱۳۶۹، تهیه پوشش گیاهی به روش فلوریستیک و فیزیونومیک (منطقه سیراچال)، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران.

۴. قهرمان احمد، ۱۳۶۵-۱۳۷۷، فلور ایران، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

5. Shivanna, K. R., 2003. Pollen Biology and Biotechnology. Science Publishers, Inc USA. 6: 231-235.
6. Mathur, G., Mohan, Ram, H. Y., 1978. Significance of petal colour in thrips–pollinated *Lantana camera* L. Ann Bot 42: 1473-1476.
7. Hesse, M., Mayer, U., Jurgens, G., 1988. Cytokinesis in flowering plants: Cellular process and developmental integration. Curr Optin Plant Biol 1: 486-491.
8. Angold, R. E., 1968. The formation of the generative cell in the pollen grain of Endymion non-scriptus (L.). J Cell Sci 3: 573-578.
9. Pandolfi, T., Pacini, E., Calder, D. M., 1993. Ontogenesis of monad pollen in *Pterostilis plumosa* (Orchidaceae, Neottioideae). Plant Syst Evol 186: 175-184.
10. Mepham, R. H., Lane, G. R., 1970. Observation on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. Protoplasma 70: 1-20.
11. Gorska-Brylass, A., 1970. The "callose stage" of the generative cells in pollen grains. Grana 10: 21-30.
12. Echlin, P., 1972. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. IV. Pollen grain maturation. J Cell Sci 11: 111-129.
13. Pierson, E. S., Cresti, M., 1992. Cytoskeleton and cytoplasmic organization of pollen and pollen tubes. Int Rev Cytol 140: 73-125.
14. Derksen, J., Pierson, E. S., Traas, J. A., 1985. Microtubules in vegetative and generative cells of pollen tubes. Europ J Cell Biol 38: 142-148.
15. Cristi, M., Ciampolini, F., Kapil, R. N., 1984. Generative cells of some angiosperms with particular emphasis on their microtubules. J Submicros Sytol 16: 317-326.
16. Sanger, R., Jackson, W. T., 1971. Fine structure study of pollen development of *Haemanthus katherinae* Baker. III. Changes in organelles during development of the vegetative cell. J Cell Sci 8: 317-329.
17. Christensen, J. E., Horner, H. T. J. R., 1974. Pollen development and its special orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*. Am J Bot 61: 604-623.
18. Datta, R., Chamusco, H., Karen, C., Chourey, B., Prem, S., 2002. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. Plant Physiol 130: 1645-1656.
19. Sawyer, R., 1988. Honey Idedtification. Cardiff Academic Press pp. 1-108.
20. Rechinger, K. H., 1963-1982: Flora Iranica No. 1-156 Graz.
21. Erdtman, G., 1960. The acetolysis method. A revised description. Svensk Botanisk Tidskrift 54: 556-564.
22. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of ug quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
23. Endress, S. K., 1994. Diversity and Evolutionary Biology of Tropical flowers. Cambridge Univ. Press, New York, NY.
24. Polya, G. M., Micucci, V., Rae, A. L., Harris, P. J., Clarke, A. E., 1986. Ca^{+2} dependent protein phosphorilation in germinated pollen of *Nicotiana alata*, an ornamental tobacco. Physiol Plant 67: 151-157.
25. Rudd, J. J., Christopher, F., Franklin, H., Lord, J. M., Franklin-Tong, V. E., 1996. Increased phosphorylisation of a 26-kD pollen protein is induced by the self-incompatiblity response in *Papaver rhoeas*. Plant cell 8: 713-724.
26. Goring, D. R., Rothstein, S. J., 1992. The S-Locus Receptor Kinase Gene in a Self-Incompatible *Brassica napus* Line Encodes a Functional Serine/Threonine Kinase. The Plant Cell 4: 1273-1281
27. Goring, D. R., glavin, T. L., Schafer, U., Rothstein, S. J., 1993. An S-receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1-bp deletion. Plant cell 5: 531-539.
28. Nasrallah, J. B., Rundle, S. W. J., Nasrallah, M. E., 1994. Genetic evidence for the requirement of the *Brassica* S-locus receptor kinase gene in the self-incompatibility response. Plant J 5: 373-384.
29. Baker, S. G., Baker, I., 1979. Starch in angiosperm pollen and its evolutionary significance. Am J Bot 66: 591-600.
30. Pacini, E., Franchi, G. G., Hesse, M., 1985. The tapetum: It’s from, function and possible phylogeny in Embryophyta. Plant Syst Evol 149: 155-185.
31. Franchi, G. G., Bellani, L., Nepi, M., Pacini, E., 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: Localization, systematic distribution and eco-physiology significance. Flora 191: 143-159.