

بررسی ساختار اندام‌های رویشی و تکوین اندام‌های زایشی بادیان رومی (*Pimpinella anisum* L.)

پریسا جنوبی^۱، احمد مجد^۱، عارف معروف^۲ و شهلا امینی^{۳*}

دریافت: ۱۳۹۲/۷/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۷

^۱گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

^۲بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان

^۳مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج

*مسئول مکاتبات: amini@imp.ac.ir

چکیده. بادیان رومی متعلق به تیره چتریان است. با توجه به اهمیت شناخت مراحل تکوینی در گسترش دانش زیست‌شناسی، بادیان رومی که ارزش دارویی و اقتصادی زیادی دارد، انتخاب شد. نمونه‌های اندام‌های رویشی و زایشی در مراحل متفاوتی از تکوین انتخاب و با استفاده از روش‌های سلول-یافت‌شناسی بررسی شدند. مشاهده ساختار تشریحی اندام‌های رویشی نشان داد در بین بافت پارانشیمی برگ مجرای ترشعی قرار دارد. برش غنچه‌های گل نشان داد که بساک‌ها دارای چهار کیسه گرده بوده و تقسیم سلول‌های مادر گرده از نوع هم‌زمان، تترادهای میکروسپور از نوع چهاروجهی و لایه مغذی از نوع ترشعی است. بررسی فراساختار دانه گرده با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که دانه گرده سه‌شیری و تزئینات سطح اگزین از نوع مشبک منفذدار است. تخمدان دو-برچه و دوخانه، تخمک واژگون و تک‌پسته‌ای است. نمو کیسه رویانی نیز الگوی عمومی دولپه‌ای‌ها را دارد. در بررسی رویان‌زایی، رویان‌های کروی، لپه‌ای، اژدری و گذر از رویان کروی به رویان قلبی مشاهده شد. اندام‌های رویشی بادیان رومی دارای ساختار عمومی دولپه‌ای‌ها است. الگوهای تکوین تخمک و کیسه رویانی از نهان‌دانگان و تیپ پلی‌گونوم تبعیت می‌کنند. تترادهای میکروسپور از نوع تتراهدردال است. فراساختار دانه گرده شبیه به جنس *Smyrniium* تیره چتریان است. در بررسی رویان‌زایی نیز کلیه مراحل رویانی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی. چتریان، دولپه، دانه گرده، تخمک، رویان‌زایی

Investigation the structure of vegetative organs and development of reproductive organs of *Pimpinella anisum* L.

Parisa Jonoubi¹, Ahmad Majd¹, Aref Marouf² and Shahla Amini^{3,1*}

Received 08.10.2013 / Accepted 19.10.2015

¹Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

²Plant Protection Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Zanjan, Iran

³Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

*Correspondent author: amini@imp.ac.ir

Abstract. *Pimpinella anisum* L. belongs to Apiaceae family. The samples of vegetative and reproductive organs at different stages of development were gathered and investigated by cell-histology methods. The investigation of the anatomical structure of vegetative organs showed that the secretory ducts are arranged between the parenchymal tissues of the leaf. Section of flower buds revealed that anthers had 4 pollen sacs, the division of pollen mother cell was of the simultaneous type, microspore tetrads were of tetragonal type and the tapetum layer was secretory. The study of the ultrastructure of pollen grains with SEM showed that they had 3 pores. The ovary was found to be two-chambered and two-carpeled; the ovule to be anatropous and to have one membrane. In embryogenic investigation it was found that the embryos were globular, cotyledonary and torpedo-shaped and the transition between globular embryos to cordate embryos was found. The vegetative organs were observed to have the general structure of dicotyledons. The development patterns of ovule and embryo sac follow the Polygonum type. Tetrahedral microspore tetrads were observed. The ultrastructure of pollens was found to be similar to those of *Smyrniium*, a genus of Apiaceae family. All stages of embryogenesis were covered in this study.

Keywords. Apiaceae, vegetative organs, pollen grains, ovule, embryogenesis

مقدمه

دسترس نیست و در زمینه تکوین اندام‌های زایشی آن پژوهشی انجام نشده است، بنابراین بررسی ساختار تشریحی-تکوینی اندام‌های رویشی و زایشی این گیاه با روش‌های سلول-بافت-شناختی از اهداف این پژوهش است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی تحت آزمایش بادیان رومی شامل ریشه، ساقه، برگ، گل و بذر از مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی قزوین در اواخر تیرماه تا اواسط شهریور ۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. برای بررسی بخش‌های رویشی، نمونه‌ها در فیکساتور مناسب (الکل-گلیسرین به نسبت ۱ به ۱) نگهداری شدند و سپس برش‌های نازک دستی از آنها گرفته شد. پس از عبور برش‌ها از آب ژاول و اسیداستیک و شست‌وشو با آب مقطر، رنگ‌آمیزی مضاعف (متیلن بلو-کارمن زاجی) انجام شد و برش‌ها با میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شدند. برای بخش‌های زایشی فیکساتور FAA (اتانول، فرمالدهید و اسیداستیک به نسبت ۱۷، ۲ و ۱ میلی‌متر) استفاده شد. نمونه‌ها با توجه به ضخامت و مراحل متفاوت تکوینی به مدت ۶-۱۲ ساعت داخل فیکساتور قرار داده شدند و سپس مراحل آماده‌سازی نمونه (شست‌وشو، آب‌گیری با درجات افزایشی الکل، شفاف‌سازی در نسبت‌های مختلف الکل/تولون، پرافین‌دهی، قالب‌گیری، آرایش بلوک پرافینی و سوار کردن بلوک) انجام شد (Dadpour et al., 2008). پس-از برش‌گیری با دستگاه میکروتوم، برش‌های با ضخامت ۱۰-۷ میکرون تهیه شدند. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین انجام شد و با میکروسکوپ تحت مطالعه قرار گرفت.

برای بررسی فراساختار دانه‌های گرده‌ها از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده شد. بدین منظور ابتدا دانه‌های گرده در مجاورت هوا قرار داده تا خشک شد سپس به کمک چسب مخصوص روی پایه‌های کوچک آلومینیومی چسبانده و پایه‌های آماده‌شده پس از پوشش‌دهی با طلا، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس از کشور هلند تحت عکس‌برداری قرار گرفت (Leonardis et al., 2009).

بادیان رومی یا آنیسون با نام علمی *Pimpinella anisum* L. به تیره چتریان متعلق است. تیره چتریان دارای ۴۵۵ جنس و ۳۶۰۰ تا ۳۷۵۱ گونه در مناطق معتدل و مرتفع نیمکره شمالی است (Vasyata et al., 1984). بادیان رومی حاوی ترکیباتی نظیر اسانس فرار با مزه شیرین و معطر با ماده عاملی آنتول است؛ به همین علت در طبخ و آشپزی همچون چاشنی استفاده می‌شود. این گیاه خواص دارویی فراوانی نظیر آنتی‌اکسیدان، ضدنفخ، ضد تشنج و ضدصرع دارد (امید بیگی، ۱۳۷۹). بادیان رومی سه نوع متفاوت برگ دارد که در بخش‌های مختلف گیاه شکل آن متفاوت است (زرگری، ۱۳۷۲). وجود دسته آوندی بزرگ‌تر در وسط برگ (رگبرگ اصلی) و دسته‌های آوندی کوچک‌تر در دوطرف برگ در گونه *Foeniculum vulgare* Mill. از تیره چتریان به‌عنوان ساختاری مشابه با ساختار برگ بادیان رومی گزارش شده است (مداح، ۱۳۷۵). گل آذین آنیسون مرکب از چندین چتر است که از صفات مشخص این تیره می‌باشد و شامل ۱۰ تا ۱۵ چترک است. گل‌های سفید و کوچک بادیان رومی در طول ماه‌های خرداد و تیر ظاهر می‌شوند (چهرگانی‌راد و همکاران، ۱۳۸۹). میوه گیاه آنیسون فندقه دوتایی است که شباهت زیادی به میوه‌های گیاه شوکران دارد. بذر آن در طول ماه‌های مرداد و شهریور می‌رسد (Randhawa et al., 1992). از جمله مطالعات انجام‌شده درباره میوه این گیاه می‌توان به نتایج Khajepiri و همکاران (2010) اشاره کرد که گزارش داده‌اند میوه این گیاه، شیزوکارپ با یک یا دو مریکارپ است که فندقه دوتایی نیز گفته می‌شود.

در سال‌های اخیر، به زیست‌شناسی تکوینی زایشی بیشتر توجه شده است که بررسی مراحل مختلف تکوین، یعنی اندام‌زایی، تکوین پرچم و دانه گرده، تکوین تخمک و مگاسپوریت را شامل می‌شود. توسعه دانش زیست‌شناسی تکوینی و بررسی چگونگی مراحل تکوین اندام‌های تولیدمثلی برای حفظ گیاهان به‌ویژه گیاهان نادر و در حال انقراض و مهم در بخش کشاورزی ضروری است (چهرگانی‌راد و همکاران، ۱۳۸۹).

باتوجه به بررسی‌های مرجع‌شناختی انجام‌شده، اطلاعات دقیقی در زمینه ساختار تشریحی و تکوینی گیاه بادیان رومی در

نتایج

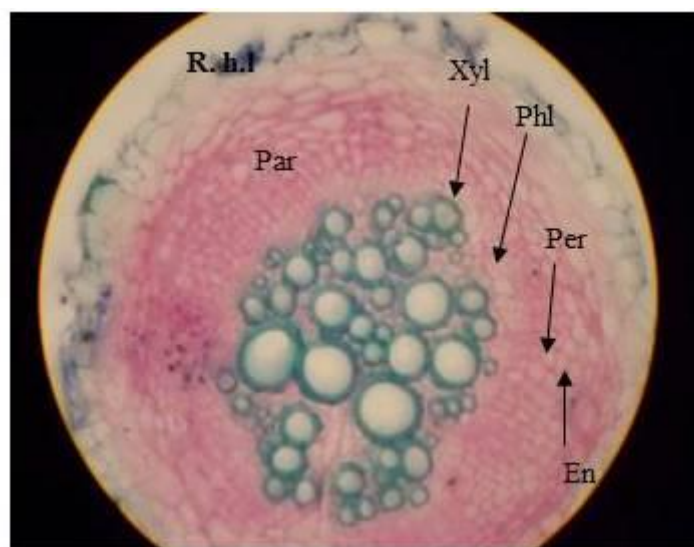
بررسی ساختار تشریحی اندام‌های رویشی

در برش عرضی ساختار نخستین ریشه (شکل ۱)، در خارجی-ترین لایه پوست، اپیدرم دیده شد که محل تشکیل تارهای کشنده در ریشه است. پس از اپیدرم پارانشیم پوست در ۷-۸ ردیف قرار گرفته است که از سلول‌های چندضلعی تشکیل شده است. درونی‌ترین لایه پوست آندودرم است و به خوبی مرز بین پوست و استوانه آوندی را مشخص می‌کند.

در استوانه آوندی خارجی‌ترین لایه، دایره محیطیه است که از یک لایه سلول پارانشیمی تخصص-نیافته با تمایز یافتگی اندک

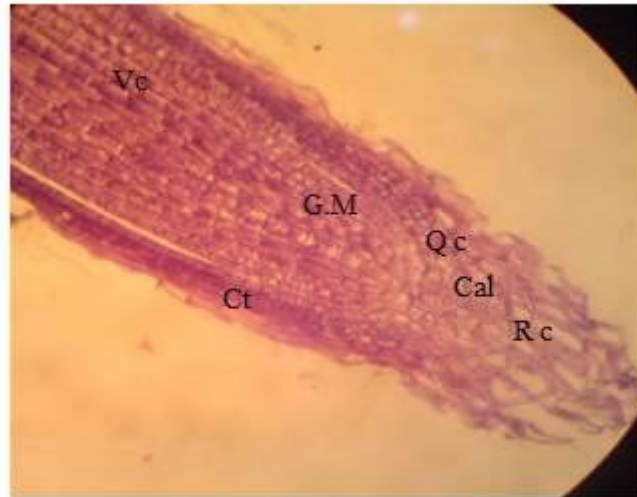
تشکیل شده است. در مرکز ریشه استوانه آوندی قرار دارد به-این صورت که بافت چوب و بافت آبکش به صورت یک درمیان قرار گرفته است.

در برش طولی ریشه (شکل ۲)، در نوک ریشه کلاهک مشاهده شد. بخش‌های دیگری که مشاهده شد مریستم ریشه بود که شامل بخش‌های زیر است: اولین منطقه کالیپتروژن یا کلاهک‌زا است که در لبه داخلی کلاهک قرار دارد. در بالای این منطقه مرکز آرام یا مریستم خفته ریشه جای گرفته است. سومین منطقه، منطقه فعال است که بالای مرکز آرام ریشه قرار دارد و آخرین منطقه استوانه آوندی است که در محور میانی ریشه قرار گرفته است و شامل بافت آبکش و بافت چوب است.



شکل ۱- برش عرضی ریشه نخستین. (R.h.l: لایه تار کشنده، Par: پارانشیم پوست، En: آندودرم، Per: دایره محیطیه، Phl: فلوئم، Xyl: زایلیم) بزرگنمایی x ۷۶۸.

Fig. 1. Transverse section of primary root (R.h.l: Root hair layer, Par: cortex Paranchyma, En: Endoderm, Per: Pericycle, Phl: Phloem, Xyl: Xylem). Magnified by 768x.

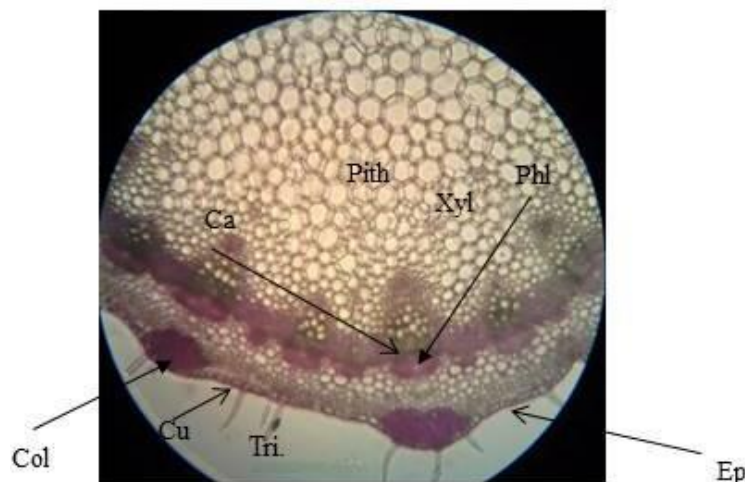


شکل ۲- برش طولی انتهای ریشه (G.M: Ground Meristem, Ct: Cortex, Qc: Quick center, Cal: Calyptragen, Rc: Root cap, Vc: vascular cylinder). بزرگنمایی x ۷۶۸.

Fig. 2. Longitudinal section of root end (G.M: Ground Meristem, Ct: Cortex, Qc: Quick center, Cal: Calyptragen, Rc: Root cap, Vc: vascular cylinder). Magnified by 768x.

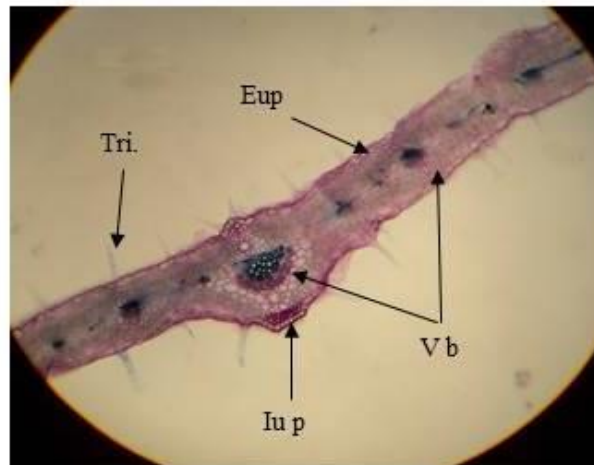
که در ۵-۶ ردیف قرار دارد. دسته‌های آوندی به تعداد متغیر بر محیط یک دایره قرار گرفته‌اند. بین چوب و آبکش بافت کامبیومی قرار دارد. در قسمت مرکزی هم بافت پارانشیمی مغز قرار دارد. اپیدرم در برش عرضی تهیه شده از قسمت میانی برگ از دو بخش اپیدرم فوقانی و تحتانی تشکیل شده است که بافت مزوفیل را در برمی گیرد (شکل ۴).

در برش عرضی ساقه در شروع ساختار پسین (شکل ۳) در خارجی‌ترین لایه سلول‌های اپیدرم حالت مکعبی دارند. سطح اپیدرم کوتینی شده و به رنگ تیره مشاهده می‌شود. در سطح ساقه کرک نیز مشاهده می‌شود. در زیر اپیدرم سلول‌های بافت کلانشیم دیده می‌شود. بافت کلانشیم در بادیان رومی از نوع کلانشیم گوشه‌دار است. لایه بعدی، سلول پارانشیم پوست است



شکل ۳- برش عرضی ساقه (Ep: اپیدرم، Cu: کوتیکول، Tri: کرک، Par.c: پارانشیم پوست، Col: کلانشیم، Xyl: زایلیم، Phl: فلوئم، Pith: مغز، Ca: کامبیوم). بزرگنمایی x ۷۶۸.

Fig. 3. Transverse section of stem (Ep: Epiderm, Cu: Cuticle, Tri: Trichome, Par: Paranchyma cortex, Col: Collenchyma, Xyl: Xylem, Phl: Phloem, Ca: Cambium). Magnified by 768x.

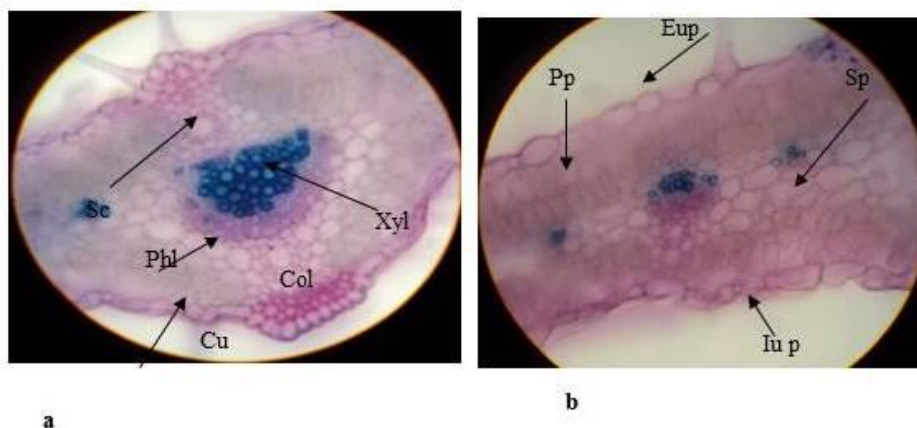


شکل ۴- برش عرضی برگ (L.E: اپیدرم تحتانی، U.E: اپیدرم فوقانی، Vb: دستجات آوندی، Tri: کرک). بزرگنمایی x ۱۹۲۰.

Fig. 4. Transverse section of leaves (L.E: Lower Epidermis, U.E: Upper Epidermis, Vb: Vascular bundle, Tri: Trichome). Magnified by 1920x.

بافت پارانشیمی مجرای ترشچی (Sc) قرار دارد (شکل ۵). برگ بالغ دارای ۹-۱۲ دسته آوندی است که یکی بزرگ‌تر و در وسط (رگبرگ اصلی، شکل ۵a) و بقیه در دو طرف آن قرار گرفته‌اند (رگبرگ فرعی، شکل ۵b). در هر دسته آوندی، دستجات آوندی از نوع کولاترال است.

سطح آن دارای کوتیکول و کرک‌های متعددی است که این کرک‌ها چندسلولی و بلند هستند. زیر اپیدرم بافت کلانشیم دیده می‌شود. مزوفیل بافت پارانشیمی از اپیدرم پویده شده است. دو نوع پارانشیم در مزوفیل مشاهده می‌شود. در زیر اپیدرم فوقانی دو لایه سلول پارانشیم نردبانی مشاهده می‌شود و در دیگر بخش‌ها پارانشیم اسفنجی پراکنده شده است. برگ تقارن پشتی-شکمی دارد. در بالا و پایین دستجات آوندی، در میان



a

b

شکل ۵- برش عرضی برگ (a: رگبرگ اصلی، b: رگبرگ فرعی). (Col: کلانشیم، Sc: مجرای ترشچی، Phl: فلوم، Xyl: زایلیم، Cu: کوتیکول، Sp: پارانشیم اسفنجی، Pp: پارانشیم نردبانی). بزرگنمایی x ۷۶۸.

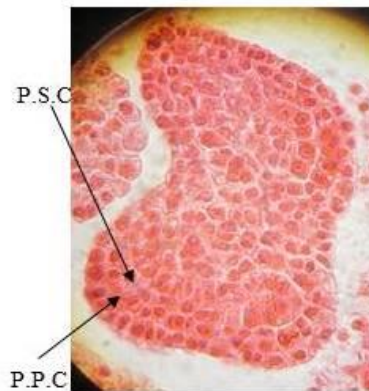
Fig. 5. Transverse section of leaves (a: Main vein, b: Secondary vein). (Col: Collenchyma, Sc: secretory conduct, Phl: Phloem, Xyl: Xylem, Cu: Cuticle, Sp: Spongy parenchyma, Pp: Palissadic parenchyma). Magnified by 768x.

تکوین دستگاه زایشی

نمو بساک و تشکیل دانه گرده

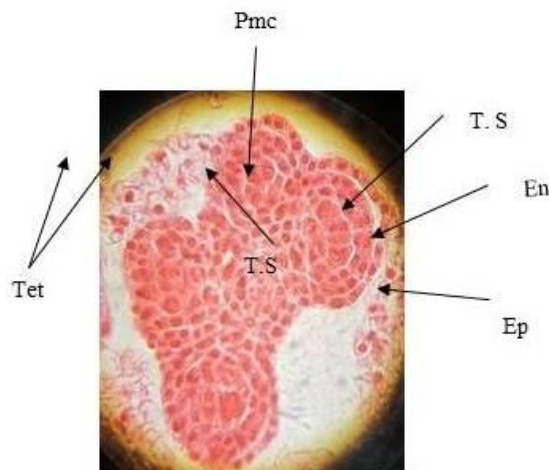
تقسیمات منظم و مماس سلول‌های کناری به تدریج لایه‌های منطبق برهم سلولی را به وجود می‌آورد که از تمایز آنها به تدریج اپیدرم، لایه مکانیکی، لایه موقت و لایه مغذی یا لایه تایی تشکیل می‌شوند. لایه گذر دیده نشد. تقسیمات بعدی سلول اسپوروژنی اولیه، سلول‌های مادر گرده را می‌سازد که سلول-هایی درشت با هسته حجیم هستند (شکل ۷).

بساک در گونه بادیان رومی از نوع چهار کیسه گرده‌ای است. در مراحل اولیه نمو بساک در هر گوشه از طرح اولیه پرچم، یک ردیف سلول بنیادی هیپودرمی است که در جهت مماسی تقسیم می‌شود و دو لایه را به وجود می‌آورد. لایه داخلی سلول بنیادی، سلول اسپوروژنی اولیه و لایه خارجی سلول بنیادی، سلول‌های کناری اولیه است (شکل ۶).



شکل ۶- برش عرضی بساک؛ P.P.C: سلول کناری اولیه، P.S.C: سلول هاگ‌زای اولیه. بزرگنمایی X ۱۹۲۰.

Fig. 6. Transverse section of anther; P.P.C: Primary Parietal Cell, P.S.C: Primary Sporogenous Cell. Magnified by 1920x.



شکل ۷- برش عرضی بساک؛ Ep: اپیدرم، En: اندوتسیوم یا لایه مکانیکی، T.S: تایی ترشچی، Pmc: سلول مادر میکروسپور. بزرگنمایی X ۱۹۲۰.

Fig. 7. Transverse section of anther; Ep: Epiderm, En: Endothecium, T.S: Tapetum Secretory, Pmc: Pollen mother Cell. Magnified by 1920x.

دیادی در یک سیتوپلاسم مشترک قرار می‌گیرند. بعد از تقسیم میوز II چهار هسته هاپلوئید به وجود می‌آید و به طور هم‌زمان

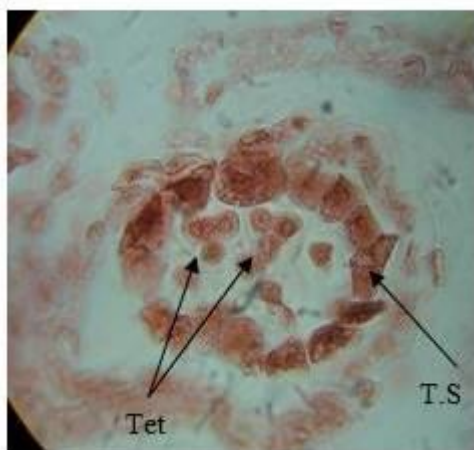
در طی فرایند میکروسپورزایی، به دنبال تقسیم میوز I در میکروسپوروسیت‌ها بدون تشکیل صفحه یاخته‌ای، دوهسته

شده و از آن تغذیه می‌کنند (شکل ۹a). شکل ۹b مرحله پیشرفته‌تر را نشان می‌دهد که میکروسپور جوان شکل کم‌ویش منظمی را دارد.

هسته میکروسپور جوان تک‌هسته‌ای به سرعت تقسیم میتوزی خود را می‌گذراند و دو هسته به وجود می‌آید (شکل ۹c)، یکی هسته زایشی که متراکم است و دیگری هسته رویشی که در- مقایسه با هسته زایشی حجیم‌تر است (در برش‌های گرفته‌شده فقط دو هسته‌ای بودن قابل تشخیص است).

بین چهار هسته حاصل سیتوکینز رخ می‌دهد. در بادیان رومی آرایش تراسپوره‌ای ایجادشده از نوع تراهدرال است (شکل ۸).

ضمن تشکیل تتراده‌ها، سلول‌های لایه مغذی واکوئل‌دار می‌شوند و افزایش ابعاد پیدا می‌کنند. در پایان میوز با ترشح آنزیم کاتالاز به وسیله تپتوم و تجزیه دیواره کالوزی در اطراف میوسپورها، تتراده‌ها تفکیک می‌شوند و میوسپور به میکروسپور جوانی تبدیل می‌شود که هسته مرکزی دارد و شکل آن کم‌و- بیش نامنظم است، میکروسپوره‌ای جوان با لایه مغذی نزدیک -



شکل ۸- برش عرضی بساک ؛ Tet: تتراد، T.S: تاپی ترشچی. بزرگنمایی x ۱۹۲۰.

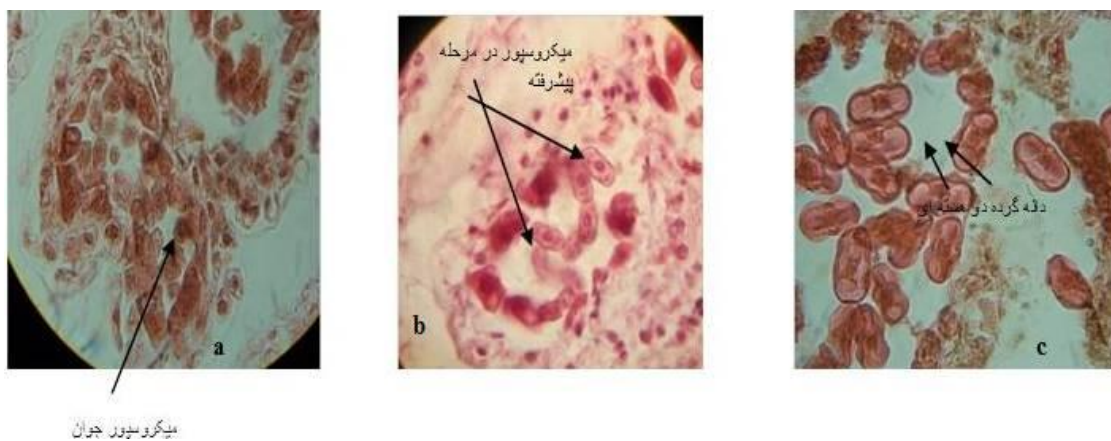
Fig. 8. Transverse section of anther; Tet: Tetrad, T.S: Tapetum Secretory. Magnified by 1920x.

ساختار و تکوین اندام زایشی ماده

در گیاه بادیان رومی خامه کوتاه و توپر است و بافت انتقال- دهنده بخش مرکزی خامه را اشغال می‌کند، خامه به سطح کلاله‌ای پهن ختم می‌شود (شکل ۱۱). در بادیان رومی مادگی از اتصال دو برچه بسته تشکیل می‌شود. تخمدان دوخانه‌ای است و در سطح هر برش در هر خانه یک تخمک دیده می‌شود که در ابتدا تخمک به صورت پریموردیوم تخمکی (یک تخمک تمایزنیافته جوان) نمایان می‌شود (شکل ۱۲a). شکل ۱۲b تخمک جوان را نشان می‌دهد و در انتها تخمک رسیده ظاهر می‌شود (شکل ۱۳).

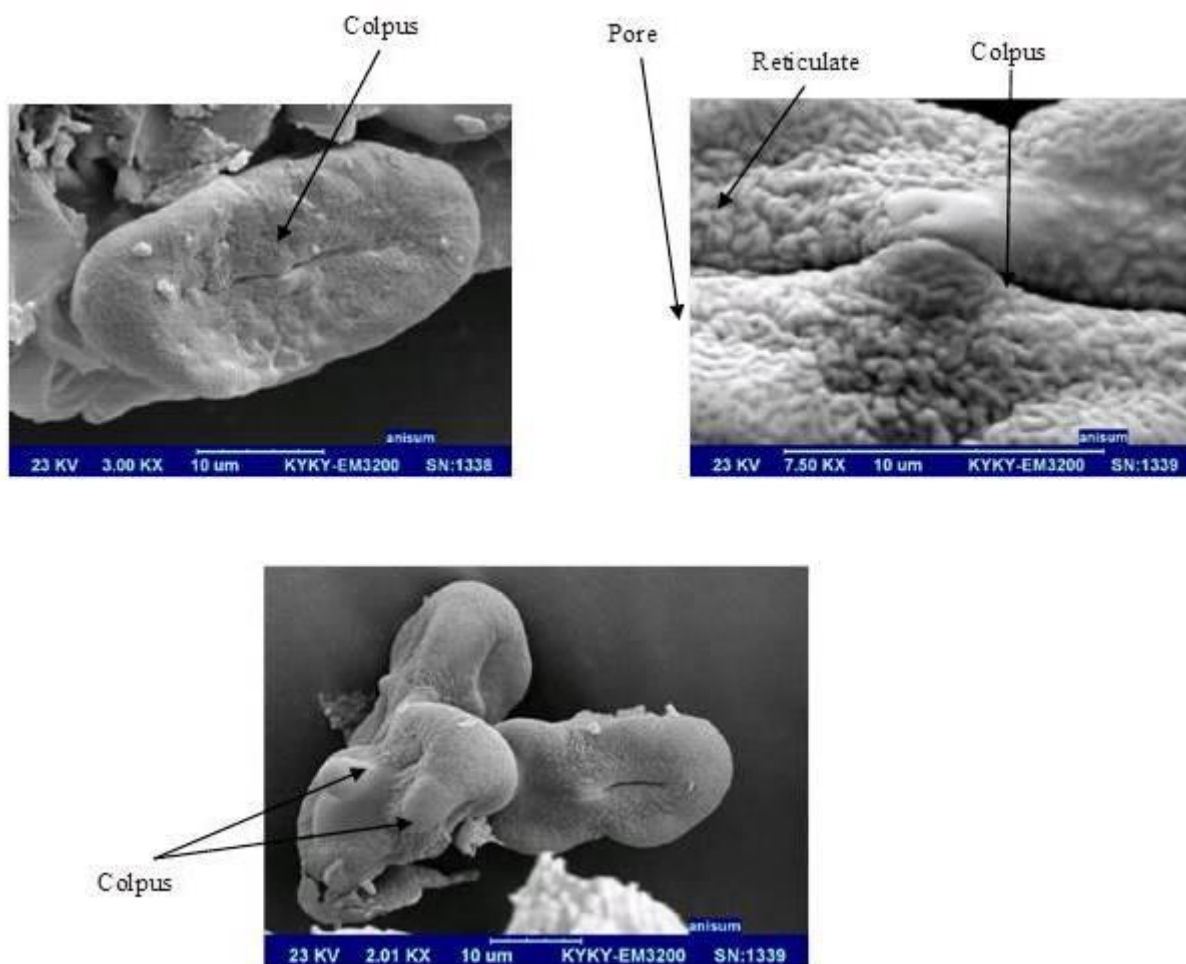
بررسی فراساختار دانه گرده به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (SEM)

طبق بررسی‌های انجام‌شده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (SEM)، دانه گرده بادیان رومی کشیده است، منظره استوایی آن بیضی شکل و به طور تقریبی ۳۵-۳۰ میکرومتر است و منظره قطبی سه‌وجهی به طور تقریبی ۲۰-۱۷ میکرومتر دارد. تزئینات سطح آگزین بادیان رومی از نوع مشبک منفذدار است. دانه گرده آن از نوع سه‌شکاف می‌باشد، اندازه شکاف به طور تقریبی ۲۵-۲۰ میکرومتر است (شکل ۱۰).



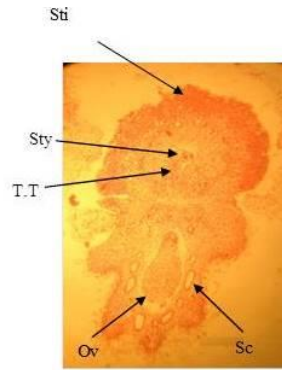
شکل ۹- برش عرضی بساک؛ بزرگنمایی $1920 \times$.

Fig. 9. Transverse section of anther (a: Immature pollen, b: Mature pollen, c: dual-core pollen grains). Magnified by 1920x.

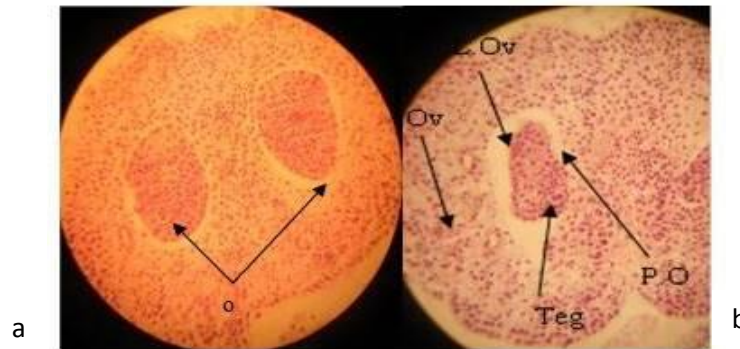


شکل ۱۰- فراساختار دانه گرده از جهت‌های متفاوت؛ Reticulate: شبکه، Pore: منفذ، Colpus: شکاف.

Fig. 10. The ultrastructure of pollen grains from different directions.

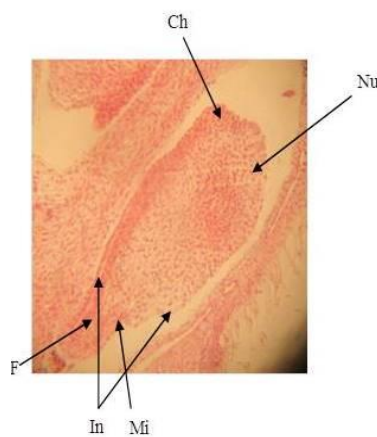


شکل ۱۱- برش طولی گل؛ Sti: کلاه، Sty: خامه، T.T: بافت انتقال دهنده، Ov: تخمدان، Sc: مجرای ترشچی. بزرگنمایی $192 \times$.
 Fig. 11. Longitudinal section of flower: Sti: Stigma, Sty: Style, T.T: Transmitting Tissue, Ov: Ovary, Sc: Secretory conduct. Magnified by 192x.



شکل ۱۲- برش عرضی تخمدان (a: تخمک تمایز نیافته، b: تخمک جوان)، (Ov: تخمدان، L.Ov: خانه‌های تخمدان، P.O: پریموردیوم تخمکی، Teg: پوسته تخمکی، O: تخمک). بزرگنمایی $768 \times$.

Fig. 12. Transverse section of ovary (a: undifferentiated ovule, b: Immature Ovule), (Ov: Ovary, L. Ov: Ovary Lodge, P.O: Ovule Primordium, Teg: Tegument, O: Ovule). Magnified by 768x.

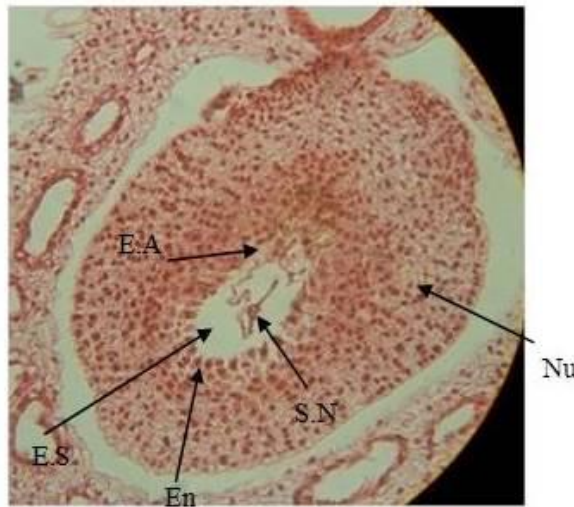


شکل ۱۳- تخمک بالغ تک پوسته‌ای به همراه اجزای تشکیل دهنده آن؛ Ch: بن یا شالاز، Nu: خورش، In: پوسته تخمک، Mi: سفت، F: سوسپانوسور یا بند. بزرگنمایی $768 \times$.

Fig. 13. Mature unitegmic ovule with its components; Ch: Chalaza, Nu: Nucellus, In: Integument, Mi: Micropyle, F: Funiculus. Magnified by 768x.

در مرحله بعد سلول مادر مگاسپور ایجاد شده از بافت خورش با تقسیم میوز کیسه رویانی را به وجود می آورد. در برش هایی که گرفته شده (شکل ۱۴)، مشاهده شد که سه هسته در مجاورت سفت دستگاه تخمزا را تشکیل می دهند. در قسمت مرکزی کیسه رویانی از ترکیب دو هسته، هسته ثانویه تشکیل می شود که در این شکل یکی از هسته ها دیده شد. کیسه رویانی با لایه ای از سلول های درشت با هسته های حجیم و به شدت رنگ پذیر اندوتلیوم احاطه می شود.

تخمک در مراحل اولیه تکوین شامل خورش است که با یک پوسته پوشیده شده و با پایه ای به نام بند به جفت چسبیده است. در انتهای آزاد تخمک، شکاف کوچکی در پوسته وجود دارد که این روزنه سفت است. ناحیه ای که پوسته با بند برخورد دارد بن یا شالاز است. به دلیل اینکه انتهای خورش به پایین خم شده و به سمت قاعده بند جهت می گیرد، بنابراین تخمک بادیان رومی از نوع واژگون است در اطراف تخمدان مجراهای ترشخی به وضوح مشخص هستند.



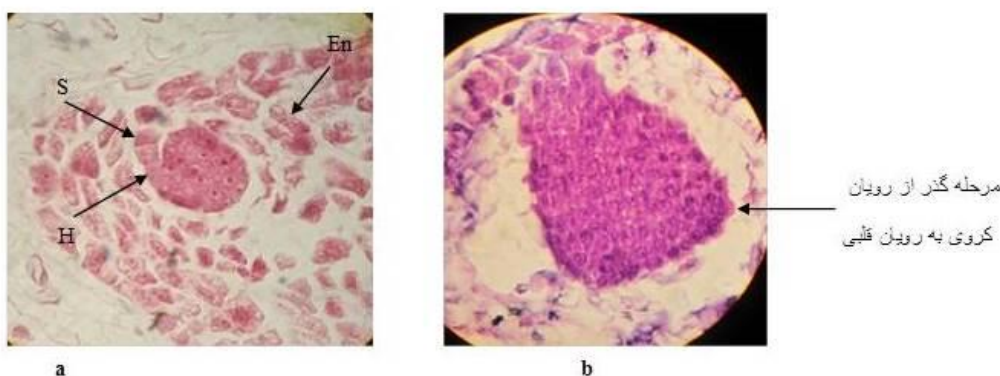
شکل ۱۴- برش عرضی تخمدان؛ Nu: خورش، E.A: دستگاه تخمزا، E.S: کیسه رویانی، En: اندوتلیوم، S.N: هسته ثانویه. بزرگنمایی $1920\times$.

Fig. 14. Transverse section of ovary; Nu: Nucellus, E.A: Egg Aparatus, E.S: Embryo Sac, En: Endothelial, S.N: Secondary Nucleus. Magnified by 768x.

لپه ها با هم برابری ندارد (شکل ۱۶a). آخرین مرحله رویان زایی، تشکیل رویان اژدری است (شکل ۱۶b). در قطب مجاور هیپوفیز و در قطب مقابل تقسیمات تعدادی از سلول ها متوقف می شود و به ترتیب پیش مرستم ریشه و پیش مرستم ساقه را تشکیل می دهند. بخش زیرین سلول های پیش مرستم ریشه تعدادی از سلول ها متمایز شده و ریشه چه را می سازند و بخش زیرین ریشه چه تعدادی از سلول ها متمایز شده و ساقه چه یا محور زیرلپه (هیپوکوتیل) را می سازند. تعدادی از سلول ها در گیاه تک لپه در یک طرف و در دولپه ها در دو طرف تقسیم می شوند و لپه ها را می سازند.

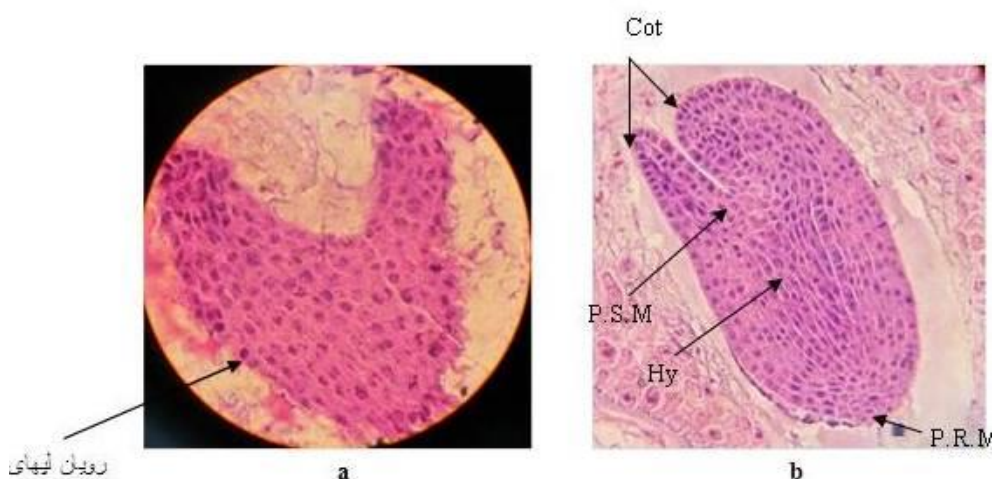
در برش طولی از بذر بادیان رومی، رویان کروی شکل به همراه آندوسپرم در پیرامون آن مشاهده می شود (شکل ۱۵a). رویان کروی توده ای است پریاخته با ساختاری به نسبت پیچیده، اما هنوز تشخیص اولیه لپه ها در آن ممکن نیست. در رویان کروی سوسپانوسور یا بند، هیپوفیز که نزدیک ترین سلول بند به رویان است و توده کوچک پریاخته ای کروی شکل را می توان تشخیص داد. رویان کروی با تقسیمات و دیواره بندی های جدید، رویان قلبی را می سازد. مرحله گذر از رویان کروی به رویان قلبی در شکل ۱۵b مشاهده می شود.

در مرحله بعد رویان قلبی با جذب مواد غذایی از آلبومن و انجام تقسیمات بیشتر، به سمت تشکیل رویان لپه ای می رود که اندازه



شکل ۱۵- برش طولی بذر (a: رویان کروی، b: گذر از رویان کروی به رویان قلبی) (S: بند، H: هیپوفیز، En: آندوسپرم) بزرگنمایی x ۱۹۲۰.

Fig. 15. Longitudinal section of seed (a: Globular embryo, b: The transition from globular embryo to cordate embryo) (S: Suspensor, H: Hypophysis, En: Endosperm). Magnified by 1920x.



شکل ۱۶- برش طولی بذر (a: رویان لپه ای، b: رویان اژدری) (Cot: لپه، P.R.M: پرومریستم ریشه، P.S.M: پرومریستم ساقه، Hy: هیپوکوتیل). بزرگنمایی x ۱۹۲۰.

Fig. 16. Longitudinal section of seed (a: Cotyledon embryo, b: Torpedo-shaped embryo) (Cot: Cotyledon, P.R.M: Root Pro-Meristem, P.S.M: Stem Pro-Meristem, Hy: Hypocotyle). Magnified by 1920x.

بحث

کنار یکدیگر است. با رشد پسین در ریشه‌های دولپه، آندودرم به همراه پوست از بین می‌رود.

استوانه مرکزی در بخش درونی ریشه واقع شده و از دایره محیطیه، دسته‌های آوندی تشکیل شده است. دایره محیطیه در سمت داخلی آندودرم است، معمولاً یک ردیفی است و اغلب ماهیت پارانشیمی دارد. همچنین دارای خاصیت مرستمی است و ریشه فرعی را می‌سازد. درباب آوندها باید یادآور شد که ابتدا

در ریشه اولیه بیرونی‌ترین بخش که تک‌لایه است و نقش محافظتی دارد اپیدرم است. بخش درونی اپیدرم معمولاً از سلول‌های پارانشیمی با دیواره نازک و چندین فضای بین‌سلولی تشکیل شده است. آندودرم به‌عنوان درونی‌ترین لایه پوست در همه ریشه‌ها وجود دارد و دارای سلول‌هایی با آرایش متراکم در

ساختار یکسانی در هر دو سطح فوقانی و تحتانی خود هستند (Ahmad et al., 2009). برگ بادبان رومی تقارن پشتی-شکمی دارد.

دو نوع پارانشیم در مزوفیل مشاهده می‌شود: بافت پارانشیم نردبانی با دو لایه سلول زیر اپیدرم بالایی وجود دارد. بافت پارانشیم حفره‌ای در زیر پارانشیم نردبانی و در طرف دیگر برگ قرار دارد. مابین سلول‌های پارانشیم حفره‌ای مفاها یا فضاهای زیادی وجود دارند و با اتصالات سست به یکدیگر متصل هستند (Ahmad et al., 2010). در دسته‌های آوندی درون برگ، آبکش خارج چوب است. بنابراین دستجات آوندی از نوع کلاترال است. بین بافت چوب و آبکش هم بافت کامبیوم قرار دارد.

در گونه تحت مطالعه نمو سه لایه‌ای دیواره بساک براساس تیپ دولپه‌ای‌ها انجام می‌گیرد (Davis, 1968). یاخته‌های آرکتوسپوری با سیتوپلاسم متراکم و هسته حجیم تشخیص پذیرند. این یاخته‌ها به صورت مماسی تقسیم شده و تشکیل یاخته جداری بیرونی و هاگ‌زای درونی را می‌دهد (Xue & Ei, 2005). اگرچه وجود لایه گذر (مداح، ۱۳۷۵) در گیاهان این تیره گزارش شده است، اما براساس نتایج حاضر، به نظر می‌رسد که در گونه مورد مطالعه لایه گذر نمو پیدا نمی‌کند. در نهان‌دانگان دو تیپ اصلی نمو لایه تاپی بساک تشخیص‌پذیر است: ترشحي (جداری) و آمیبی (Pacini et al., 1996). در بادبان رومی لایه تاپی از نوع ترشحي است که با مشاهدات محمودزاده بر روی گل جعفری هم‌سوئی دارد (محمودزاده، ۱۳۸۹). میوز در هر میکروسپوروسیت به تشکیل تتراد منجر می‌شود. سیتوکینز از نوع هم‌زمان و تترادها در بادبان رومی از نوع چهاروجهی است (چهرگانی‌راد و همکاران، ۱۳۸۹؛ آیریان و دارش، ۱۳۹۲). هسته‌ها به روش میتوز تقسیم می‌شوند و دو هسته نابرابر را به وجود می‌آورند که هسته بزرگ‌تر رویشی و هسته کوچک‌تر زايشی است. بنابراین دانه گرده دوهسته‌ای تشکیل می‌شود (چهرگانی‌راد و همکاران، ۱۳۸۸). در رابطه با ساختار دانه گرده بادبان رومی، مطالعه جامعی یافت نشد. Mungan و همکاران (2011) منظره استوایی دانه گرده جنس *Smyrnum* از تیره چتریان را ۲۶-۲۱ میکرومتر، منظره قطبی را

بافت فلوئم و پس از آن زایلیم ایجاد می‌شود. مداح و همکاران (۱۳۷۵) نیز در مورد گونه دیگری از تیره چتریان به نتایج مشابهی رسیدند.

در انتهای ریشه اولین منطقه کلاهک است که پیوسته تشکیل می‌شود. سلول‌های خارجی می‌میرند، از هم جدا می‌شوند و می‌ریزند و جای آنها را سلول‌های جدیدی می‌گیرند. منطقه بعدی کالیپتروژن است. کالیپتروژن سلول بنیادی مخصوص کلاهک است. سلول‌های قطب استوانه و پوست انتهای ریشه، فعالیت میتوزی بسیار کمی دارند. این گروه سلولی ظاهر بشقابی و نیمکره ایجاد می‌کنند و مرکز آرام خوانده می‌شوند که بالاتر از کالیپتروژن قرار گرفته است. منطقه بعدی منطقه فعال است. ساختار انتهای ریشه بادبان رومی مشابه ساختار انتهای ریشه در دولپه‌ای‌ها است (فان، ۱۳۸۳). در ساقه خارجی‌ترین لایه، اپیدرم است که با ماده مقاوم با ماهیت چربی به نام کوتین پوشیده شده است. اغلب زوائدی به نام کرک روی اپیدرم وجود دارد. بین اپیدرم و بافت‌های آوندی، پوست قرار می‌گیرد که سه نوع بافت پارانشیم، کلانشیم و اسکلرانشیم ممکن است وجود داشته باشد (Pandey & Chadha, 1996). در ساقه بادبان رومی کلانشیم از نوع گوشه‌دار قرار دارد. سیستم آوندی شامل دسته های آوندی و مغز است. دسته‌های آوندی شامل عناصر چوب و آبکش است. در ساقه، پروتوگزیم به سوی مرکز و متاگزیم به سمت پیرامون است بنابراین چوب از نوع اندارش بوده و جهت نمو و تمایز آن به صورت گریز از مرکز است. بخش مرکزی شامل مغز است که سلول پارانشیمی با فضای بین‌سلولی زیاد است. در ساقه، تشخیص دایره محیطیه نیز مانند آندودرم به سادگی امکان‌پذیر نیست. زیرا هم لایه ریشه‌زا (دایره محیطیه) و هم آندودرم در ساقه مسئولیت کمتری دارند و در نتیجه ناپایدارتر هستند (مجد و همکاران، ۱۳۹۰).

در ساقه بادبان رومی به دلیل اینکه آبکش در خارج چوب قرار دارد بنابراین دستجات آوندی از نوع کلاترال هستند. به طور متداول برگ‌ها بر دو نوع هستند: برگ‌های پشتی-شکمی که معمولاً به صورت افقی رشد می‌کنند و دارای سطوح مشخص فوقانی و تحتانی هستند و نوع دوم برگ‌های دوسطح همسان یا جورسطحی که به طور عمودی قرار می‌گیرند این برگ‌ها دارای

رویانی به لایه درونی پوسته تخمک متصل است. در چنین وضعیتی درونی‌ترین لایه سلولی پوسته تخمک به لایه سلولی اندوتلیوم متمایز می‌شود. گسترش شعاعی و هسته بزرگ از مشخصات سلول‌های اندوتلیومی است که با لایه تپتوم در بساک مطابقت دارد و نشان‌دهنده نقش تغذیه‌ای این دو لایه است (Schneitz *et al.*, 1998).

سلول تخم در امتداد محور رأسی پایه‌ای طویل شده و به دنبال آن تقسیم نامتقارن انجام شده و یک سلول کوچک در رأس محور و یک سلول بزرگ در پایه محور تشکیل می‌شود. سلول پایه‌ای و اشتقاق‌های آن با تقسیمات متعدد، بند یا سوسپانسور ۹-۶ سلولی را ایجاد می‌کنند، درحالی‌که تقسیمات متعدد سلول رأسی و اشتقاق‌های آن جنین کروی را به وجود می‌آورند (Chaudhury *et al.*, 1998). در رویان کروی حدوداً ۱۰۰-۹۰ سلول وجود دارد. مجموعه این سلول‌ها حجمی به اندازه سلول تخم اولیه دارد. تقسیمات بیشتر در رویان کروی، به ویژه در ناحیه‌ای که لپه‌ها توسعه می‌یابند، رویان قلبی شکل را به وجود می‌آورد (Cisneros *et al.*, 2011). در بادیان رومی جنین قلبی مشاهده نشد، اما مرحله گذر از رویان کروی به رویان قلبی مشاهده شد. سپس در دو قطب مقابل به هم رویان در تعدادی از سلول‌ها که تقسیماتی داشتند، این تقسیمات متوقف می‌شود. حدود ۱۵-۱۲ سلول در قطب مجاور هیپوفیز و در قطب مقابل حدود ۱۲-۱۰ سلول تقسیماتشان متوقف می‌شود و به ترتیب پیش‌مریستم ریشه و پیش‌مریستم ساقه را تشکیل می‌دهد. این مرحله، مرحله بنیان‌گذاری پرومریستم‌ها است. زیر سلول‌های پیش‌مریستم ریشه تعدادی از سلول‌ها متمایز می‌شوند و ریشه‌چه را می‌سازند و زیر ریشه‌چه تعدادی از سلول‌ها متمایز می‌شوند و ساقه‌چه یا محور زیر لپه (هیپوکوتیل) را می‌سازند. تعدادی از سلول‌ها در گیاه تک لپه در یک طرف و در دو لپه‌ها در دو طرف تقسیم می‌شوند و لپه‌ها را می‌سازند. و در مرحله آخر لپه‌ها به هم فشرده می‌شوند و رویان اژدری را به وجود می‌آورند (Kapil & Bhatnagar, 1981).

۱۷/۵-۱۴ میکرومتر و اندازه شکاف را ۲۲-۱۷/۵ میکرومتر ذکر کردند که در مقایسه با دانه گرده بادیان رومی مشابه اما کوچک‌تر است. مشاهدات نشان داد که دانه گرده بادیان رومی سه شکاف می‌باشد و تزئینات آگزین از نوع Reticuloporate است که با مطالعات Leonardis و همکاران (2009) هم‌سویی دارد.

مادگی در بادیان رومی از دو برچه پیوسته تشکیل شده است، بنابراین از نوع مادگی پیوسته برچه است و شامل کلالة، خامه و تخمدان است. خامه در اکثر نهان‌دانگان توپر است. در مادگی پیوسته برچه با خامه توپر چندین نوار بافت بینابینی ایجاد می‌شود (Reiser & Fischer, 1993). تخمک‌های نارس دارای ۳ ساختار اصلی شامل یک بافت خورش، یک یا دو پوسته و یک بند است. بافت خورش از بخش رأسی پریموردیوم تخمک منشأ می‌گیرد. پوسته در پایه بافت خورش طی مگاسپوروژنز تشکیل می‌شوند. تقسیم آنتی‌کلینال و طویل‌شدن سلول‌ها، مسئول رشد پوسته‌ها به موازات بافت خورش می‌باشند. میزان خمیدگی تخمک بسته به میزان رشد پوسته‌ها و سوسپانسور (بند)، متفاوت است. بنابراین تخمک واژگون خمیدگی زیادی را نشان می‌دهد. تا آنجا که محور طولی بافت خورش به موازات محور بند قرار گرفته است (Ekici & Dance, 2004). تخمک در گیاه بادیان رومی واجد یک پوسته می‌باشد و این پوسته کاملاً رشدیافته است که این نتیجه با گزارش‌های Randhawa و همکاران (1992) مطابقت دارد.

سلول مادر مگاسپور که از سلول‌های بافت خورش ایجاد می‌شود، تقسیم میوز را می‌گذراند. این تقسیم در اکثر گیاهان با تشکیل دیواره مجزا در هر چهار مگاسپور همراه است. مگاسپورها در یک ردیف قرار می‌گیرند و عموماً سه سلول نزدیک سفت تجزیه می‌شود و یکی باقی می‌ماند که با تقسیمات میتوز متعدد کیسه رویانی را به وجود می‌آورد (Shi & Yang, 2011). کیسه رویانی در بادیان رومی از نوع پلی‌گونیوم است، الگوی تیپ علف هفت‌بند یا پلی‌گونیوم متداول‌ترین الگوی نمو کیسه رویانی است که در ۷۰ درصد از گیاهان گل‌دار وجود دارد و با مشاهدات چهرگانی‌راد و همکاران مطابقت دارد. کیسه

نتیجه گیری

و کیسه رویانی از نهان دانگان و تیپ پلی گونوم تبعیت می کنند. لایه اندوتلیوم در مادگی مشاهده شد که با تپتوم در بساک مطابقت می کند که نشان دهنده نقش تغذیه ای این دو لایه است. در مبحث رویان زایی نیز رویان کروی در رأس یک سوسپانسور بلند و همچنین گذر از رویان کروی به رویان قلبی، رویان لپه ای و در انتها رویان اژدری مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

از خانم ها طرلان آیت و فریده عسگری به دلیل همکاری در انجام آزمایش ها تشکر و قدردانی می شود.

تترادهای میکروسپور فقط از نوع تتراهدرا (چهاروجهی) بوده و از نوع خطی و تتراکونال نتیجه ای یافت نشد. از آنجایی که یاخته های لایه تاپی در مراحل ابتدایی نمو بساک و دانه های گرده در جای خود ثابت باقی می ماند و تحلیل نمی روند و وقتی میکروسپورها در حال نمو به دانه گرده بالغ هستند، ضمایمی از یاخته های تاپی به سمت حفره بساک تشکیل می شود. بنابراین می توان گفت لایه تاپی از نوع ترشچی است. همچنین بعد از بررسی کلیه برش های گرفته شده از بین لایه های دیواره بساک، لایه گذر مشاهده نشد. فراساختار دانه گرده بادیان رومی شبیه به جنس *Smyrniium* تیره چتریان سه شکافه است با این تفاوت که دانه گرده بادیان رومی بزرگ تر است. الگوهای تکوین تخمک

منابع / References

فان، ا. ۱۳۸۳. آناتومی گیاهی. مترجم: آذرنوش جعفری. چاپ اول. - انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. صفحه ۶۳۹.

مجد، ا.، صفاری، پ.، جنوبی، پ. و مهراییان، ص. ۱۳۹۰. بررسی مراحل تکوینی بخش های زایشی و رویشی انگور شاهانی. - فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی تکوینی ۳: ۶۱-۵۱.

محمودزاده، ه. ۱۳۸۹. بررسی مراحل تکوین و فراساختار میکروگامتوفیت در گونه گل جعفری (*Tagetes erecta* L.). - فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی تکوینی ۲: ۱۲-۲.

مداح، م.، مجد، ا.، رضایی، م.ب. و جابمندی، ک. ۱۳۷۵. بررسی تأثیر پرتوهای فرابنفش بر روی ویژگی های تشریحی - تکوینی اندام های رویشی و زایشی و مقدار و نوع اسانس گیاه رازیانه *Foeniculum vulgare* Mill. تیره چتریان. - پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد تهران و علوم تحقیقات.

Ahmad, K., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Arshad, M. and Ahmad, F. 2009. Taxonomic diversity of stomata in dicot flora of a district tank (N.W.F.P.) in Pakistan. - The Journal of Biotechnology 8: 1052 - 1055.

Ahmad, K., Khan, M.A., Ahmad, M., Shaheen, N.A. and Nazir A. 2010. Taxonomic diversity in epidermal cells of some sub-tropical plant species. - International Journal of Agriculture and Biology 12: 115-118.

Chaudhury, A.M., Craig, S., Dennis, E. and Peacock, W. 1998. Ovule and embryo development, apomixes

آیویان، س. و دارش، ع. ۱۳۹۲. مطالعه مراحل تکوین دانه گرده و کیسه های ترشچی گلبرگ در دارایی از تیره مرکبات. - نشریه علوم دانشگاه خوارزمی ۱۳: ۷۰۰-۶۹۱.

امیدییگی، ر. ۱۳۷۹. رهیافت های تولید و فرآورده های گیاهان دارویی. - انتشارات آستان قدس مشهد، صفحه ۲۶۰.

چهرگانی راد، ع.، زارع، ش. و حاجی صادقیان، س. ۱۳۸۸. رویان زایی در *Tripleurospermum disciforme* (C.A.Mey.) در Sch.Bip. تیپ جدید و نادر از رویان زایی. - مجله زیست شناسی ایران ۲۶-۳۴: ۲۲.

چهرگانی راد، ع.، حاجی صادقیان، س. و محسن زاده، ف. ۱۳۸۹. مطالعه مراحل تکوین دانه گرده و تخمک در *Inula aucheriana* DC. - مجله زیست شناسی گیاهی ۲: ۲۸-۱۵.

زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. - موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران ۲: ۵۰۷-۵۰۲.

and fertilization. - The Journal of Current Opinion in Plant Biology 1: 26-31.

Cisneros, A., Garcia, R.B. and Tel-Zur, N. 2011. Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae). - Flora 206: 1076-1084.

Dadpour, M.R., Grigorian, W., Nazemieh, A. and Valizadeh, M. 2008. Application of epiillumination light microscopy for study of floral ontogeny in fruit trees. - International Journal of Botany 4: 49-55.

- Davis, G.L.** 1968. Apomixis and abnormal anther development in *Calotis lappulacea* Benth. (Compositae). – Australia Journal of Botany 16: 1-17.
- Ekici, N. and Dance, F.** 2004. Polarity during sporogenesis and gametogenesis in plants. – Biologia Bratislava 59: 687- 696.
- Kapil, R.N. and Bhatnagar, A.K.** Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. – Cytology 70: 291-337
- Khajepiri, M., Ghahremaninejad, F. and Mozaffarian, V.** 2010. Fruit anatomy of the genus *Pimpinella* L. (*Apiaceae*) in Iran. – Flora 205: 344-356.
- Leonardis, W., Santis, C. and Fichera, G.** 2009. Pollen morphology of six species of *Bubleurum* L. (*Apiaceae*) present in Sicily and taxonomic implications. – The Journal of Plant Biology 143: 293-300.
- Maheshwari, P.** 1950. An Introduction to the Embryology of Angiosperms. – New York: Mc Grow Hill, United States, 62 pp.
- Mungan, F., Yildiz, K., Minareci, E. and Kilic, M. A.** 2011. Palynological study of the genus *Smiranium* L. (*Umbeliferae*) from Turkey. – The Journal of Medicine Plants Research 5: 997-1003.
- Pacini, E., Franchi, G.G. and Hesse, M.** 1985. The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryo-phyta. – The Journal of Plant Systematic and Evolution 149: 155-185.
- Pandey, S.N. and Chadha, A.** 1996. Plant anatomy and embryology. – Vikas Publishing House, New Delhi, India, 474 pp.
- Randhawa, G.S., Gill, B.S. and Rachaudhuri, S.P.** 1992. Optimising agronomic requirements of *Anise* in the Punjab. – Recent Advances in Medicinal, Aromatic Species Crops 2: 413-416.
- Reiser, L. and Fischer, R.** 1993. The ovule and the embryo sac. – The Journal of Plant Cell 5: 1291-1301.
- Schneitz, K., Balasubramanian, S. and Schiefthaler, U.** 1992. Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. – The Journal of Current Opinion in Plant Biology 3: 1360- 1385.
- Shi, D.Q. and Yang, W.C.** 2011. Ovule development in *Arabidopsis*: progress and challenge. – The Journal of Current Opinion in Plant Biology 14: 74-80.
- Vasyata, G.G., Ilinskaya, L.R., Timasheva, L.A. and Kivyushko, O.N.** 1984. Sowing qualities of *Anise* seed in relation their position on the plant. – Trudy Use Soyuznogo Nauchno Issledovatel Skoyo Institiuta Efiromaslichnykn Culture 16: 19-96.
- Xue, C.Y. and Li, D.Z.** 2005. Embryology of *Megacodon stilophorus* (C.B.Clarke) Harry Sm. and *veratrilla baillonii* Franch. – Botanical Journal of the Linnean Society 147: 317-331.

Jonoubi, P., Majd, A., Marouf, A. and Amini, S. 2015. Investigation the structure of vegetative organs and development of reproductive organs of *Pimpinella anisum* L. – Nova Biologica Reperta 2: 151-165.

جنوبی، پ.، مجد، ا.، معروف، ع. و امینی، ش. ۱۳۹۴. بررسی ساختار اندام‌های رویشی و تکوین اندام‌های زایشی بادیان رومی (*Pimpinella anisum* L.). – یافته های نوین در علوم زیستی ۲: ۱۶۵-۱۵۱.