کاربرد ترشحات دستگاه گوارش حلزون در مطالعات سیتوژنتیک

اکبر عبدی قاضی جهانی[1]، حسین میرزائی ندوشن[2]، احمد رزبان حقیقی[1]،
یوسف ایمانی[1] و حمیده جوادی ممقانی[1]

چکیده

در مطالعات سیتوژنتیک، تهیه نمونه میکروسکوپی با پراکنش مناسب کروموزومها در سطح سلول و با وضوح کافی، از معضلاتی است که همیشه دامنگیر سیتولوژیستها بوده و می‌باشد. از این رو در این تحقیق از ترشحات دستگاه گوارش حلزون به جای آنزیم سیتاز که در هضم اجزای سلول و تهیه نمونه‌های شفاف میکروسکوپی به کار می‌رود استفاده گردید تا امکان فراهم کردن یک ابزار بومی و سهل‌الوصول را بررسی نماید. به این منظور پس از جمع‌آوری تعداد زیادی حلزون از جنگلهای ارسباران ترشحات سیستم گوارشی آنها استخراج و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و در دمای صفر درجه نگهداری گردید. به منظور آزمون فرآورده حاصل در مطالعات میکروسکوپی سلولهای مریستمی در گونه‌ای از آگروپیرون، پس از انجام مراحل پیش تیمار، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی از این فرآورده جهت هضم سایر اجزاء سلولی استفاده شده و موجب شد که کروموزومها به صورت یکنواخت در صفحه متافازی سلول پخش شوند.

واژه‌های کلیدی: ترشحات آنزیمی، حلزون باغی، هضم بیولوژیکی، سیتوژنتیک، آگروپیرون.

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، صندوق پستی ۵۱۸۷۹/۳۳۱۵۱

۲- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

مقدمه

در مطالعات سیتوژنتیک فراهم کردن نمونه‌های شفاف میکروسکوپی از سلولهای در حال تقسیم اغلب با مشکلاتی مواجه می‌شود. از جمله وجود ارگانلها و اجزاء مختلف درون سلولی نظیر واکوئل مانع از پراکنش و توزیع مناسب کروموزومها در سطح سلول شده و با همپوشانی کروموزومها در مرحله متافاز تقسیم سلولی ضمن ممانعت از مطالعه کاریوتیپی گونه‌های مورد نظر گاهی موجب بروز خطاهای زیادی در شمارش کروموزومها می‌گردد. محققان در طی سالهای اخیر در این گونه مطالعات از جمله مطالعات کاریولوژیکی و سیتوژنتیکی مراحل مختلف تقسیم سلولی (میتوز و میوز)، مورفولوژی کروموزومها، تهیه کاریوتیپ و ایدیوگرام از سلولهای گیاهی و جانوری به پیشرفتهای چشمگیری نائل شده‌اند. در این میان روشهای مختلف اسکواش از جمله اسکواش پیشرفته که توسط آقایف (۱۳۷۷) ارائه شد از اهمیت خاصی در مطالعات سیتوژنتیکی گیاهان زراعی مرتعی و جنگلی برخوردار است. با این حال، همیشه اسکواش مشکل‌گشای کار نبوده و در مواردی تراکم اجزاء درون سلولی مانع از پراکنش مناسب کروموزومها گشته و عرصه را بر محققان تنگ می‌نماید. از این رو کاربرد آنزیمهایی نظیر سیتاز جهت حذف اندامهای درون سلولی موجب رفع این مشکل می‌گردد. استفاده از آنزیمهای سیتاز تجاری نیز از طرفی دارای محدودیتهایی از حیث تهیه و نگهداری و نیز هزینه‌های مترتب می‌باشد که کاربرد فراگیر آن را با مشکل مواجه می‌نماید. مدتها جایگزین نمودن یک ماده مناسب به جای سیتاز دغدغه محققان داخلی بوده است. استفاده از ترشحات سیستم گوارشی حلزون که دارای آنزیمهای متعددی است که می‌تواند مواد سلولزی را در خود حل کند یکی از گزینه‌هایی است که می‌تواند به نحو مطلوبی بر این مشکل فائق آید.

حلزون باغی از سلسله بی‌مهرگان، شاخه نرم‌تنان *Teomophidea*، رده شکم پایان *Gastropoda*، نرم‌تنان یک کفه‌ای *Mollusks anivalve* و جنس حلزون *Helix* می‌باشد (وحدتی و فتح پور، ١٣٦٤). این جنس که در جنگلها و مناطق مرطوب زندگی می‌کند و از برگ، چوب و گیاه سبز که حاوی مواد سلولزی زیاد باشد، تغذیه می‌کند (شیبانی، ١٣٤٤). دستگاه گوارش این جنس حاوی ترکیبهای آنزیمی است که قابلیت تجزیه مواد سلولزی پکتین و فیبر را دارد. سلولز پلیمر گلوگز است که غیر محلول بوده و از اثرات شیمیایی مصون می‌ماند و توسط آنزیم سلولاز که در لوله گوارش بی‌مهرگان وجود دارد هضم شده و وارد چرخه متابولیسم می‌شود. در بسیاری از موارد گوارش سلولزی مدیون همزیستی میکروارگانیسمهایی است که در داخل لوله گوارش زندگی می‌کنند و با ترشح آنزیم سلولاز، سلولز را هضم می‌نماید. از روده کرم کشتی[1] نیز سلولاز حقیقی استخراج نموده‌اند. این جانور از چوب بدنه کشتی تغذیه می‌نماید و آنرا سوراخ می‌کند. در واقع عصاره روده آن سلولز را به قند تبدیل می‌کند.

هدف از این تحقیق بررسی اثر کاربرد ترشحات آنزیمی دستگاه گوارش حلزون *(Helix sp.)* در حذف سلولز، مواد زائد و سایر اندامکها در سلولهای گیاهی و بهبود کیفیت مطالعات کروموزومی در تقسیم میتوز است.

مواد و روشها

تعداد زیادی حلزون باغی *(Helix sp.)* در اردیبهشت ماه سال ١٣٨٠ از دامنه‌های شمال و شمال غربی جنگلهای ارسباران از ارتفاع ١٢٥٠ الی ١٦٠٠ متر جمع‌آوری گردید

1- Ship worms or Teredo

(شکل شماره ۱) و به آزمایشگاه فیزیولوژی و ژنتیک مرکز تحقیقات تبریز انتقال یافت. پس از خارج کردن ترشحات سیستم گوارشی حلزون، جهت استخراج ترشحات آنزیمی، این ترشحات به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) گردید. پس از حذف زوائد موجود، فرآورده حاصل که حاوی ترکیبهای آنزیمی است در لوله اپندورف جمع‌آوری گردید. جهت جلوگیری از فساد و تخریب ترکیبهای آنزیمی، عصاره حاصل بلافاصله در دمای صفر درجه سانتیگراد قرار داده شد. این عصاره در دمای صفر درجه یخ می‌بندد و قابلیت نگهداری برای مدت زمان طولانی را دارا می‌باشد.

در تهیه نمونه‌های میکروسکوپی در گونه‌ای از آگروپیرون، جهت بررسی مراحل مختلف تقسیم سلولی از جمله بررسی تقسیم میتوز در سلولهای رویشی و شمارش کروموزومی به منظور تهیه کاریوتیپ، ایدیوگرام و تعیین سطح پلوئیدی می‌توان از این فرآورده استفاده نمود. روش کاربرد این فراورده به این صورت بود که پس از جوانه زدن بذر و قطع ریشه‌ها در زمان مناسب با استفاده از روشهای معمول جهت پیش تیمار و تثبیت نمونه‌ها اقدام گردید. جهت مطالعات میکروسکوپی کروموزومها نیز با یکی از روشهای رایج، اقدام به هیدرولیز نمونه‌ها گردیده و پس از رنگ‌آمیزی، دو قطره از فراورده مذکور با همان غلظت اولیه، در یک شیشه ساعت بر روی نمونه‌ها اضافه شد و به مدت سه ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد. البته می‌توان نمونه‌ها را در دمای معمولی نیز مورد تاثیر این فراورده قرار داد که دوره آن کاهش می‌یابد و بسته به دمای محیط باید با آزمون و خطا تعیین گردد. پس از این مدت نمونه‌ها با روشهای رایج اسکواش شده و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

وجود مواد زائد در سلولهای در حال تقسیم امکان مطالعه بهتر و با کیفیت بالاتر کروموزومها را با مشکل مواجه می‌سازد و هیچ‌یک از مراحل آماده کردن ریشه برای مطالعات میکروسکوپی (پیش تیمار، فیکساتور، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی) در حذف مواد زائد سلولی، اندامکهای سلولی و دیواره سلولزی نقشی ایفا نمی‌کند. علاوه بر این، مواد زائد سلولی سبب عدم پراکنش یکنواخت کروموزومها می‌گردد، که معمولا به صورت مجتمع و یک توده به هم چسبیده رویت شده و کدر ظاهر می‌شود و نمی‌توان مورفولوژی حقیقی کروموزومها را رویت کرد و آنها را مطالعه نمود. بررسیها نشان داد که استفاده از عصاره حاصل از ترشحات آنزیمی دستگاه گوارش حلزون بر روی ریشه‌ها بعد از رنگ‌آمیزی سبب می شود که مواد زائد سلولی اندامکـها و دیواره سلولی در سلولهای در حال تقسیم، هضم شده و از بین برود به علاوه کروموزومها به صورت یکنواخت درصفحه متافازی پخش گردند به طوری که کروموزومها با وضوح کامل، روشن، صاف و با توزیع یکنواخت پخش و رویت گردند. بدین طریق کیفیت نمونه‌های مورد مطالعه میکروسکوپی افزایش می‌یابد و عکس و اسلاید بهتری را می‌توان تهیه کرد. ظریفی و همکاران، (۱۳۷۹) و Agayev، (۱۹۹٦) نیز به نوعی از این ویژگی یاد کرده‌اند. حذف مواد زائد سلولی ناشی از وجود ترکیبهای مختلف آنزیمی به‌خصوص سلولاز است که قابلیت تجزیه مواد سلولزی فیبر و پکتین را دارد. به طور کلی استفاده از فراورده مورد نظر در این تحقیق ضمن ایجاد سهولت در انجام مراحل لازم در تهیه نمونه میکرسکوپی، کروموزومها را به نحو بسیار مطلوبی در سطح سلول پراکنده نمود به گونه‌ای که شمارش و اندازه‌گیری آنها به راحتی و با کمترین خطایی میسر گردید (شکل شماره ۲).

شکل شماره ۱- بالا، حلزون بر روی تنه درخت. پائین، حلزون در برکه آب

شکل شماره ۲- کروموزومهای میتوزی گونه *Agropyron sp.* پس از کاربرد ترشحات سیستم گوارشی حلزون باغی در تهیه نمونه میکروسکوپی.

منابع

۱- آقایف، ی.، ۱۳۷۷. روش ساده برای جلوگیری از نفوذ هوا به زیر لامل در مطالعات کروموزومی به روش اسکواش. چکیده مقالات پنجمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج، مؤسسه تحقیقات نهال و بذر. صفحه ۵۷٤.

۲- شیبانی، ع.، ۱۳٤٤. اصول فیزیولوژی عمومی. چاپ دوم، انتشارات بخش فرهنگی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی، تهران.

۳- ظریفی، ع.، آقایف، ی.، امینی زاده، ز. و عبدی قاضی جهانی، ا.، ۱۳۷۹. مطالعه کاریوتیپ گونهٔ ترخون *Artemisia dracunculns* چکیده مقالات ششمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه مازندران. صفحه ۵۱۷.

٤- وحدتی، ا. و فتح پور، ح.، ۱۳٦٤. فیزیولوژی جانوری و سازش محیط. انتشارات بخش فرهنگی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی. تهران.

5- Agayev, Y. M., 1996. Advancd squash methods for investigation of plant choromosomes. Presented papers in the 4th Iranian Congress on Crop Production and Breeding Sciences. Isfahan, IRAN, 1-20.