University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان
جداسازی و اندازه گیری قدرت حیاتی پروتوپلاست

مقدمه

سلول های گیاهی علاوه بر غشاء سیتوپلاسمی دارای یک دیواره سلولی از جنس سلولز هستند که باعث استحکام آن ها شده و مانع از خرد و متلاشی شدن آن ها می گردد و همچنین تا حدودی از ورود عوامل بیماری زا به درون سلول جلوگیری می کند.

اگر دیواره سلولی گیاه برداشته شود غشاء سیتوپلاسمی و محتویات درون آن که شامل شیره سلولی، اندامک ها و هسته می باشد باقی می ماند که به آن پروتوپلاست (Protoplast) می گویند این یاخته بدون پوشش پتانسیل ایجاد دیواره سلولی ،تقسیم سلولی ،رشد و تولید یک گیاه کامل را دارد.

از پروتوپلاست سلول گیاهی استفاده های زیادی صورت می گیرد. پس از جداسازی و خالص سازی پروتوپلاست با ترکیب آن ها می توان هیبرید های غیر معمول را که با تلاقی جنسی بدست نمی آیند به وجود آورد.

همچنین به دلیل عدم وجود دیواره سلولی در پروتوپلاست مطالعات فیزیولوژیک و بررسی اثرات خارجی مواد بر روی فعالیت سلول ها راحت تر انجام می شود.

جداسازی پروتوپلاست

جهت جداسازی پروتوپلاست می توان از ساقه،پهنک برگ،نو ساقه،ریشه و یا سوسپانسیون سلولی استفاده کرد. با استفاده از یک گرم برگ سیب زمینی میتوان^{۱۰۸} پروتوپلاست جدا کرد که حدود ۸۰ درصد آن ها زنده و فعال می باشند. نو ساقه و برگ جوان به دلیل داشتن قدرت تقسیم سلولی زیاد و باز زایی(Regeneration) و رشد بهتر در محیط های مصنوعی نمونه خوبی برای این آزمایشات می باشد.

در صورت استفاده از برگ های جوان از آنزیم های هضم کننده دیواره مثل سلولاز(Cellulase) و همی سلولاز(Hemicellulase) و جهت ایجاد سلول های مجزا از آنزیم پکتیناز(Pectinase) استفاده می شود تا پروتوپلاست بدست آید.در صورت انجام هضم آنزیمی برای حفظ پتانسیل اسمزی محیط و جلوگیری از چین خوردگی و ترکیدن سلول ها از تنظیم کننده های اسمزی مثل مانیتول(Manitol) و سوربیتول(Sorbitol) استفاده می شود.

جداسازی پروتوپلاست

پروتوپلاست سلول های گیاهی منبع مناسبی برای تولید گیاهان جدید می باشد.جداسازی پروتوپلاست به روش مکانیکی و آنزیمی صورت می گیرد.

روش مکانیکی به ندرت امروزه به کار می رود چون بسیار طولانی و طاقت فرسا است و پروتوپلاست کمتری از این روش بدست می آید اما مزیت استفاده از این روش این است که عوارض جانبی استفاده از روش های آنزیمی و وجود ناخالصی در پروتوپلاست های استخراج شده کمتر است.

امروزه روش آنزیمی کاربرد بیشتری دارد.پس از جداسازی پروتوپلاست بایستی خالص سازی آن ها انجام شود که به روش های مختلف شست و شو و ته نشین سازی (Sedimentation and washing)، غوطه ور سازی (Floating) و یا استفاده از شیب غلظت می تواند صورت پذیرد.

اندازه گیری قدرت حیاتی پروتوپلاست

پس از جداسازی و خالص سازی پروتوپلاست ها بایستی جهت استفاده های بعدی میزان قدرت حیاتی آن ها ارزیابی و بررسی می شود.

بدین منظور از رنگ فلئورسین دی استات(Fluorcin Diacetate) یا FDAاستفاده می شود.پروتوپلاست های زنده و فعال در زیر میکروسکوپ به رنگ زرد تا سبز و پروتوپلاست های آسیب دیده و غیر فعال به رنگ قرمز دیده می شوند.

ترکیب پروتوپلاست

ترکیب یا امتزاج پروتوپلاست های گیاهی جهت ایجاد سلول های هیبریدی جدید و نهایتا نسل جدید گیاهان اصلاح شده صورت می گیرد.پس از جداسازی پروتوپلاست تنها مانع برای ترکیب آنها غشاء پلاسمایی می باشد.

وقتی غشاء پلاسماییدو پروتوپلاست با هم تماس پیدا می کنند باید ابتدا به هم چسبیده و سپس با استفاده از محرک مناسب با یکدیگر ترکیب شوند.بدین ترتیب تنوع ژنتیکی حاصل می شود.وقتی دو پروتوپلاست با هم ترکیب شوند حالات مختلفی ممکن است حاصل شود . اگر دو هسته با هم ترکیب شوند یک سلول دو رگه حقیقی بدست می آید ولی اغلب دو هسته جدا از هم در سیتوپلاسم باقی می ماند و تشکیل هتروکاریون (Heterocaryon) را میدهند.

ترکیب پروتوپلاست

اگر یکی از هسته ها از بین برود و فقط هسته یکی از والدین باقی بماند این دو رگ را سایبرید (Cybrid) می نامند که این حالت یک روش مفید برای انتقال اطلاعات توارثی سیتوپلاسمی می باشد.در حال حاضر بر روی سایبرید ها برای افزایش قدرت مقاومت در برابر برخی از علف کش ها مطالعه می شود.

به طور کلی ترکیب پروتوپلاست روش بسیار مناسبی برای خلق ترکیبات جدید از هسته و سیتوپلاسم می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

۱.مانیتول (Monitol)

۲.کلرور کلسیم

۳.پروپیلن گالیت (Propylegallate)

۴.آنزیم سلولاز (Cellulase)

۵.آنزیم مسروزایم (Meserozyme)

۶.دری سلاز(Dericelase)

۷.محلول نمکی شست و شوی دیواره و سلولی پروتوپلاست

۸.رنگ فلوئورسین دی استات

۹.لوله سانتریفیوژ

۱۰.تیغ

روش کار

جهت جداسازی پروتوپلاست از چغندر قند به روش زیر عمل کنید:

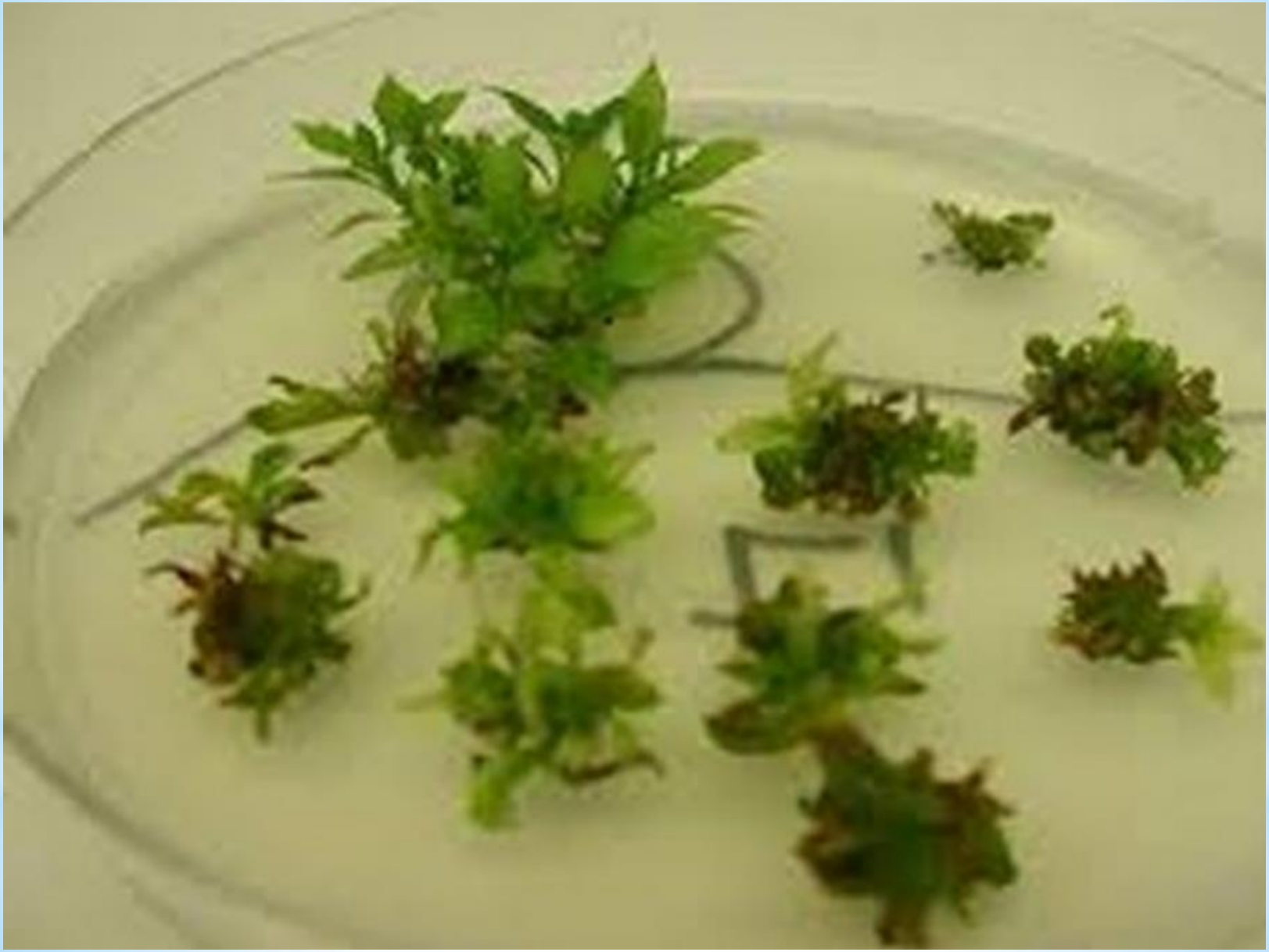
۱-ابتدا برگ های جوان را توسط تیغ به قطعات کوچک ۱تا۲ سی سیی تقسیم نمایید.

۲-برای سهولت در جداسازی پروتوپلاست و جلوگیری از اثرات جانبی مراحل آزمایش ابتدا برگ های جوان را به مدت ۲ ساعت در ۴۰میلی لیتر محلول نمکی شست و شوی دیواره سلولی و پروتوپلاست با مانیتول ۹درصد،کلرور سدیم و پروپیل گالیت ۰.۱میلی مولار به نسبت مساوی در تاریکی و در دمای آزمایشگاه قرار دهید.پس از این مرحله که به منظور پیش پلاسمولیز سلول ها انجام می شود نمونه ها را در لوله ای سانتریفیوژ استریل ریخته و به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید.

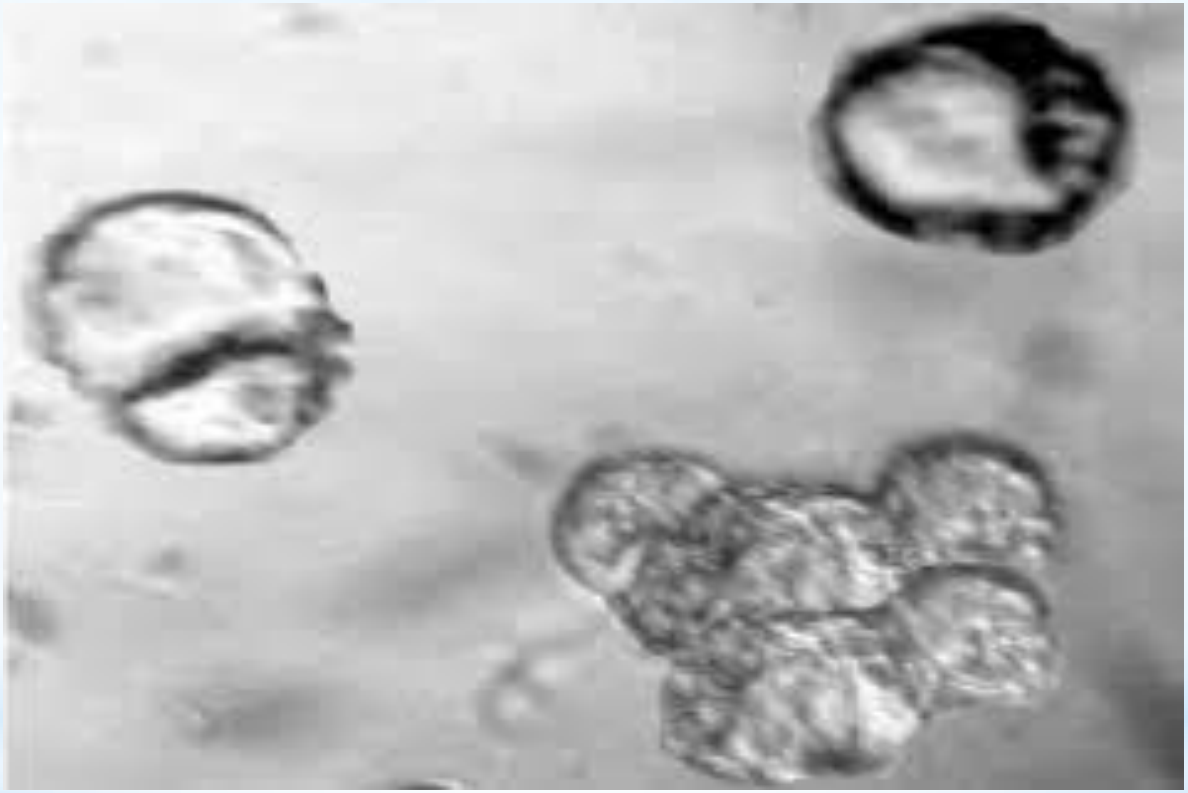
۳-پس از پایان سانتریفیوژ محلول رویی را دور ریخته و رسوب را در ۱۰ میلی لیتر محلول آنزیمی شامل آنزیم های سلولاز۰/۵درصد، مسروزایم۰/۵درصد، دریسلاز۰/۵درصد به اضافه پروپیل گالیت ۰/۱میلی مولار و محلول نمکی شست وشوی دیواره سلولی و پروتوپلاست قرار داده و هموژن کنید و به مدت۱۲ساعت در انکوباتور۳۷درجه سانتی گراد قراردهید تا جداسازی پروتوپلاست صورت پذیرد.

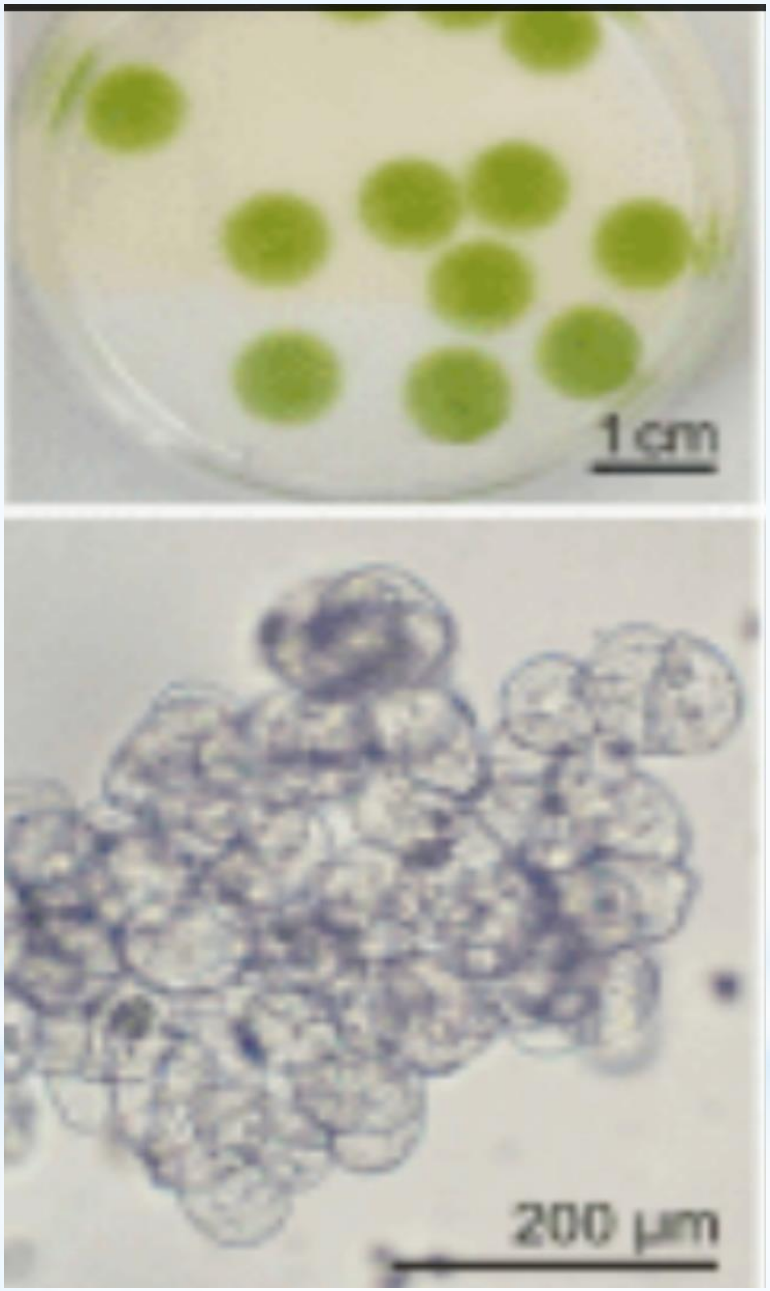
۴- جهت جداسازی پروتوپلاست ها از محلول فوق به آرامی نمونه ها را در داخل لوله سانتریفیوژ استریل منتقل کنید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

۵-پس از پایان سانترفیوژ محلول رویی را دور ریخته و رسوب را که حاوی پروتوپلاست های جدا شده است به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول پروپیل گالیت و محلول شست وشوی دیواره سلولی و پروتوپلاست به نسبت مساوی قرار دهید و مجددا به مدت۵ دقیقه با دور ۷۰۰rpm سانتریفوژ کنید و رسوب را جدا کرده و جهت خالص سازی این مرحله را حداقل دوبار تکرار کنید و سپس پروتوپلاست های خالص را جدا کنید.پروتوپلاست های بدست آمده آماده انتقال به محیط کشت مناسب و ایجاد نو ساقه می باشند.جهت اندازه گیری قدرت حیاتی پروتوپلاست چند قطره از سوسپانسیون حاوی پروتوپلاست های خالص شده را با رنگ فلوئورسین دی استات به مدت یک دقیقه مخلوط کرده و با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده کنید.پروتوپلاست های زنده و فعال را به رنگ زرد تا سبز و پروتوپلاست های آسیب دیده را به رنگ قرمز مشاهده می کنید.



آزمایشگاه سلولی و مولکولی ـ فرزانه فروهرفر




1cm
200 µm