مجله علوم دانشگاه تهران جلد ۱۰ شماره‌های ۳و۴ سال ۱۳۶۰ از صفحه ۳۵ تا ۴۸

بررسی ترکیب شیمیائی و خاستگاه «دیوارهٔ خاص[1]» در لوبیای روغنی (سوژا[2])

دکتر احمد مجد

گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

هریک از سلولهای مادرگرده از ابتدای میوز دیواره جدیدی در اطراف خود تشکیل می‌دهد که آنرا «دیوارهٔ خاص» نامند. در سوژا تشکیل «دیوارهٔ خاص» از ابتدای میوز، درگوشه های سلولهای مادرگرده، در بین پلاسمالم ودیواره اولیه بحالت مرکزرو شروع می‌شود وتا جداشدن تتراسپورها ادامه می‌یابد. درپایان میوز هرگروه از تتراسپورها بوسیله لایه هائی (حداکثر تا ٤ لایه) از «دیوارهٔ خاص» احاطه می‌شود.

بررسیهای سیتوشیمیائی نشان می‌دهد که در سوژا «دیوارهٔ خاص» ترکیب پیچیده‌ای دارد وگرچه اساساً کالوزی‌است اما بالیپیدهاوپلی‌ساکاریدهای‌اسیدی آمیخته‌است. پلاسمالم، اندامکهای مختلف ازجمله شبکه آند و پلاسمی وحفره‌های بزرگ سیتوپلاسمی، هم‌چنین گویچه های لیپیدی در تشکیل «دیوارهٔ خاص» در سوژا دخالت دارند.

Etude de la composition chimique et l'origine de la « paroi speciale » chez le Soja hispida Moench.

Dr. Ahmade Madjd

Dépt de Biologie, Université Tarbiat Moalem, Avenue Dr. Mofatteh., téhérane, Iran.

Resumé

Dés le début de la division réductionnelle, chaque sporocyte élabore une enveloppe de matériel nouveau, classiquement appelée «paroi spéciale».

Dans notre matériel, la mise en place de cette «paroi spéciale» débute à la prophase I. Les premiers dépots apparaissent aux angles des cellules sporogénes entre la paroi primaire et le plasmalemme qui entourent progressivement toute la ecllule. Certain clichés monternt que ces premiers dépôts ont structure fibrillaire, Les fibrilles étant disposées contre la paroi primaire. Ensuite de nouvelles fibrilles sont mises en place, entre le plasmalemme et les premiers dépôts; elles s'unissent aux premières et vont augmenter

۱- Paroi Speciale, Beer (1911)

۲- Soja hispida Moench

la densité et l'épaisseur de la « paroi spéciale ». L'épaississement centripète de cette paroi modifie l'aspect des cellules - mères des microspores; finalement, à lafin de la télophase I, le protoplasme de chaque cellule sporogéne devient plus ou moins sphérique ou ellipsoide, totalement entouré par ces dépôts d'épaisseur variable.

Plusieurs méthodes ont été employées dans le but de préciser la nature chimique de cette paroi. Si on tient compte des résultats obtenus avec les diverses techniques, on peut penser que, chez le Soja hispida, la «paroi spéciale» qui enveloppe progressivement les cellules porogénes, dés les premiers stades de la méiose, est une paroi complexe formée principalement de callose, imprégnée de lipides et encore de polysaccharides non cellul - osiques (probablement polysaccharides acides qui sont responsables de sa basophilie) le plasmalemme et de nombreux organites (profils de réticulum endoplasmique, grandes vésicules cytoplasmiques) ainsi que des globules lipidiques interviendraient dans la mise en place des dépôts de la «paroi spéciale» des microsporocytes de Soja hispida.

مقدمه

ازآغاز میوزدیواره‌ای ازمواد جدید بین پلاسمالم ودیواره اولیه هریک ازسلولهای مادرگرده تشکیل می‌شود که بطورمعمول آنرا «دیواره خاص» نامند (Beer, 1911). چگونگی تشکیل ، تغییرات بعدی ونقش این دیواره موضوع بررسیهای متعددی بوده‌است.

(Waterkeyn, 1961 & 1962 ; Castetter, 1926 ; Beer, 1911 ; waterkeyn & Bienfait, 1970; Geneves, 1971, 1972, 1973, 1974); Madjd, 1977; Cerceau et al, 1981

هریک ازاین محققان ازدیدگاه ویژه‌ای به‌بررسی «دیواره خاص» پرداخته‌اند ودرحد اطلاع ماتاکنون بررسی جامعی درمورد خاستگاه، نحوهٔ تشکیل، ساختمان دقیق میکروسکپی، ترکیب شیمیائی ونقش این دیواره صورت‌نگرفته است. دربررسیهائی که با استفاده از میکروسکپ‌های نوری والکترونی درباره میکروسپوروژنز سوژا انجام دادیم مشخص شد که این دیواره بهنگام میوز دراطراف هریک ازسلولهای مادرگرده گسترش قابل توجهی می‌یابد. همزمان با تحولات هسته‌و سیتوپلاسم درسلولهای مادرگرده وتشکیل تدریجی تتراسپورها دیواره خاص تغییرات ساختمانی - بیوشیمیائی زیادی حاصل می‌کند که همه نشانه‌هائی ازدخالت ونقش آن درحفاظت‌و تکوین تتراسپورهاست. استفاده از روشهای مختلف سیتوشیمیائی و بررسیهای میکروسکپی اطلاعات زیادی را از خاستگاه ، تکوین، ترکیب شیمیائی وتغییرات «دیواره خاص» در طول میکروسپوروژنزسوژا بدست دادند امانقش اصلی این دیواره ودخالت یاعدم دخالت‌آن درتشکیل پوششهای دانه‌گرده به‌تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

ماده و روش کار

نمونه‌های موردبررسی از نوع لوبیای روغنی بوده است که درشمال ایران درمزارع اطراف ساری ودرشرایط مناسب آب وهوائی لازم برای رشد این‌گیاه کشت می‌شده‌اند همچنین دانه‌های این‌گیاهان درگلخانه‌های مرکز تحقیقاتی Gif - yvette فرانسه کشت شده وگیاهان حاصل نیز در بررسیها مورداستفاده بوده‌اند. برجستگیهای‌سازنده پرچمها، وبساکهای بسیار جوان در مراحل مختلف رشدشان ازجوانه‌های‌گل سوژا که‌درمراحل مختلف‌تشکیل وشگفتگی بوده‌اند برداشت شده وبا روشهای زیر بررسی شده‌اند:

۱-روشهای‌مشاهده وبررسی بامیکروسکپهای نوری: برشهای سری که ۵ تا ۱۰ میکرومتر ضخامت داشته‌اند، ازنمونه‌های‌تثبیت‌شده بافیکساتورهای‌مختلف‌تهیه‌شده‌و بوسیله‌مواد زیررنگ‌آمیزی‌شده‌اند: آبی تولوئیدین، پیرونین، محلول الکلی‌آبی‌نیل، آبی رزورسین، سیاه سودان، سولفات‌آبی‌نیل. هم‌چنین‌وضع «دیواره‌خاص» بامیکروسکپ فلوئورسانس بعد از قراردادن برشها درمحلول قلیائی آبی آنیلین‌نیز بررسی شده است.

۲-روشهای مشاهده بامیکروسکپ الکترونی: بعد از تثبیت برجستگیهای‌سازنده پرچمها وبساکهای‌بسیارجوان بامحلول ۶/۲۵ درصد آلدئیدگلوتاریک درتامپون کاکودیلات ۱ مولکول‌گرم درلیتر نمونه‌ها بامحلول ۲ درصد تتراکسیداسمیوم درهمان‌تامپون نیزتثبیت شده‌اند. آب‌گیری از نمونه‌ها بوسیله استن انجام شده وبعد نمونه‌ها درمحیط رزینی سپورا[1] قالب‌گیری شده‌اند.

برشهای نیمه ـنازك این نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی باآبی تولوئیدین بمنظور بررسی سریع بامیکروسکپ نوری مشاهده شده‌اند

1- Spure

افزایش کونتراست الکترونی برشهای بسیار نازك بوسیله محلول آبی ۱ درصد پرمنگنات‌پتاسیم، وبعد سیترات سرب‌صورت گرفته است.

بمنظور مشخص کردن پلی‌ساکاریدها، ازتست PATAG Seligman et, al, 19695 اصلاح شده بوسیله Thiey, 1967 . استفاده شده است.

تعدادی از برشهای‌بسیار نازك بوسیله اسیدفسفوتنگستیک با PH کم رنگ‌آمیزی شده‌اند. (Berhard & Babai ۱۹۷۱).

۳ـتعدادی از نمونه‌ها، یابرشها را تحت‌تاثیر محلولهای ۱/. درصدتا ۱ درصداز آنزیمهای پکتیناز، ریبونوکلئاز، سلولاز قرار داده ونتایج‌حاصل را بامیکروسکپهای نوری‌والکترونی بررسی کردیم

نتایج و بحث:

۱ـ ترکیب شیمیائی «دیواره خاص»

بمنظور شناخت ترکیب شیمیائی این دیواره روشهای زیادی مورداستفاده قرارگرفته‌انداین دیواره:

—بااسید پریودیک ـ شیف‌رنگ می‌شود.

—معمولا باقرمز روته‌نیوم رنگ نمی‌گیرد (p_s شکل ۱، شماره ٤)، ودر برشهای بسیارنازك پس از تیمار باپکتیناز تغییر نمی‌کند.

—به‌آسانی باآبی تولوئیدین رنگ می‌شود (p_s شکل ۱، شماره‌های ۱ و ۲) وتاحدی با پیرونین رنگ می‌گیرد (p_s شکل ۱، شماره ٥) ، بنابراین باز دوست است. بعد از تیمار برشها باریبونو کلئاز، پیرونین دوستی خود را حفظ می‌کند (p_s شکل ۱، شماره ٦) پس پیرونین دوستی آن نتیجه وجود ریبونوکلئوپروتئین نیست

—با محلول الکلی آبی‌آنیلین رنگ می‌شود (p_s شکل ۱، شماره ۳)، بهمین‌نحو باآبی‌رزورسین نیز رنگ می‌گیرد.

—پس ازتیمار نمونه‌ها بامحلول قلیائی آبی‌آنیلین، دربرابر تابش پرتوهای فرابنفش، فلوئورسانت می‌شود (p_s . شکل ۲، شماره ۱ تا ۳).

—پس از تیمار برشها باسیاه‌سودان B بصورتی ناهمگن رنگ تیره خاکستری بخود می‌گیرد (p_s شکل ٤، شماره ۲)، با سولفات آبی‌نیل، آبی‌رنگ می‌شود (p_s شکل ٤، شماره ۳).

—پس از استفاده از روش تیری، در مشاهده بامیکروسکپ الکترونی شفاف‌وکم‌وبیش مایل به‌خاکستری است (p_s شکل۳ ، شماره‌های ۱ و۲). تنها در برخی‌نواحی‌موادی که تاحدی تیره‌رنگ شده‌اند قابل تشخیص‌اند (فلش دوتائی . شکل ۳، شماره ۱) که به‌احتمال بامحتویات برخی حفره‌هائی که‌ضمن تغییر «دیواره خاص» درآن تخلیه می‌شوند، مطابقت می‌کند.

—پس از تیمار باسلولاز وسپس اعمال روش تیری تغییر نمی‌کند (p_s شکل ٤، شماره ٤)

—پس از تیمار بااسید فسفوتنگستیک باPH کم تقریباً براحتی رنگ می‌گیرد (p_s شکل ٤شماره ٥). همین وضع پس از تیمار باپرمنگنات پتاسیم نیزایجاد می‌شود (p_s شکل٥ و شماره ٦).

بادرنظرگرفتن نتایج حاصل از بکارگرفتن این روشهای مختلف، می‌توان پنداشت که در سوژا «دیواره خاص» ترکیب پیچیده‌ای دارد: اساساً کالوزی است ولی بالیپیدها وهمچنین پلی ساکاریدهای غیرسلولزی (به‌احتمال پلی‌ساکاریدهای اسیدی که موجب حالت بازدوستی آنند) آمیخته شده است.

۲ـ خاستگاه «دیواره خاص»

درسوژا اولین آثار «دیواره خاص» در تماس باپلاسمالم‌و حتی برسطح آن پدیدار می‌شود (فلش. شکل ٦ ، شماره ۱) . بنابراین پلاسمالم ممکن است در تشکیل این دیواره سهم داشته باشد.

بهنگام تشکیل «دیواره خاص» تغییراتی در سیتوپلاسم سلولهای مادرگرده مشاهده می‌شود رشته‌های شبکه‌آندوپلاسمی فراوان می‌شوند (Reشکل ۳شماره ۱ و ۲، شکل ۷،شماره‌های ۱، ۳و٤) ودر مواردی به‌موازات سطح‌سلول مادرگرده قرار می‌گیرند.

گاهی در تماس بارشته‌های شبکه‌آندوپلاسمی، توده‌های کوچکی از مواد کم تراکم دیده می‌شود شکل ٥، شماره ٤) که وضعیت آنها موجب این تصور است که بطور عمده از کالوز ساخته شده‌اند.

در موارد دیگر، بنظر می‌رسد که ساکولهای شبکه‌آندو پلاسمی رابطه نزدیکی باگویچه‌های لیپیدی دارند (شکل ۷،شماره ۱).

دردو حالت یادشده، شکلها مشخص می‌سازند که شبکه آندوپلاسمی نقش‌عمده‌ای‌را درتشکیل«دیواره خاص» ایفادمی‌کند

به‌هنگام میوز درسیتوپلاسم ودرسطح سلولهای مادرگرده حفره‌های زیادی باویژگیهای متفاوتی دیده می‌شوند که نمی‌توان خاستگاه همه رایکسان دانست. ویژگیهای این‌حفره‌ها بشرح زیر است.

الف‌ـ برخی‌حفره‌ها به بزرگی ۳٪تا ۸٪ میکرومتر، درسطح پلاسمالم جای دارند (VEشکل ۷، شماره٤) این‌حفره‌ها بوسیله غشای واحدی محدود شده‌اند وپس ازکاربرد روش‌تیری بصورت ناهمگنی تیره می‌شوند. حفره‌های مذکور معمولا در مجاورت یا در

تماس با رشته های شبکه آندوپلاسمی قراردارند. (فلش. شکل ۷، شماره ٤). برخی کلیشه ها نشان می‌دهند که در نواحی داخلی سیتوپلاسم، بخشهائی از ساکولهای شبکه آندوپلاسمی حفره‌هائی را باندازه‌ای مشابهٔ حفره‌های سطحی تشکیل می‌دهند(فلش.شکل ۷، شماره ۳). هر دوگروه این حفره‌ها (حفره‌های سطحی وحفره‌های درونی سیتوپلاسم) فعالیت‌فسفاتازاسیدی نشان می‌دهند وباروش گومری[1] بوسیله رسوب مس مشخص می‌شوند (شکل۸ ، شماره‌های ۱و۲). این حفره‌ها که اندازه‌ای مشابه‌وفعالیت‌فسفاتازاسیدی‌دارند واحتمالا از ساکولهای شبکه آندوپلاسمی ایجاد شده‌اند نقش غیر قابل انکاری در تشکیل «دیواره خاص» دارند. محتوای درونی‌این حفره‌ها که به‌طرز ظریفی دانه‌دانه است به«دیواره خاص» انتقال می‌یابد.

ب:حفره‌های دیگر خیلی بزرگترند واندازه آنها به ۳/. تا ۵/. میکرون می‌رسد این‌حفره‌ها که درون سیتوپلاسم جای‌دارند واجد محتوای پلی‌ساکاریدی‌اند که باروش تیری تیره‌رنگ می‌شود (GV شکل ۷، شماره‌های ۱ تا ۳).

محتویات پلی‌ساکاریدی این حفره‌ها پس ازتیمار باسلولاز هیدرولیز نمی‌شود (حتی‌اگر تیمار باسلولاز ۱ درصد تا ۱۸ ساعت نیز بطول انجامد). حفره‌های مذکور که‌ظاهراً بیکدیگر ملحق می‌شوند ارتباط نزدیکی نیز باگلبولهای لیپیدی دارند.

چنین حفره‌هائی درسطح پلاسمالم نیز وجود دارند واینکه محتویاتشان میتواند به «دیواره خاص» انتقال یابد نفی نمی‌شود (فلش دوتائی. شکل ۷، شماره‌های ۱و۲) بعلاوه وضع محتویات این حفره‌ها بحسب موقعیتشان در سلول تغییر می‌یابد: هرچه بـه پلاسمالم نزدیکترباشند محتویاتشان باروش تیری کمتررنگ‌می‌گیرد، ودر نهایت محتوای آنها شبیه مواد تشکیل دهنده «دیواره خاص» حالت شفافتری پیدا می‌کند (فلش دوتائی. شکل۷، شماره ۱).

در طول میوزگویچه‌های لیپیدی در سلولهای مادرگرده فراوانند. پس از رنگ‌آمیزی برشهای‌بسیار نازک‌با پرمنگنات‌پتاسیم این‌گویچه‌ها رنگی مشابه باسواد «دیواره خاص» بخود می‌گیرند (Lشکل ۵، شماره‌های ۳، ۵)، بسیاری ازاین‌گویچه‌ها بتدریج‌به بخشهای محیطی سیتوپلاسم انتقال یافته، تراکم آنها کم‌وبیش کاهش می‌یابد، وگرچه مشاهده درحال سکون آنها بامیکروسکپ الکترونی امکان پیگیری دقیق جابجائیشان را بدست‌نمی‌دهد، اما مجموعه مشاهدات مابرروی برشهای‌سری چنین می‌نمایاند که این گویچه‌ها درتماس باپلاسمالم قرار می‌گیرند ودر آنجا بادیگر مواد «دیواره خاص» درهم می‌آمیزند. (L شکل ۵، شماره‌های ۳ و ۵). تعدادی ازکلیشه‌ها حالاتی از این آمیختگی را نشان می‌دهند (L_1شکل ۷، شماره‌های ۱و۲).

بخش درونی‌تر این‌گویچه‌های لیپیدی که در تماس با سیتوپلاسم سلولهای مادرگرده است‌متراکم تراز بخشی است که در خارج از پلاسمالم قرار دارد. بخش اخیر ویژگیهای متفاوت‌دیگری نیزدارد. تراکمش کمتراست، ناهمگن‌ترمی‌باشد، لبه‌های‌نامشخص ونامنظمی دارد ومتورم‌بنظر می‌رسد (L_1.شکل ۷، شماره‌های ۱و۲ این‌مناظر نوعی‌درهم ریختن‌سازمان‌و تداخل‌این بخش ازگویچه‌های لیپیدی به «دیواره خاص» را مجسم می‌سازند. همانطورکه قبلا شرح‌داده شد این‌گویچه‌های لیپیدی ارتباط نزدیکی نیزبارشته‌هائی از شبکه‌آندوپلاسمی وحفره‌های درون سیتوپلاسمی دارند. بطور خلاصه در تشکیل «دیواره خاص» در اطراف سلولهای مادرگرده‌و تتراسپورها درسوژا: پلاسمالم، اندامکهای‌مختلف (رشته‌های‌شبکه آندوپلاسمی، حفره‌های درشت سیتوپلاسمی) وهمچنین گویچه‌های لیپیدی سهم دارند.

۱- Gomori

شکل ۱ . رنگ آمیزی «دیوارهٔ خاص» با رنگهای مختلف ومشاهدهٔ آن با میکروسکوپ نوری

شکل ۲ . بررسی «دیوارهٔ خاص» با میکروسکوپ فلوئورسانس

شکل ۳ . به‌کارگیری روش‌تیری و مشاهده «دیوارهٔ خاص» با میکروسکوپ الکترونی‌گذاره

شکل ٤ . بررسی ویژگیهای «دیوارهٔ خاص» با میکروسکوپهای نوری والکترونی.

شکل ۵. مراحل تدریجی تشکیل وتغییرات «دیوارهٔ خاص»

شکل ٦. مراحل ابتدائی تشکیل «دیوارهٔ خاص» به هنگام میوز سلولهای مادره گرده

شکل ۷ . بررسی اجزای سلولی مؤثر در تشکیل «دیوارهٔ خاص» با میکروسکوپ الکترونی

شکل ۸ . نمایش خاصیت فسفاتاز اسیدی در حفره‌های سیتوپلاسمی سلولهای مادرگرده .

Refrences

Babai f. et BernPard W. (1971) Détection cytochimique par l'acide phosphotungstique de certains polysaccharides sur coupes à congéa - tion ultrafines. *J. Ultrastruct. Research.*, **37,** 601 - 617.

Beer R. (1911) Studies in spore development. *Ann. Bot.*, **25,** 199 - 214.

Castetter E. (1926) Cytological studies in *Cucurbitaceae.* I - Microsporogenesis in *Cucurbita maxima. Am. J. Bot.*, **13,** 1.

Cerceau M - Tet al. (1981) Relation sporophyte gamé - tophte. *Ann. Sci. Nat* (Botanique). **2-3,** 69 - 92

Geneves L. (1971) Phénomènes ultrastructuraux au cours de la méliose staminale chez *Ribes rubrum L.* (Grossulariacées). *Bull. Soc. bot. Fr.*, **118,** 481 - 524.

Geneves L. (1972) Etude cytochimique de la genèes des parois intersporales pendant la méiose, chez l'*Hypnum rusciforme. CC. R. Acad. Sc. série D.*, **274,** 2875 - 2878.

Geneves L. (1973) Elaboration de polysaccharides destinés à s' incorporer dans les parois, au cours de la méiose, dans les anthères du *Ribes rubrum* L. (Grossulariacées). *C. R. Acad. Sc., série D.*, **227,** 169 - 172.

Geneves L. (1974) Distribution des polysaccharides pariétaux, en relation avec l'évolution de diverses cytomembranes, dans les méiocytes staminaux du *Ribes rubrum* (Grossulariacées), et principalement au cours du colisonnement. *J. Microscopie.*, **19,** n 1, 65 - 88.

Madjd. A (1977). La microsporogenèse chez le Soja hispida Moench (Papilionacées). *Thèse de Doctorat.* Uoniversité P. et M. Curie, Paris. 2 volumes polycopiès. 55 - 60

Thiery j. p. (1967) Mise en évidence des polysa - ccharides sur coupes fines en microscopie élec - tronique. *J. Microscopie.*, **6,** 987 - 1018.

Waterkeyn L. (1961) Etudes des dépots de callose au niveau des parois sporocytaires, au moyen de la microscopie de fluorescence. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **252,** 4025.

Waterkeyn L. (1962) Les parois microsporcytaires de nature callosique chez *Helleborus et Trade - scantia. La Cellule.*, **62,** 225 - 255.

Waterkeyn L. et BIENFAIT A. (1970) On a possible function of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea L. Roth. Grana.*, **10,** 13 - 20.