سیکل زندگی مگس سرکه (The life cycle of drosophila melanogaster)

تیپ های موجود در آزمایشگاه

۱- تیپ وحشی(Wild) : بدن زرد روشن وچشم قرمز میباشد .

۲- تیپ ابونی (Ebony) : رنگ بدن سیاه براق در مقایسه با تیپ وحشی بسیار تیره تر می باشد مگس هایی که تازه زاده شده اند در مقایسه با مگس های مسن کم رنگ هستند .رنگ چشم قهوهای می باشد.

۳- تیپ سپیا (Sepia) : رنگ چشم در بدو ظهور مگس هوهای متمایل به قرمز و شفاف است که به تدریج تیره تر وبه رنگ قهوهای سوخته در می آید. ودر نهایت سیاه رنگ می باشد.

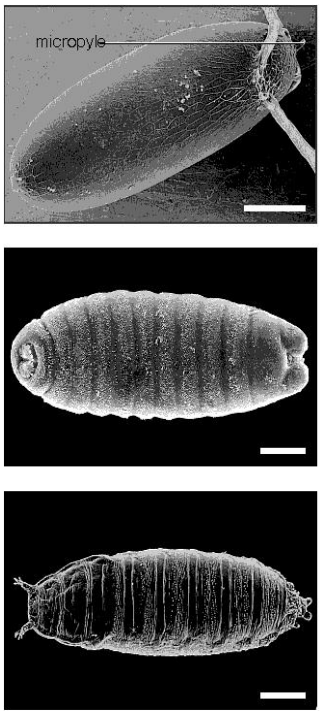
۴- تیپ وایت (White) : رنگ چشم برفی می باشد.

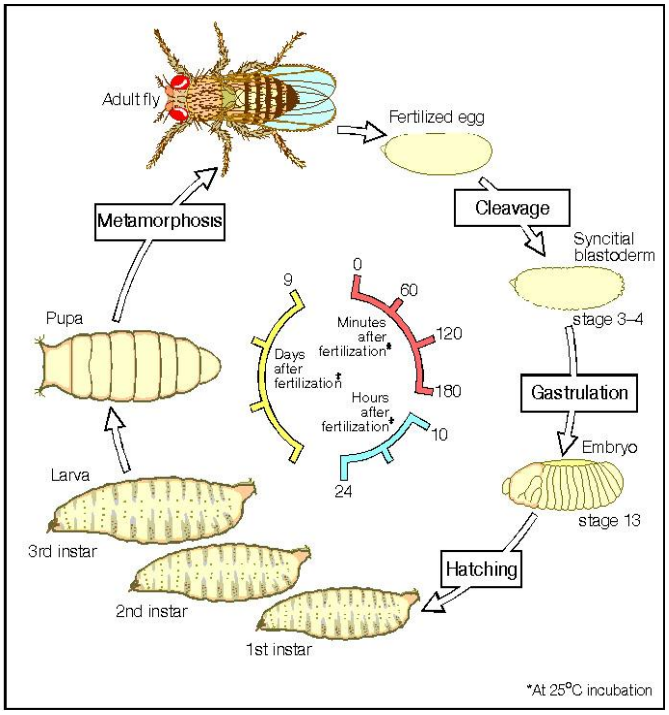
۵- تیپ وستیجیال (vestigial) : بال تحلیل رفته وکوتاه می باشد.

بعد از عمل لقاح وتشکیل زیگوت مراحل رشد ونمو رویانی در داخل غشاهای تخم انجام می گیرد سپس لارو (larva) از تخم خارج شده وبا تغذیه ورشد خود در نهایت به شفیره یا پوپا (pupa) تبدیل می شود. پس از آن نیز شفیره تکامل پیدا کرده وحشره کامل یا بالغ ظاهر میگردد. طول مدت این مراحل در تحت تاثیر دمای محیط متغیر است. متوسط دوران تخم ولارودر ۲۵ درجه سانتی گراد ۵ روز است. طول دوره پویا در این دما ۵ روزطول می کشد بدین ترتیب سیکل زندگی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد میتواند در عرض ۱۰ روزکامل شود .در دمای پایین تر این چرخه طولانی تر ود ر دمای بالا این چرخه سریعتر خواهد بود.

تخم مگس سرکه (The egg)

تخم مگس سرکه در حدود نیم میلی متر طول دارد قسمت پشتی تخم (Dorsol (پهن تر از سطح تقریبا قوسی شکل شکمی) ventral) است . پوشش خارجی تخم که (chorion) نام دارد غیر شفاف است یک جفت زائده رشته مانند که به سطح منطقه قدامی یا پشتی متصل است از غرق شدن تخم در محیط خیس یا آبکی جلو گیری می کند . یک تکنسین ماهر می تواند پوشش کوریون را از سطح تخم جدا کرده وغشاء وتیلین (vitelline)که شفاف براق و از جنس کیتین است نمایان سازد. نفوذ اسپرم به داخل تخم از طریق منفذ کوچکی به نام میکروپیل (micropyle)در برجستگی مخروطی شکل ناحیه قدامی تخم ودر ضمن عبور آن در زهدان انجام می گیرد گرچه چندین اسپرم ممکن است وارد یک تخم شوندولی معمولا فقط یکی از آنها در لقاح شرکت می کند. اسپرمها از زمان جفت گیری توسط مگس ماده ذخیره می شوند. بلافاصله بعد از ورود اسپرم تقسیمات کاهش کروموزومی تکمیل شده وهسته تخمک تشکیل می شود. سپس هسته اسپرم وهسته تخمک در مجاورت یکدیگر قرار گرفته وبا ادغام با یکدیکر هسته زیگوت را بوجود می آورند. که پس از تقسیم دو هسته شکافتگی(cleavage) به وجود می اید. واین اولین مرحله تکامل رویانی است. مگس ماده ممکن است در مدت کوتاهی پس از نفوذ اسپرم عمل تخم ریزی را شروع کند ویا اینکه در طی مرحله اولیه رشد ونمو رویانی آنها را در زهدان نگهداری کند.



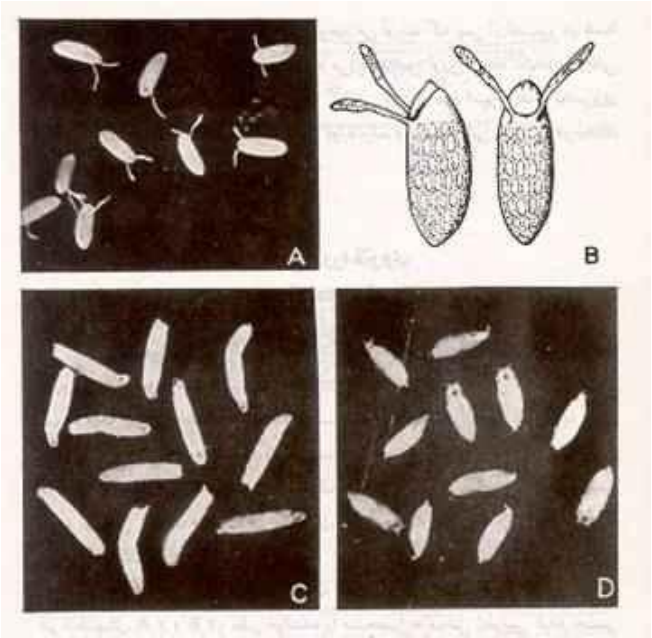


مراحل دوره لاروی (The larval Stage)

لارو پس از خروج از تخم دوبار پوست اندازی می کند ونتیجتا دوره لاروی شامل سه مرحله یا اینستار خواهد بود . لارو را در بین دو پوست اندازی اینستار می گویند . اولین اینستار(Instar) از زمان خروج لارو از تخم تا نخستین پوست اندازی می باشد. دراین مرحله توانایی لارو به اندازه جثه وتعداد دانه هایی که در قلابها آروارهای رشد موجود است بستگی دارد .اینستار دوم از پوست اندازی نخست تا دومین پوست اندازی می باشد . وبعد از دومین پوست اندازی اینستار سوم آغاز می گردد. در همین اینستار است که لارو برای پویا شدن آماده میگردد. قبل از این مرحله لارو از درون محیط کشت به طرف مکانی نسبتاخشک می خزد. وسپس از حرکت باز می ایستد ومنفذ تنفس قدامی تغییر حالت می دهد. در اخرین مرحله یا اینستار سوم طول لارو ممکن است به ۴/۵ برسد میلی متر برسد . لاروها به قدری فعال وحریص هستند که به علت خزیدن کا نالها وشیارهای بسیار زیادی در محیط غذایی ایجاد می کنند. این تحرک لاروها در محیط غذایی ساده ترین معیار برای ارزیابی میزان موفقیت در نسلکیری مگس سرکه فقط چند روز پس از انجام تخم ریزی است غدد جنسی در محل بافت چربی (fat bodies) واقع در پهلوها ودر قسمت خلفی لارو قرار گرفته اند .چون بیضه های یک لارو مذکر بسیار درشت از تخمدانهای لارو مونث هم اندازه ویا بزرگتر است. لذا تععین جنسیت لارو می تواند بدون هیچ گونه اشکالی صورت گیرد . با کمی تجربه شخص می تواند تشخیص جنسیت را بدون کالبد شکافی انجام دهد. زیرا از روی دیواره شکاف بدن میتوان غده جنسی نسبتا درشت (بیضه) ویا غده جنسی غیر قابل تشخیص (تخمدان) را تفکیک نمود. توانایی تشخیص نر از ماده در مرحله لاروی دانشجو را قادر می سازد تا با نت برداری برای مطالعه کروموزومهای دروزوفیلا را با اطلاع قبلی از جنسیت آن انجام دهد.

تشکیل شفیره یا پوپا (PUPATION)

با فرا رسیدن مرحله شفیره لاروها از محیط کشت به بیرون خزیده وبه محلی نسبتا خشک مانند دیواره ظرف کشت می چسبند . مگس سرکه در آخرین پوست لاروی خود که در ابتدا نرم وسفید است ولی بتدریج سخت وتیره می گردد شفیره می بندد. در اینجا لزومی به اشاره به تغییرات ودگر گونیهای دوره شفیره نیست وکافی است گفته شود که این تغییرات در نهایت به تشکیل اندامهای حشره کامل منجر می شود. وقتی که این دگر گونیها تکمیل شده حشره بالغ راه خود را از انتهای قدامی محفظه شفیره باز می کند. مگس که خارج می شود در ابتداء جثه ای طویل وبالهای غیر گسترده دارد ولی در مدت کوتاهی بالها باز وگسترده می شوند. وبتدریج بدن حشره شکل طبیعی خود را بدست می آورد. در زمان خروج رنگ مگسها نسبتا روشن است ولی در ساعات اولیه بتدریج تیره تر می شوند. رنگ مگسها معیار خوبی برای تشخیص مگسهای تازه خارج شده از مگسهای قدیمی تر در همان محیط کشت است.

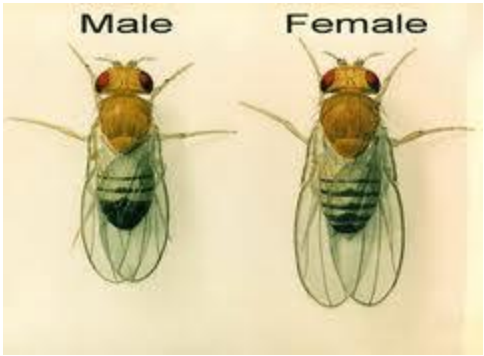


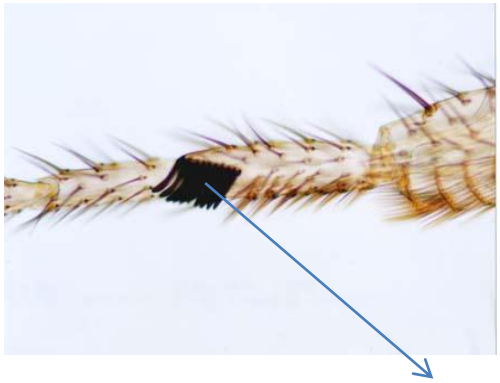
تصویر A مرحله تخم مکس سرکه تصویر B نمای جانبی وپشتی مرحله تخم

تصویر C مرحله لارو تصویر D مرحله شفیره

تعیین جنسیت در مگسهای بالغ (Recognizing the sex of the adult fly)

قبل از هر چیز طریقه شنا سا ئی نرها وماده ها دارای اهمیت است با تجربه وتمرین می توان جنس مگسهای با لغ را با چشم غیر مسلح وبدون استفاده از استریو میکروسکوپ تشخیص داد . مگسهای نر وماده را می توان با استفاده از روشهای مختلف از یکدیگر تشخیص داد . در ماده ها قسمت انتهای شکم کشیده است در حالی که در نرها این قسمت نسبتا گرد می باشد . ناحیه شکم در ماده ها با گذشت زمان و با لغ شدن تخمها بسط پیدا کرده وبزرگ می شود واین تغییر را براحتی می توان تشخیص داد . در بسیاری از نمونه ها از جمله نوع وحشی مگس سرکه طرح نوارهای تیره در بندهای شکمی وجه تما یزی است در دو جنس نر وماده که می توان بدون توسل به استریو میکروسکوپ آنهارا از یکدیگر تفکیک نمود . قسمت شکم در ماده ها از هفت بند تشکیل شده است که می توان آنها را با ذربین معمولی مشاهده کرد در حالی که این بندها در مگس نر فقط پنج بند است . مگسهای نر دارای شانه جنسی (Sex comb) هستند وآن عبارت از تعدادی در حدود ده عدد تار چه یا بریستیلهای (bristles) سیاه وسخت است که در سطح قسمت انتهایی اولین بند تار سوس (tarsal goint) در پاهای قدامی قرار دارند این تارچه ها در مگس ماده وجود ندارند . شانه جنسی یک خصوصیت قابل تشخیص در نرهاست و میتوان با استفاده از آن جنس مگس را در اولین دو ساعت پس از تفریخ تخم مورد شنا سایی قرار گیرد. نرها همچنین دارای شکم سیاه تر از ماده ها هستند به کمک نشانه های متعدد فوق می توان مگس نر بالغ را از ماده تشخیص داد واین کار با چشم غیر مسلح عملی است ولی در موارد مشکوک با مشاهده شانه جنسی از طریق استریو میکروسکوپ می توان اطمینان حاصل نمود . بدیهی است توانایی وتشخیص سریع ودقیق مگسهای نر از ماده در کلیه آزمایشهای نسل گیری یک امر ضروری است.





شانه جنسی

روش تهیه مگس بکر (آمیزش نیا فته)

جمع آوری مگسهای بکر برای اجرای آزمایش قبل از انجام تلاقی ضرورت دارد . به همین منظور صبح اول وقت بطری حاوی کشت مگسهای جوان را خالی می نمائیم بطوریکه هیچ گونه مگسی در محیط کشت نباشد . بعد در همان روز بطری ها مجددا خالی شده وجنسها را از یکدیگر جدا می سازیم ماده هایی که در طول روز تفریخ شده اند و۶- ۵ عمر از زمان جداشدن از نرها ندارند بکر می باشند.

محیط کشت موز (banana food)

ساده ترین محیط کشت یک تکه موز کاملا رسیده است که آنرا با محلول مخمر در آب آغشته کرده وسپس در یک ظرف کوچک شیشه ای از قبیل بطری شیر ویا شیشه مایونز قرار می دهیم. سپس یک قطعه نوار کاغذ خشک کن رادر بافت موز فرو می بریم تا محکم شود مگسهای والد رادر این ظرف وارد نموده ودهانه آن را توسط یک تکه پنبه می بندیم با وجود اینکه مگس سرکه در این نوع محیط کشت خوب رشد می کند ولی در حال حاضر از این روش بندرت استفاده می شود زیرا با فرا رسیدن زمان خارج شدن مگسها از شفیره (hatch) این محیط کشت به قدری نرم وکهنه خواهد بود که مگسها را به زحمت می توان از ظرف شیشه ای خارج کرد . با این وجود از این روش می توان هر از گاهی برای آزمایش وبه منظور تسریع در کار استفاده نمود . ظروف استوانه ای شکل با قطر کم مانند لوله آزمایش در مقایسه با ظروف عریض مانند بطری شیر بهتر می توانند تکه های موز رادر خود نگه دارند.

محیط کشت دیگر (other culture medha)

برای مطالعه ویا انتقال مگسها لازم است آنها را با تکان دادن ظرف کشت از محیط کشت خارج کنیم به همین علت لازم است محیط کشت به اندازه کافی غلیظ وسفت باشد تا در هنگام تکان دادن از ظرف به بیرون نریزند برای ایجاد قوام مناسب در محیط کشت میتوان مقداری آگار به بقیه مواد اضافه نمود . یک محیط کشت خوب بایستی خصوصیات زیر را داشته باشد :

۱- وجود مقدار کافی قند برای تغذیه لاروها وتسریع رشد مخمر

۲- محیط کشت بایستی دارای قوام منا سب باشد.

نحوه جابجا کردن مگس سرکه واتریزه کردن (Handling of flies and etherizer)

اتریزه کردن مگسها به منظور آرام نگهداشتن آنها صورت می گیرد تا بتوان خصوصیات آنها را مطا لعه نمود ویا اینکه آنها را برای آمیزش به به ظروف کشت منتقل نمائیم . برای نگهداری مگسها در آزمایشگاه به یک انکوباتور ۲۵ درجه نیاز است وسایل مورد نیاز برای اداره ویا انجام تلاقی وآمیزش مگسها علاوه بر انکوباتور به بینوکولار وقلم مو نیز نیاز می باشد.

ظرف حاوی محیط کشت های کشت را در یکدست قرار داده وبه آرامی بر روی میز ضربه بزنید ضربه های وارده به ظرفحاوی مگس آنها را به ته ظرف هدایت می کند تا بتوان سر بطری را برداشت بدون اینکه مگسها فرارکنند همین طور که به ضربه زدن به شیشه مگسها ادامه می دهید سر بطری را برداشته وبه سرعت دهانه ظرف حاوی مگس ها را روی دهانه ظرف خالی گذاشته وبا ضربه مگسها را وارد ظرف خالی می نمائیم. سپس یک تکه پنبه آغشته به اتر را روی دهانه ظرف حاوی مگسها گذاشته ودر عرض کمتر از یک دقیقه مگسها بیهوش واز حرکت باز می ایستند. در این هنگا م برای جابجایی مگسها از قلم مو استفاده نمود . هر گاه مگسها قبل از تکمیل مطا لعه شروع به حرکت نمایند می توان دوباره آنهارا اتریزه نمود. وسیله اتریزه نمودن مجدد معمولااز یک پتری دیش (Petridish) که یک تکه نوار کاغذ خشک کن ویا یک تکه پنبه به سطح داخلی آن چسبانده شده تشکیل شده است. ابتدا چند قطره اتر را روی کاغذ ویا پنبه چکانده وسپس مگسها را با این وسیله می پو شانیم تا اینکه دوباره بیهوش شوند. باید مواظب بود که مگسها بیش از حد اتریزه نشوند زیرا این عمل ممکن است در تشخیص خصوصیات آ نها اثر گذاشته ونیز برای

آزمایشهای بعدی غیر قابل استفاده شوند. در مگسهایی که به علت اتریزه کردن بیش از حد کشته شده با شند با لها از بدن فاصله گرفته وزاویه ۴۵ درجه تشکیل می دهند . لذا برای انتقال مگسها به داخل محیط کشت بایستی ظرف کشت را به طور افقی نگه داشت وسپس با استفاده از قلم مو مگسها را در دها نه ظرف در مکانی که مگسها به داخل محیط کشت غلط نخورند انتقال داد وظرف را به همین حا لت برای مدت ۱۵ دقیقه نگه می داریم تا اینکه مگسها از حالت بیهوش خارج شده وبهبود یابند تا بتوانیم ظرف را بطور عمودی نگه داریم . ظرف حاوی مگسها را با نام ونوع آمیزش وتاریخ علامت دار نموده ودر داخل انکوباتور قرار می دهیم.

روشهای نسل گیری مگس سرکه (Methods of breeding drosophila)

مگس سرکه را می توان به فراوانی بر روی میوه های نرم از قبیل انگور موز وگوجه پیدا کرد بخصوص اگر این میو ه ها، کا ملا رسیده ودر حال تخمیر شدن با شند مگسهای بالغ وهمچنین لارو آنها از عصاره میوه تغذیه می کنند وچون در میوه هایی که در حال تخمیر هستند همیشه مخمر نیز وجود دارد. چنین به نظر می رسد که مخمریکی از اجزاء مهم جیره غذایی آنهاست وبه همین علت مگس سرکه را می توان در هر محیط کشتی که در حال تخمیر است رشد داد .

مطالعه ودرک میتوز با اسلایدهای تهیه شده

برای بررسی ودرک میتوز در کلاس عملیات دانشجویان بایستی اسلایدهای میکروسکوپی با کیفیت خوب را مورد مشاهده قرار دهند هنگا میکه دانشجویان به تهیه اسلاید می پردازند باید توجه داشته باشند که چند عدد اسلاید را آماده نمایند. اگر چه کیفیت نمونه اسلاید میتوز در زیر میکروسکوپ نه تنها به کیفیت تهیه بلکه به نوع میکروسکوپ ودقت در تنظیم آن نیز بستگی دارد . بمنظور مشاهده دقیق وواضح کروموزومها در زیر میکروسکوپ باید میکروسکوپ را برای نور مطلوب به صورت ذیل تنظیم نمود:

الف: اسلاید را در زیر میکروسکوپ قرارداده وبا عدسی ۱۰ تنظیم نما ئید.

ب:کند انسور رادر مرکز تنظیم کنید . برای این کار دیافراگم چشمی را روی کندانسور بطرف پایین بسته می شود تا زمانیکه دایره نور در مرکز زمینه سلولهای مورد مشاهده قرار می گیرد.

ج: کندانسور را بالا یا پایین بچر خانید تا زمانیکه لبه های دیافراگم عنبیه به تنظیم دقدیق (focus) برسد. در اینجا منشاء نور فو کوس شده ومیکروسکوپ از نقطه نظر نوری تنظیم است. دیا فراگم عنبیه را مجددا باز نما ئید.

د: عدسی چشمی ۱۰ اکنون برای بررسی منا سب ترین حا لت در مطالعه اسلاید استفاده می شود.

و: عدسی ۴۰ برای مشاهده جزئیات بیشتر وعدسی ۱۰۰ برای مطالعه بسیار دقیق بکار می رود. برای استفاده از عدسی ۱۰۰ باید حتما با کار برد روغن ایمرسیون برای پر نمودن خلاء بین لام وعدسی همراه گردد. تا از دست رفتن نور در هوا مما نعت شود. بدین منظور عدسی ۴۰ را مقداری کنار زده وسپس از چکا نیدن یک قطره روغن بر روی لامل عدسی ۱۰۰ را در مکان اولیه روی لامل قرار می گیرد. لازم است پس از پایان کار عدسی را بوسیله زیلن (xylene) که یک حلال قوی است تمیز گردد.

تذکر : قبل از تهیه اسلاید لام را کاملا تمیز نموده تا عاری از هر گونه غبار ویا اثر انگشت باشد.

آ زمایش مشاهده میتوز

وسایل مورد نیاز:

۱-میکروسکوپ

۲- لام ولامل

۳- محلول استوکارمن

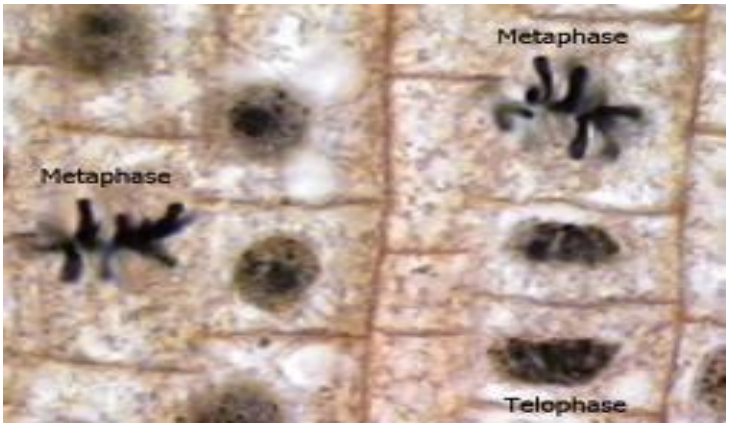
۴- ریشه پیاز

۵- شیشه ساعت

۶- چراغ الکلی وسه پایه

شرح آزمایش

در ریشه پیاز با روش ساده رنگ آمیزی استوکارمن سلولهایی که بوسیله میتوز تقسیم می شوند را می توان در قسمتهای در حال رشد و ففعال یک موجود یافت نمود. اگر چه در گیا هان معمولا از نواحی مریستمی ریشه ها برای مشاهده میتوز استفاده می شود به منظور آموزش میتوز بهترین روش مطالعه نواحی مریستمی در ریشه های گیاهی (نوک ریشه ها) است. نوک ریشه ها را می توان با قرار دادن پیاز بر روی آب نیز تهیه نمود. پیاز (Allium cepa) ماده ایده آلی برای مشاهده میتوز می باشد. زیرا نوک ریشه های این گونه را می توان به فراوانی تولید نموده وبه راحتی رنگ آمیزی نمود . از سلولهای مریستمی ریشه پیاز برای مشاهده تقسیم سلولی میتوز استفاده می کنیم. در این روش پیاز با ریشه های تازه بکار می رود. ریشه های پیاز از نا حیه ای که سلولهای مریتمی قرار دارند انتخاب گردیده وکلاهک را حذف می نما ئیم . سپس این نواحی ریشه ها در داخل شیشه ساعت همراه با کارمن غلیظ استیکی قرار داده سپس با استفاده از چراغ الکلی حرارت می دهیم . حال قطعه ای از ریشه حاوی سلولها را همراه با یک قطره کارمن غلیظ استیکی روی لام گذاشته ولامل را روی آن قرار داده توسط انگشت به لام ولامل فشار وارد نموده به طوری که سلولها بین لام ولامل پخش شوند. آنگاه با قرار دادن لام در زیر میکروسکوپ مراحل مختلف تقسیم سلولی وکروموزوم ها را مورد بررسی و مشاهده قرار میدهیم.



آزمایش منوهیبرید یسم

وسایل مورد نیاز :

۱- **محیط کشت**
۲- **نمونه مگس سرکه**
۳- **قلم مو**
۴- **استر یو میکروسکوپ**

شرح آزمایش:

در آزمایشگاه مگسهای باکره از انوع Ebony – vestigial- sepia در اختیار شما قرار داده می شود. . یکی از موتا سیونها را انجام نموده دو عدد مگس باکره جدا نموده در لوله آزمایش قرار می دهید .در صورتیکه جهت بررسی مگسها نیاز به بیهوش نمودن مگسها باشد این عمل را می توان با قرار دادن پننبه آغشته به اتر به مدت کمتر از یک دقیقه انجام داد. دقت کنید در صورتیکه بیش از حد مگسها در مجاورت اتر باشند از بین خواهند رفت به محض بیهوش شدن مگسها آن را از لوله بیرون آورده بررسی نما ئید . به همین ترتیب دوعدد نر وحشی را انتخاب نموده مجموعا چهار مگس را (دو عدد باکره دو عدد نر) در یک لوله خالی قرار دهید. محیط کشت ها را نیم ساعت قبل از آمیزش از یخچال بیرون آورده جهت از بین رفتن بخار آب وگرم شدن لوله ها در داخل انکوباتورمگسها قرار دهید . سپس مگسهای آماده شده را پس از بهوش آمدن به آرامی در محیط کشت قرار دهید . این کار باید به آرامی صورت گیرد که از چسبیدن مگسها به محیط کشت جلو گیری شود . سپس لوله ها را بر چسب زده نوع آ زمایش تاریخ واسم ومشخصات خود را نوشته وبر اساس ذیل عمل نمائید:

۱- پس از ۷ تا ۸ روز مگسهای والدین را از لوله محیط کشت خارج ساخته تا از آمیزش آنها باF1 جلو گیری شود. در این هنگا م تعداد کافی تخم لقاح شده در داخل محیط کشت موجود میباشد.

۲- حدود ۱۰ روز پس از آمیزش می توان مگسهای F1 را مورد آزمون قرار داد. همه F1 ها در نر وماده غالب می باشند.

۳- چهار جفت مگس F1 (چها رعدد نر وچها رعدد ماده) یا× F_1 F_1 انجام گیرد.

۴-پس از ۷ تا ۸ روز مگس های F_1 را حذف نموده وبمدت ۱۰ روز صبر کنید تا مگس های F_2 ظاهر شوند. مگس های F_2 در طی چند روز تا هنگامیکه تمامی شفیرها خالی شوند جمع آوری وبا شمارش حدود ۲۵۰ مگس از این نسل تعداد هریک از تیپ های مختلف را تعیین کنید.

۵-پس از شمارش دو نوع فنوتیپ F_2 در نرها وماده ها بطور جداگا نه نسبت های حاصله بصورت ۳:۱ خواهد بود. این نسبت را با آزمون کای اسکور مورد آزمون قرار دهید.

آزما یش دی هیبرید یسم

وسایل مورد نیاز:

۵- **محیط کشت**
۶- **نمونه مگس سرکه**
۷- **قلم مو**
۸- **استر یو میکروسکوپ**

شرح آزمایش :

آمیزشی که در آن والدین از لحاظ دو صفت متقابل با یکدیگر تفاوت دارند آمیزش دی هیبرید نا میده می شود . در این آزمایش مراحل آن همانند منو هیبریدیسم می باشد با این تفاوت که د ر اینجا دو ژن مستقل در مگس سرکه را برای نشان دادن تفکیک مستقل ژنها ودر نتیجه صفات حاصل از آنها استفاده می شود .بنا بر این مگسهای با کره از نوع Vestigial (بال تحلیل رفته) با نر وحشی بال طبیعی وبدن زرد وروشن آمیزش داده می شود. در این آمیزش تمامی نرها وماده های F_1 دارای فنوتیپ نوع طبیعی خواهند بود.

پس از آمیزش نرها وماده های F_1 به همان طریقی که در منو هیبرید یسم ذکر گردید نسل F_2 بوجود می آید . سپس با شما رش بیش از ۲۵۰ عدد از مگسهای F_2 تعداد ونوع فنو تیپ را تعیین ونسبت ۹:۳:۳:۱ را با آزمون کای اسکور مورد آزمون قرار دهید.

بررسی کروموزوم بزاقی مگس سرکه

آماده کردن کروموزومهای غدد بزاقی برای مطالعه

یکی از شرایط اصلی ولازم در هر مطالعه کروموزومی آن است که لامها با کیفیت خوب تهیه شده وبوضوح رنگ آمیزی شده باشند نباید انتظار داشت که تهیه کروموزومی بکرات مشاهده شود . کروموزومها با پراکندگی یکنو ا خت به طوری که رشته ها روی هم افتادگی نداشته باشند حتی در آزما یشگا ههایی که این نوع لامها بطور روزانه تهیه می کنند. یک اتفاق نادر بشمار میرود.

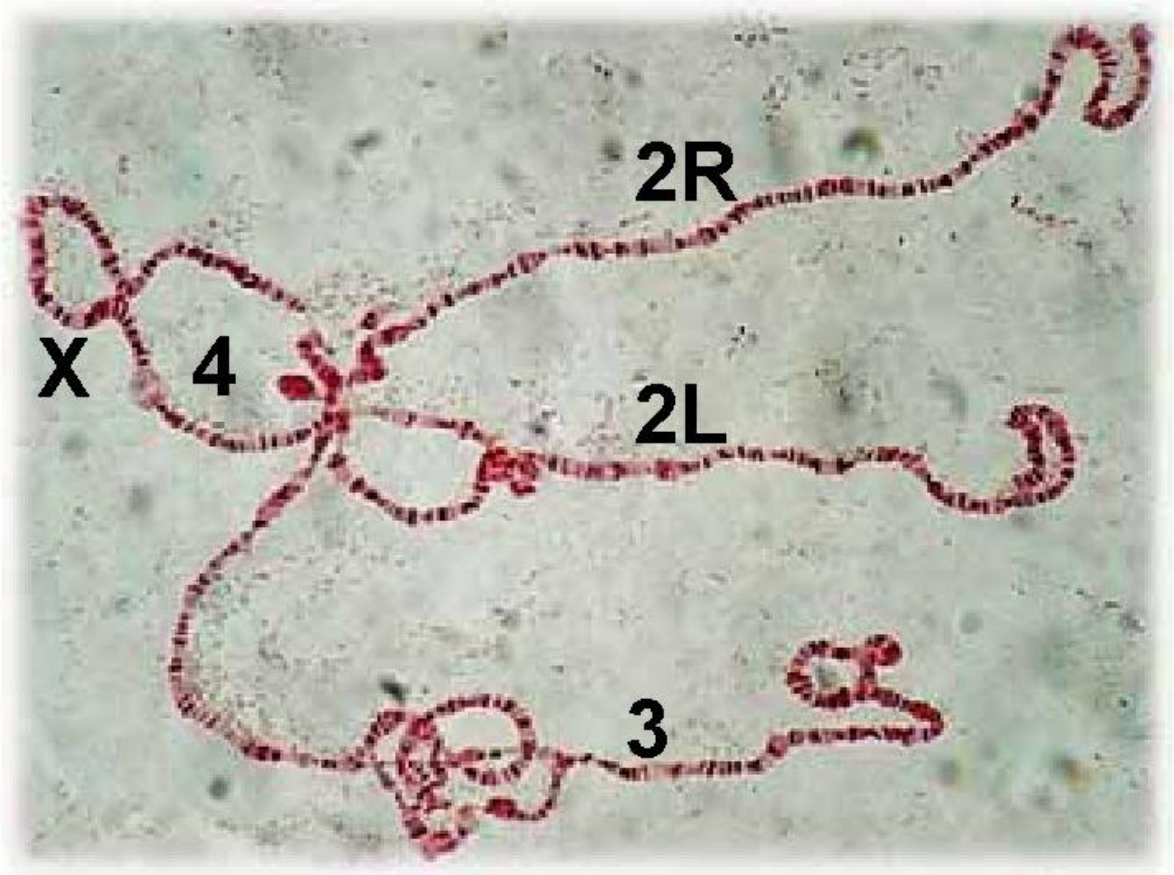
روش تهیه کروموزومهای غدد بزاقی (Tenporary preparations)

وسایل مورد نیاز :

۱- **میکروسکوپ**
۲- **سوزن تشریح**
۳- **لام ولامل**
۴- **سرم فیزیولوژی**
۵- **محلول استوکارمن**

شرح آزمایش :

این روش شامل جداکردن غدد بزاقی از لارو ثابت کردن ورنگ آمیزی آنها در محلول استو کامن یا استیک اور سئین وسپس فشردن آنها در قطره کوچک محلول رنگ بین لام ولامل است برای جدا کردن غدد بزاقی معمولا لارو را در یک محلول نمک یا سرم فیزیولوژی قرار می دهند. برای جدا کردن غدد بزاقی از یک جفت سوزن تشریح استفاده می کنیم ابتداء به کمک یک سوزن لارو را ثابت نگه می داریم سپس سوزن دیگر را مستقیما در پشت منطقه قطعات دهانی قرارداده وبه کمک آن سرا از بدن جدا می کنیم معمولا با انجام این کار غدد بزاقی نیز بصورت چسبیده به سر از بدن خارج می شود. سپس روی آنها کمی محلول رنگ می ریزیم که این عمل یا بر روی لام ویا در داخل سشیشه ساعت انجام میگیرد. غدد بزاقی را نباید گذاشت تا خشک شوند. غدد بزاقی را باید در حدود ۳ دقیقه رنگ آمیزی کرد گر چه تجربه نشان خواهد داد که مدت زمان لازم باید کمتر یا بیشتر با شد .در مرحله بعدی غدد بزاقی را بر روی لامی تمیز که یک قطره کوچک محلول رنگ روی آن است منتقل نموده ویک لامل رآن قرار داده ودر زیر میکروسکوپ بررسی می کنیم.



آزمون کای اسکور (Chi-Square)

به منظور بررسی بدست آمده از آزمایش‌های ژنتیک و مقایسه آن با فرضیه‌های ارائه شده از آزمون کای اسکور استفاده می‌شود.

در این آزمون صفاتی را می‌توان بررسی نمود که در اصطلاح آماری به آن‌ها اعداد قابل شمارش Enmeration Data)) و یا صفات کیفی ((Qualitative Traite می‌گویند. چنین صفاتی را می‌توان به گروه‌های کاملاً مجزا تفکیک نمود. این صفات قابل شمارش بوده و کمتر تحت شرایط محیطی تغییر می‌کنند. برای بررسی این صفات و نحوه انتقال آن‌ها به فرزندان آمیزش‌های کنترل شده بین دو فرد انجام می‌دهند سپس فرزندان آن‌ها را بر اساس فنوتیپی که ظاهر می‌کنند در گروه‌های جداگانه قرار داده و شمارش می‌کنند. تقریباً در تمام موارد تعداد افراد در هر گروه آزمایش با فرضیه آزمایش مطابقت ندارد با استفاده از آزمون X2 مشخص می‌گردد که آیا این تفاوت ناشی از شانس و تصادف است یا اینکه عوامل خارجی (عوامل محیطی یا ژنتیکی) باعث اختلاف موجود شده است. از این روش X2 برای تعیین احتمالی که انحراف بین ارزش مشاهده‌ای و مورد انتظار به لحاظ شانس بوده است را به ما می‌دهد. فرمول برای محاسبه X2 عبارت است از:

$$x^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

در این فرمول $\sum$ علامت جمع، O ارزش مشاهده شده Obzervation، (E) ارزش مورد انتظار Expected.می‌باشد)

به ذکر یک مثال توجه نمایید:X2حال به منظور درک بیشتر، روش محاسبه

و شمارش بیش از ۵۰۰ F2) پس از بدست آوردن Vestigal) و تیپ بال تحلیل رفته (Wildدر یک آزمایش منوهیبریدیسم بین تیپ وحشی (مگس از طریق آزمون کای اسکور نتایج مورد مشاهده و مورد انتظار به شرح زیر بدست آمد:

تعداد مورد مشاهده	تعداد مورد انتظار	فنوتیپ	
۴۷۸/۵	۴۸۵	وحشی	F2
۱۵۹/۵	۱۵۳	بال تحلیل رفته	

$$x^2 = \sum \frac{(ob-ex)^2}{ex}$$

$$x^2 = \frac{(478.5-485)^2}{(485)} + \frac{(159.5-153)^2}{(153)}$$

X^2= 0.09+0.26= 0.35

در مثال ما چون دو گروه فنوتیپی داریم لذا درجه آزادی برابر یک می‌باشد.

df= n-1 ➡ df= 2-1=1

قابل قبول می‌باشد یعنی نتایج در این سطح با نتایج مندل 0.05 نتایج مورد مشاهده و مورد انتظار در سطح X2=0.35با یک درجه آزادی و مطابقت دارد.

مثال ۲

و شمارش بیش از ۴۰۰ عدد F2) پس از بدست آوردن Vg/e) و تیپ وستیجیال ابونی (Wildدر یک آزمایش دی‌هیبریدیسم بین تیپ وحشی (مگس از طریق آزمون کای اسکور نتایج مورد مشابه و مورد انتظار به شرح زیر بدست آمد:

	فنوتیپ	مشاهده شده	مورد انتظار
	وحشی	۲۶۰	۲۵۸/۷۵
F2	بال کوتاه بدون زرد روشن	۸۸	۸۶/۲۵
	بال بلندبدن خاکستری	۹۵	۸۶/۲۵
	بال کوتاه بدن خاکستری	۱۷	۲۷/۲۷۵

$$x^2 = \sum \frac{(ob - ex)^2}{ex}$$

$$x^2 = \frac{(260 - 258.75)^2}{(258.75)} + \frac{(88 - 86.25)^2}{(86.25)} + \frac{(95 - 86.25)^2}{(86.25)} + \frac{(17 - 28.75)^2}{(28.75)}$$

X^2= 0.006+0.035+0.887+4.8=5.72

در مثال ما چون چهار گروه فنوتیپی داریم لذا درجه آزادی برابر ۳ می‌باشد.

df= n-1 ➡ df= 4-1=3 ➡ df= 3

قابل قبول می‌باشد یعنی نتایج در این سطح با نتایج مندل مطابقت 0.01 نتایج مورد مشاهده و مورد انتظار در سطح X2=5.72با سه درجه آزادی و دارد.

جدول توزیع X_2

احتمال

0/01	0/05	0/20	0/30	0/50	0/70	0/80	0/95	0/99	d.f.
6/635	3/841	1/642	1/074	0/455	0/148	0/064	0/004	0/00016	-1
9/210	5/991	3/219	2/408	1/386	0/713	0/446	0/103	0/0201	-2
11/345	7/815	4/642	3/665	2/366	1/424	1/005	0/352	0/115	-3

منابع

دمرک،کافمن ، کارلسون. راهنمای آزمایشهای ژنتیکی وسیتولوژی. ترجمه دکتر ژیرایر کارا پیتان

رازی،احمد.راهنمای آزمایشهای ژنتیک وسیتوژنتیک

تهیه کننده : خیرالله ملکی کارشناس گروه آموزشی مهندسی علوم دامی