دانشگاه کردستان

سیتوژنتیک گیاهی:
مفاهیم پایه و روش‌های آزمایشگاهی

تالیف: **قادر میرزاقادری**
دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کردستان

سرشناسه	:	میرزاقادری، قادر، ۱۳۵۳-
عنوان و نام پدیدآور	:	سیتوژنتیک گیاهی: مفاهیم پایه و روش های آزمایشگاهی/ مولف: قادر میرزاقادری.
مشخصات نشر	:	سنندج، دانشگاه کردستان، ۱۳۹۵.
مشخصات ظاهری	:	۱۷۵ ص.: مصور، جدول، ۲۲ × ۲۹ س م.
شابک	:	۹۷۸-۹۶۴-۲۷۹۷-۷۸-۳
وضعیت	:	فیپا
فهرست‌نویسی	:	کتابنامه.
یادداشت	:	گیاهان – یاخته شناسی ژنتیک
موضوع	:	Plant Cytogenetics
موضوع	:	QK۹۸۱/۳۵/م۹س۹ ۱۳۹۵
رده‌بندی کنگره	:	۵۷۲/۸
رده‌بندی دیویی	:	۴۲۸۵۲۷۰
شماره کتابشناسی ملی		

انتشارات دانشگاه کردستان

نام کتاب: سیتوژنتیک گیاهی: مفاهیم پایه و روش های آزمایشگاهی

مؤلف: قادر میرزاقادری

چاپ اول

ناشر: دانشگاه کردستان

تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

قطع: رحلی

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

۱ تقسیم سلول ها ۱

۱-۱ مراحل چرخه سلولی ۲
۱-۲ کروموزوم‌ها در خلال میتوز همانندسازی و تقسیم می شوند ۲
۱-۲-۲ ایجاد رشته های دوکی ۵
۱-۲-۳ صفحه تقسیم سلولی، نوع و شکل سلول ها را کنترل می کند ۶
۱-۲-۴ کنترل چرخه سلولی ۷
۱-۳ تقسیم میوز ۹
۱-۳-۱ مراحل تقسیم میوز ۱۰
۱-۳-۲ میوز II ۱۳
۱-۴ جفت شدن کروموزوم ها و کمپلکس سیناپتونمال ۱۴
۱-۵ مکانیسم کراسینگاور و نوترکیبی ۱۵
۱-۵-۲ تغییر ژن ۱۵
۱-۶ تولید مثل جنسی در نهاندانگان ۱۶
۱-۶-۲ گامت های کاهش نیافته ۱۸
۱-۷ آپومیکسی ۲۰

۲ کروموزوم و کاریوتیپ ۲۳

۲-۱ شکل کروموزوم ها ۲۳
۲-۲ سانترومر ۲۴
۲-۳ توالی های تلومری ۲۵
۲-۴ نواحی سازمان دهنده هستکی ۲۵
۲-۴-۲ غالبیت هستکی ۲۷
۲-۵ کروماتین ۲۸
۲-۵-۱ هتروکروماتین و یوکروماتین ۲۸
۲-۵-۲ ویژگی های اپی ژنتیکی DNA و نوکلئوزوم ها در هتروکروماتین ۲۹
۲-۵-۳ متیلاسیون DNA ۳۰
۲-۶ کاریوتیپ ۳۰
۲-۷ تقارن کاریوتیپ ۳۲
۲-۸ شاخص های کروموزومی و کاریوتیپی ۳۳
۲-۸-۱ دسته بندی رومرو-زارکو ۳۳
۲-۸-۲ دسته بندی استبینز ۳۳
۲-۹ استفاده از نرم افزار برای مطالعه کاریوتیپ ۳۴

۳ تغییر در تعداد و ساختار کروموزوم ها ۳۷

۳-۲ پلی پلوییدی ۳۸
۳-۳ اتوپلی پلویید و آلوپلی پلویید ۳۸
۳-۴ برخی اصطلاحات اساسی در پلی پلوییدی: اُرتولوگ، پارالوگ و هومیولوگ ۳۹
۳-۵ القای پلی پلوییدی در سلول های سوماتیکی ۴۰
۳-۶ مثال هایی از گیاهان پلی پلویید ۴۱
۳-۶-۱ جنس براسیکا ۴۱
۳-۶-۲ گندم ۴۲
۳-۷ تعداد کروموزوم ها: x، N و $2N$ ۴۳
۳-۸ آنیوپلوییدی ۴۴
۳-۸-۱ انواع آنیوپلویید ها ۴۴
۳-۸-۲ تکرار ۴۶
۳-۸-۳ وارونگی ۴۶
۳-۸-۴ حذف ها ۴۸
۳-۸-۵ جابجایی ۴۸
۳-۹ تنوع در اندازه و تعداد کروموزوم ها ۵۱
۳-۱۰ کروموزوم های B ۵۲
۳-۱۱ دیزپلوییدی ۵۳
۳-۱۲ کروموزوم های هلوسنتریک ۵۳

٤ تعیین جنسیت و کروموزوم های جنسی ۵۶

۴-۱-۱ سیستم تعیین جنسیت XX-XO ۵۶
۴-۱-۲ سیستم تعیین جنسیت XX-XY ۵۷
۴-۱-۳ سیستم تعیین جنسیت ZZ-ZW ۵۷
۴-۱-۴ تعیین جنسیت ژنتیکی ۵۷
۴-۱-۵ تعیین جنسیت محیطی ۵۷
۴-۱-۶ تعیین جنسیت در مگس سرکه ۵۸
۴-۱-۷ تعیین جنسیت در انسان ۵۸
۴-۱-۸ سیستم هاپلوییدی-دیپلوییدی ۵۹
۴-۱-۹ کروموزوم های جنسی در گیاهان ۵۹
۴-۱-۱۰ جبران مقدار DNA فعال ۶۰
۴-۱-۱۱ وجود بیش از دو کروموزوم جنسی ۶۱

۵ ایمنی و اصول کار در آزمایشگاه سیتوژنتیک ۶۲

۵-۱ آب و محلول ها ۶۳
۵-۲ غلظت محلول ۶۳
۵-۳ تجهیزات مورد نیاز ۶۴
۵-۳-۱ ملاحظات آزمایشگاهی ۶۵

٦ کار با میکروسکوپ ٦٦

۶-۱ ساختار میکروسکوپ نوری ۶۶
۶-۱-۲ تنظیم نور و شفافیت میکروسکوپ ۶۷
۶-۲ کالیبراسیون میکروسکوپ و اندازه گیری ۶۸
۶-۳ مقیاس ۶۹
۶-۴ قدرت تفکیک میکروسکوپ ۶۹
۶-۵ نکاتی درمورد مراقبت از میکروسکوپ ۷۰

۷ تهیه لام های کروموزومی ۷۱

۷-۱ تهیه لام های تمیز به کمک اسید ۷۱
۷-۲ تهیه ریشه ها ۷۱
۷-۲-۱ ضد عفونی بذر ۷۱
۷-۲-۲ کاشت بذر ۷۲
۷-۲-۳ همزمان سازی ۷۲
۷-۲-۴ پیش تیمار ریشه ها ۷۳
۷-۲-۵ تثبیت نمونه ها ۷۵
۷-۲-۶ تثبیت نمونه های میوزی ۷۶
۷-۳ رنگ آمیزی مواد تثبیت شده ۷۷
۷-۳-۱ نرم کردن بافت ۷۷
۷-۳-۲ رنگ آمیزی مواد ژنتیکی ۷۸
۷-۳-۳ له کردن نمونهها ۷۹
۷-۳-۴ تهیه لام از نمونه های میتوزی به روش چکاندن ۸۲
۷-۳-۵ تهیه لام از نمونه های میوزی به روش پخش کروموزومی ۸۳
۷-۳-۶ تهیه لام کروموزومی از کالوس ۸۴
۷-۳-۷ حذف لامل ۸۴
۷-۳-۸ دائمی کردن لام ۸۵
۷-۴ بررسی کارایی دانه گرده ۸۶
۷-۴-۱ رنگ آمیزی دانه گرده با محلول لوگل ۸۶
۷-۴-۲ رنگ آمیزی دانه گرده فعال با محلول الکساندر ۸۷
۷-۴-۳ محیط کشت جامد برای جوانه زنی دانه گرده سویا ۸۸
۷-۴-۴ محیط کشت برای دانه گرده آرابیدوپسیس ۸۹
۷-۴-۵ محیط کشت جامد برای کشت دانه گرده گندم ۸۹
۷-۵ مشاهده رشد لوله گرده در خامه ۹۰
۷-۶ مطالعه گامتوژنز ماده به روش شفاف سازی ۹۰

۸ نواربندی کروموزوم ها ۹۲

۸-۱ نواربندی C (روش اول) ۹۲

۸-۱-۱ تهیه لام ها از مریستم نوک ریشه ۹۲
۸-۱-۲ مراحل نواربندی C ۹۲
۸-۲ نواربندی C (روش دوم) ۹۳
۸-۳ نواربندی C (روش سوم) ۹۵
۸-۴ نواربندی N ۹۶
۸-۵ نواربندی C تغییر یافته ۹۷
۸-۶ نواربندی AG-NOR ۹۷
۸-۷ نواربندی با رنگ فلوروسنت دپی ۹۸
۸-۸ نوابندی G ۹۹
۸-۹ تبادل کروماتید های خواهری ۹۹

۹ هیبریداسیون فلوروسنت در محل (فیش): اصول و کاربرد ها ۱۰۱

۹-۲ مثال هایی از کاربرد فیش ۱۰۲
۹-۳ اساس مشاهده میکروسکوپی یک فلوروفور ۱۰۴
۹-۴ هیبریداسیون DNA ژنومی در محل (گیش) ۱۰۶
۹-۵ فیش چند رنگ ۱۰۶
۹-۶ شدت ۱۰۷
۹-۶-۱ انتخاب میزان شدت ۱۰۷
۹-۶-۲ عوامل موثر بر شدت ۱۰۷
۹-۶-۳ محاسبه شدت ۱۰۹

۱۰ کاوشگر ۱۱۱

۱۰-۲ منابع مورد استفاده به عنوان کاوشگر ۱۱۲
۱۰-۲-۱ توالی های کلون شده ۱۱۲
۱۰-۲-۲ توالی های تکثیر شده با PCR ۱۱۳
۱۰-۲-۳ الیگونوکلئوتید ها ۱۱۳
۱۰-۲-۴ DNA ژنومی ۱۱۴
۱۰-۲-۵ تخلیص DNA ژنومی ۱۱۶
۱۰-۲-۶ خرد کردن DNA ۱۱۶
۱۰-۳ تفسیر نتایج الکتروفورز DNA در ژل آگارز ۱۱۷
۱۰-۴ روش های نشاندار کردن DNA ۱۱۷
۱۰-۴-۱ روش شکاف-ترجمه ۱۱۸
۱۰-۴-۲ روش فتولیبلینگ ۱۲۰
۱۰-۴-۳ راندُم پرایمنگ ۱۲۰
۱۰-۴-۴ روش نشاندار کردن انتهایی ۱۲۱
۱۰-۴-۵ روش PCR ۱۲۱
۱۰-۵ تخلیص کاوشگر نشاندار شده ۱۲۱
۱۰-۶ ارزیابی کاوشگر ۱۲۲

۱۰-۷ بررسی اندازه قطعات کاوشگر ۱۲۳
۱۰-۸ مسدود کردن توالی های تکراری مشترک ۱۲۴
۱۰-۹ رنگ آمیزی زمینه ۱۲۴

۱۱ هیبریداسیون و تشخیص ۱۲۶

۱۱-۱ تهیه لام ها برای فیش ۱۲۶
۱۱-۱-۲ نفوذ کاوشگر به توالی های هدف ۱۲۷
۱۱-۲ تیمار لام ها ۱۲۷
۱۱-۲-۱ مراحل تیمار لام ها ۱۲۷
۱۱-۳ محلول هیبریداسیون ۱۲۸
۱۱-۴ مراحل هیبریداسیون ۱۲۹
۱۱-۵ شستشو و ظهور ۱۲۹
۱۱-۵-۱ تشدید سیگنال ۱۳۰
۱۱-۵-۲ مشاهده لام ها ۱۳۰
۱۱-۶ روش فیش مستقیم ۱۳۱
۱۱-۶-۱ تهیه لام ها ۱۳۱
۱۱-۶-۲ تیمار لام ها ۱۳۱
۱۱-۶-۳ محلول هیبریداسیون ۱۳۲
۱۱-۶-۴ مراحل هیبریداسیون ۱۳۲
۱۱-۶-۵ شستشو ۱۳۳
۱۱-۶-۶ مشاهده لام ها ۱۳۳
۱۱-۷ اعمال مجدد کاوشگر به لام های فیش (REPROBING) ۱۳۳
۱۱-۸ فیش در زمان کوتاه (IQ-FISH) ۱۳۳
۱۱-۸-۱ مراحل هیبریداسیون ۱۳۴
۱۱-۸-۲ شستشو و مشاهده ی لام ها ۱۳۴

۱۲ فلوسایتومتری ۱۳۵

۱۲-۱ جداسازی هسته ها ۱۳۶
۱۲-۲ آیا نمونه های گیاهی تثبیت شده مناسب هستند؟ ۱۳۶
۱۲-۳ رنگ آمیزی DNA هسته ۱۳۶
۱۲-۴ تفسیر اندازه‌گیری ها ۱۳۷
۱۲-۵ اصطلاحات مشخص برای مقایسه نتایج ۱۳۷
۱۲-۶ موانع فلوسایتومتری ۱۳۸
۱۲-۷ محلول های عمومی مورد نیاز ۱۳۸
۱۲-۸ روش اول انجام فلوسایتومتری ۱۳۸
۱۲-۸-۱ مراحل ۱۳۹
۱۲-۹ روش دوم انجام فلوسایتومتری ۱۳۹
۱۲-۹-۱ محلول های مورد نیاز ۱۳۹

۱۲-۹-۲ مراحل ۱۳۹
۱۲-۱۰ نتایج ممکن ۱۴۲

۱۳ تلاقی های دور و نجات جنین ۱۴۷

۱۳-۱ مقدمه ۱۴۷
۱۳-۲ ترکیب محیط کشت ۱۴۸
۱۳-۲-۲ مراحل ۱۴۸

۱۴ کروموزوم های پلیتن (مطالعه موردی مگس سرکه) ۱۵۱

۱۴-۱ مقدمه ۱۵۱
۱۴-۲ چرخه زندگی مگس سرکه ۱۵۱
۱۴-۲-۱ کشت و جابجا کردن مگس سرکه ۱۵۲
۱۴-۳ کروموزوم های متافازی میتوزی ۱۵۳
۱۴-۴ کروموزوم های پلیتن ۱۵۴
۱۴-۵ مشاهده کروموزومهای پلیتن ۱۵۶

۱۵ رنگ آمیزی ایمنی ۱۵۸

۱۵-۲ تهیه لام ۱۵۹
۱۵-۲-۱ شناسایی پرچم های مناسب ۱۵۹
۱۵-۲-۲ تثبیت ۱۵۹
۱۵-۲-۳ هضم آنزیمی ۱۵۹
۱۵-۳ له کردن ۱۵۹
۱۵-۴ پساتثبیت ۱۶۰
۱۵-۵ مراحل رنگ آمیزی ۱۶۰

۱۶ محلول ها ۱۶۱

۱۶-۱ روش تهیه بافر سیترات 10X ۱۶۱
۱۶-۲ DNA ماهی سالمون ۱۶۱
۱۶-۳ محلول دکستران سولفات (DS20) ۱۶۱
۱۶-۴ بافر هیبریداسیون (HB50) ۱۶۱
۱۶-۵ بافر فسفات سدیم (فسفات سورنسون) ۱۶۲
۱۶-۶ پپسین ۱۶۲
۱۶-۷ محلول PBS ×۱۰ ..... ۱۶۲
۱۶-۸ محلول پارافرمالدهید ۱۶۲
۱۶-۹ محلول آنتی‌فید محتوی پروپیدیم یدید یا دپی ۱۶۳
۱۶-۱۰ محلول تریس M ۱ ..... ۱۶۳
۱۶-۱۱ فرمامید ۹۹/۵٪ (v/v) ۱۶۳

۱۲-۱۲ محلول مسدود کننده ۱۶۳
۱۳-۱۳ باقر شوینده ۱۶۳
۱۴-۱۴ محلول TBST ۱۶۴
۱۵-۱۵ DNA ماهی سالمون ۱۶۴
۱۶-۱۶ دکستران سولفات ۵۰٪ ۱۶۴
۱۷-۱۷ باقر TE ×۱ ..... ۱۶۴
۱۸-۱۸ محلول R40 ..... ۱۶۴
۱۹-۱۹ محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل ۱۶۴
۲۰-۲۰ باقر شکاف-ترجمه ×۱۰، PH ۷/۵ ..... ۱۶۴
۲۱-۲۱ باقر CTAB برای استخراج DNA ۱۶۵
۲۲-۲۲ باقر استخراج سارکوسیل ۱۶۵
۲۳-۲۳ محلول CASEIN ×۱ ..... ۱۶۵
۲۴-۲۴ محلول پایه گیمسا ۱۶۵
۲۵-۲۵ محلول رنگ آمیزی گیمسا ۱۶۵
۲۶-۲۶ محلول اسید کلریدریک ۰/۲ N ۱۶۶
۲۷-۲۷ محلول هیدروکسید باریم اشباع شده ۱۶۶
۲۸-۲۸ محلول SSC ×۲ ..... ۱۶۶
۲۹-۲۹ محلول MTSB ×۱۰ ..... ۱۶۶
۳۰-۳۰ محلول پارافرمالدهید ۴٪ برای رنگ آمیزی ایمنی ۱۶۶

منابع ۱۶۷

واژه نامه ۱۷۱

پیش گفتار

با توجه به اهمیت علم سیتوژنتیک در مطالعات تاکسونومی، ژنومی و مولکولی گیاهی و نبود منابع فارسی به روز در رابطه با سیتوژنتیک اینجانب بر آن شدم تا مطالبی با تکیه بر تجربیات و کارهای عملی خود تدوین کنم. بدین ترتیب کتاب حاضر را با نگرشی کاربردی در رابطه با سیتوژنتیک برای استفاده دانشجویان رشته‌های ژنتیک، بیوتکنولوژی و زیست شناسی به ویژه در زمینه گیاهی تهیه نمودم. این کتاب در دو بخش عمده تهیه شده است. بخش اول که شامل فصل های اول تا چهارم است، به توضیح مفاهیم پایه در رابطه با سیتوژنتیک و به ویژه سیتوژنتیک گیاهی می پردازد. در بخش دوم که فصل های پنجم تا شانزدهم را شامل می شود، روش های آزمایشگاهی سیتوژنتیک گیاهی با بهره گیری از تصاویر مناسب توضیح داده شده است. اغلب پروتوکل های ارائه شده در این بخش توسط اینجانب و یا دانشجویانم بهینه شده و بارها با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. سعی شده است در پروتوکل ها نکته جزئیات مورد نیاز برای انجام موفقیت آمیز آزمایشات قید گردد. از آنجا که امروزه بخش عمده ای از تحقیقات سیتوژنتیکی بر پایه روش های مولکولی همچون هیبریداسیون فلوروسانس درجا (فیش) استوار است، بخش عمده ای از پروتوکل های موجود در این کتاب به روش های مختلف فیش اختصاص داده شده است.

در اینجا بر خود لازم می دانم از همه کسانی که در راستای تالیف این کتاب مشوق بنده بوده اند تشکر و قدردانی کنم. به ویژه از آقای داریوش عبادی الماس (دانشجوی دکتری در گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه گرگان) که در تهیه برخی مطالب برای فصل فلوسایتومتری به اینجانب کمک کردند کمال تشکر را دارم. همچنین از داوران محترم که با نظرات ارزنده خود موجبات ارتقای هر چه بیشتر این کتاب را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می کنم. از آنجا که هیچ اثری بدون کاستی نیست، اینجانب هر گونه نظر اصلاحی خوانندگان را با اشتیاق پذیرا خواهم بود. امید است که کتاب حاضر مورد استفاده دانشجویان و محققین محترم واقع گردد.

قادر میرزاقادری

تاریخ ۹۵/۵/۱