

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»

Костенко В.В., Баранова Н.Б, Медведева Е.С., Хамидуллина Р.Г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ ПО ГЕНЕТИКЕ

Учебно-методическое пособие

Казань – 2020

УДК 575:57.011
ББК 28.04

*Печатается по решению учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ*

Составители:

к.б.н. Костенко В.В., к.б.н., Баранова Н.Б., к.б.н. Медведева Е.С.,
к.б.н. Хамидуллина Р.Г.

Рецензенты:

к.б.н., с.н.с. КИББ ФИЦ РАН **Акулов А.Н.**
к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных ИФМиБ К(П)ФУ
Еремеев А.А.

Костенко В.В.

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по генетике:
учебно-методическое пособие / В.В. Костенко, Н.Б. Баранова, Е.С. Медведева,
Р.Г. Хамидуллина.-Казань: Изд-во “Оперативная типография Капринт”, 2020.-
64 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов-биологов, проходящих обучение по программам подготовки бакалавриата и магистратуры на кафедре генетики. Данное пособие состоит из двух разделов: теоретического, которое знакомит студентов с особенностями биологии, цитологии и генетики дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) – классического модельного организма, используемого в биомедицинских исследованиях и практического, которое демонстрирует закономерности наследования различных морфологических признаков. Обучающийся должен на опыте убедиться в том, что генетика основывается на строгих законах, позволяющих предвидеть то или иное явление и точно рассчитать его количественные закономерности. Выполнение лабораторных работ по генетике дрозофилы в дополнение к лекционному курсу способствует пониманию значения генетики для биологии в целом.

УДК 575:57.011
ББК 28.04

©Костенко В.В., Баранова Н.Б.,

Медведева Е.С., Хамидуллина Р.Г., 2020

СОДЕРЖАНИЕ

История открытий на <i>Drosophila</i>	5
Современные молекулярно-генетические исследования с использованием модельного организма <i>Drosophila</i>	7
Систематика рода <i>Drosophila</i>	8
Морфология и биология <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Особенности строения и функционирования хромосом дрозофилы	17
Механизмы определения пола у дрозофилы	21
Генетическая символика, используемая при работе с дрозофилой	26
Культивирование и правила работы с дрозофилой в лаборатории	29
ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	
Лабораторная работа № 1: Моногибридное скрещивание	32
Лабораторная работа № 2: Дигибридное скрещивание	34
Лабораторная работа № 3: Наследование признаков, сцепленных с полом	35
Лабораторная работа № 4: Сцепленное наследование и кроссинговер	37
Лабораторная работа № 5: Особенности эмбрионального развития дрозофилы. Метод определения доминантных летальных мутаций	40
Лабораторная работа № 6: Гибридологический анализ определения группы сцепления гена	42
Пример оформления отчета по лабораторным работам	45
Список рекомендуемой литературы	57
Электронные ресурсы	58
Приложение 1	59
Приложение 2	62

История открытий на *Drosophila*

Drosophila melanogaster уже более ста лет является ключевым модельным объектом в экспериментальной генетике и медицине. Исследования, проведенные на дрозофиле, позволили определить природу гена, механизм генетического сцепления, процессы мутагенеза и рекомбинации, генетической нестабильности и эволюционных процессов в популяциях.

Дрозофила была введена в генетическую практику в начале XX века, когда Томас Хант Морган (рис. 1) в своих пионерских экспериментах обнаружил мутацию *white* (1910). В своей работе он показал локализацию конкретного гена на хромосоме. Это позволило уже говорить о более конкретных «генах» В. Л. Иогансена, а не об абстрактных наследственных задатках Г. Менделя.

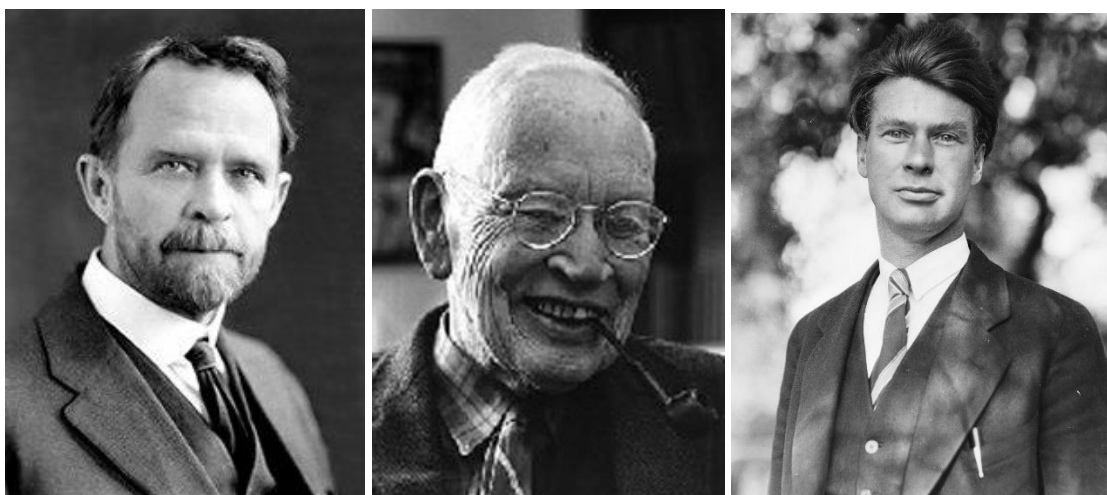


Рисунок 1 – Т. Х. Морган, А. Г. Стертевант и К. Бриджес

В 1913 году Стертевант А. Г. (рис. 1) построил линейную генетическую карту, обнаруженных к этому времени мутаций. Также А. Г. Стертевант в 1920 году обнаружил явление супрессии, а спустя пять лет в 1925 году им был открыт эффект положения гена. Через год ему удалось показать влияние хромосомных инверсий на прохождение кроссинговера.

В 1916 году ученик Томаса Моргана, Келвин Бриджес (рис. 1), представил цитологические доказательства не расхождения двух X-хромосом у белоглазых

самок дрозофилы во время мейоза. В своих последующих работах ученым было выявлено, что это явление также характерно и для 4 хромосомы.

Таким образом, в своих первых пионерских работах Т. Морган, А. Стертевант и К. Бриджес заложили основы классической генетики.

Открытия на дрозофиле, удостоившиеся Нобелевской премии

1933: Томас Хант Морган – Роль, которую играют хромосомы в наследственности

1946: Герман Джозеф Мюллер – Получение мутаций с помощью рентгеновского излучения

1995: Эдвард Б. Льюис, Кристиан Нюссляйн-Волхард, Эрик Ф. Вишаус - Генетический контроль раннего эмбрионального развития

2004: Ричард Аксель – Рецепторы запаха и организация обонятельной системы

2011: Жюль А. Хоффманн – Активация врожденного иммунитета

2017: Джеффри Холл, Майкл Росбаш, Майкл У. Янг – Молекулярные механизмы, контролирующие циркадный ритм

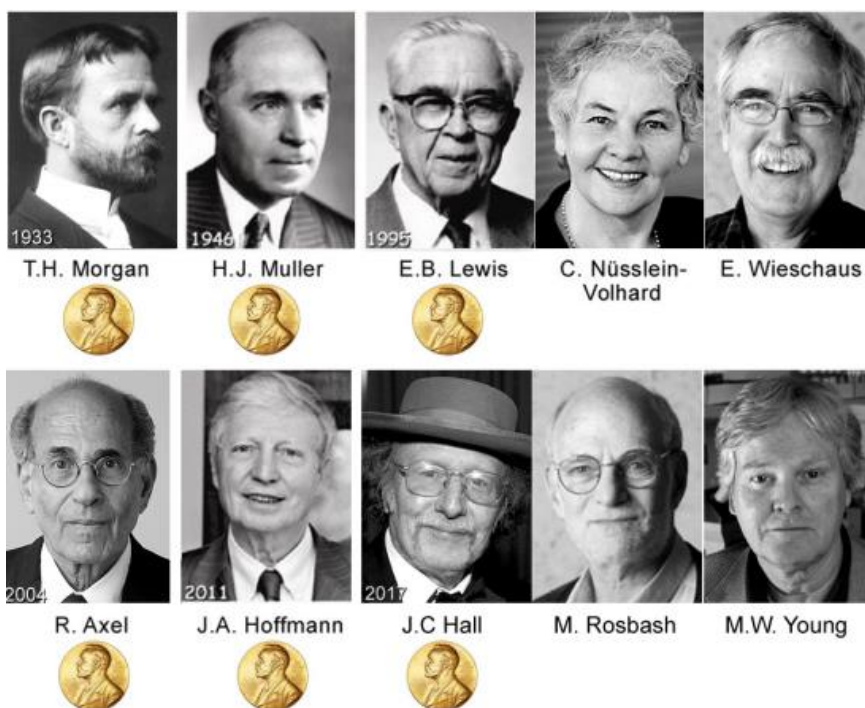


Рисунок 2 – Нобелевские лауреаты в области физиологии и медицины, сделавшие свои открытия на модельном объекте дрозофиле

Современные молекулярно-генетические исследования с использованием модельного организма *Drosophila*

Можно выделить следующие приоритетные направления в исследованиях, проводимых на дрозофиле. Некоторые из направлений, успешно развиваемых в последнее десятилетие, согласно базе данных FlyBase:

1) Завершены секвенирование генома *D. melanogaster* при упорядочивании локализации некоторых высоко повторенных последовательностей в эухроматине; сборка теломерных последовательностей на хромосоме 4 и X-хромосоме. Достигнут прогресс в завершении секвенирования и сборки умеренно повторенного фрагмента гетерохроматина размером 15 Мб. Существенно обновлена генная аннотация *D. melanogaster*;

2) Оказались полезными для понимания организации и эволюции гена и генома short gun-метод секвенирования геномных последовательностей и их дальнейшая сборка, выравнивание и аннотация эухроматиновых последовательностей у 11 видов рода *Drosophila*: *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. anassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis* и *D. grimshawi*;

3) Расширена библиотека полных кДНК и их производных, включая библиотеку клонов открытых рамок считывания в рекомбинантных векторах. В десятки раз увеличено число линий культур клеток дрозофилы, доступных для изучения. Продолжено успешное изучение РНК-интерференции (iRNA) в культурах клеток. Развитие iRNA-технологий в культурах клеток и на целом организме, в том числе расширение библиотеки для тканеспецифичной *in vivo* iRNA почти для всех генов дрозофилы;

4) Создана коллекция хромосомных делеций, практически полностью перекрывающих геном; картированы тонкие подразделения генома, ограниченные точками разрывов. Налажено производство и распределение белковых ловушек на GFP-основе и энхансерных ловушек в 900 генах;

5) Получило развитие ϕ C31 интеграз-опосредованное сайт-специфическое встраивание трансгенов для минимизации эффекта положения и надежности интегрирования ДНК в геном. Созданы геномные библиотеки для ϕ C31 интеграз-опосредованного сайт-специфического встраивания больших фрагментов ДНК, позволяющие выделить почти любую мутацию у дрозофилы. Создание транскрипционного профиля полного жизненного цикла и многих типов тканей дрозофилы. Достигнут прогресс в получении полногеномных матричных массивов и платформ для секвенирования нового поколения, создания тотального транскрипционного профиля и картирования белковых сайтов связывания в геноме с помощью чипов.

Прогресс в исследованиях поддерживается постоянным усовершенствованием генетических методов, таких как направленный мутагенез генов и возможности интеграции больших фрагментов ДНК в геном дрозофилы.

Систематика рода *Drosophila*

Род *Drosophila* относится к семейству *Drosophilidae* отряда *Diptera*. Мухи этого семейства обычно мелких или средних размеров. На сегодняшний день найдено и описано около 1529 видов, относящихся к роду *Drosophila*.

Тип – Членистоногие – *Arthropoda*

Класс – Насекомые – *Insecta*

Отряд – Двукрылые – *Diptera*

Семейство – Дрозофилиные – *Drosophilidae*

Род – *Drosophila*

Вид – *Drosophila melanogaster*.

Мухи рода *Drosophila* распространены повсеместно, и многие виды являются синантропными (например, *D.melanogaster*, *D.funnebris*, *D.virilis*) и в основном проживают в тропической и субтропической зоне.

Чтобы отнести муху к тому или иному виду дрозофил можно прибегнуть к анализу таких различий как: морфо-физиологические, поведенческие, цитологические, генетические.

Обычно исследования отличительных морфологических признаков является достаточным для определения двух форм как отдельных видов. Например, одна из групп гавайских дрозофил была сформирована на основании изучения по строению наружных половых органов самцов. Позднее, когда обнаруживались и самки данного вида, с помощью анализа хромосом и исследования репродуктивной изоляции, подтвердилась правильность ранее определенных взаимоотношений между морфологически отличными группами видов.

Помимо морфологических отличий между видами обнаруживаются и различия в поведении. У дрозофил наиболее подробно изучено половое поведение. В поведении самцов и самок разных видов можно выделить определенные общие элементы, используемые ими в процессе ухаживания в строго определенной последовательности. Однако для каждого вида этот процесс строго специфичен за счет количественных отличий одного или нескольких составных компонентов, различий в наборе этих элементов или качественных изменений этих элементов. Сравнительное изучение типов полового поведения показывает, что оно довольно хорошо отражает степень дивергенции этих видов.

Изучение метафазных хромосомных у различных видов дрозофилы показало, что виды могут отличаться друг от друга по величине и числу хромосом.

Обозначение элемента Мюллера – это обозначение, используемое для стандартизации названий хромосомных плеч у разных видов дрозофилы. Начиная с конца 1930-х годов, А. Стертевант и Е. Новицкий использовали сравнительные исследования генетического картирования у различных видов дрозофилы, чтобы показать, что хромосомные плечи этих видов имели сходное содержание генов, и предположили, что гены были синтеническими.

Большое значение в изменении морфологии и числе плеч хромосом имеют добавления гетерохроматиновых участков и перцентрические инверсии. Однако наиболее значительны и широко распространены межвидовые различия по порядкам генов в хромосомах, обусловленные хромосомными мутациями.

Сравнительное изучение хромосом показывает, что дифференциация вида на расы, полувиды сопровождается фиксацией специфических инверсий. При формировании нового вида эти различия хромосом часто становятся более значительными, по мере расхождения видов инверсионные межвидовые различия увеличиваются еще больше. Эта тенденция особенно наглядно проявляется при сравнении большого числа видов, относящихся к одной подгруппе или группе.

На рисунке 3 приведены синтенические связи между плечами хромосом 12 секвенированных геномов представителей рода *Drosophila*, а также приведены их филогенетические отношения согласно стандартной хромосомной нумерации.

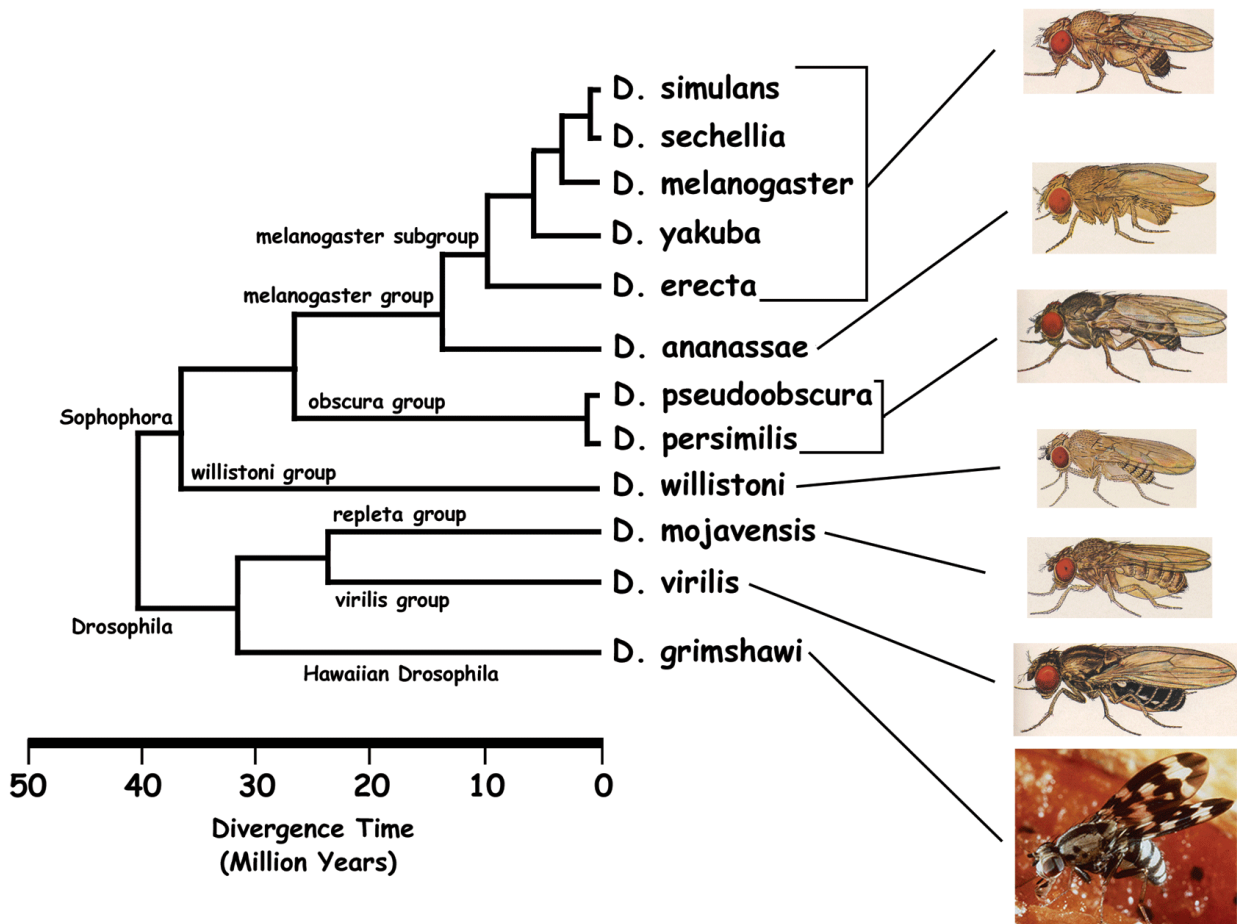


Рисунок – 3. Филогенетическое дерево представителей рода *Drosophila*

Морфология и биология *Drosophila melanogaster*

Весь жизненный цикл длится примерно 10 дней при 25°C (рис. 4). Мухи завершают эмбриональное развитие в виде яиц перед тем, как вылупиться личинками первого возраста. Личинки питаются, растут и линяют в течение трех этапов до момента окукливания. Мухи подвергаются метаморфозу во время стадии куколки, в процессе которой формируются взрослые структуры. По завершении метаморфоза из куколки появляются взрослые мухи – имаго.

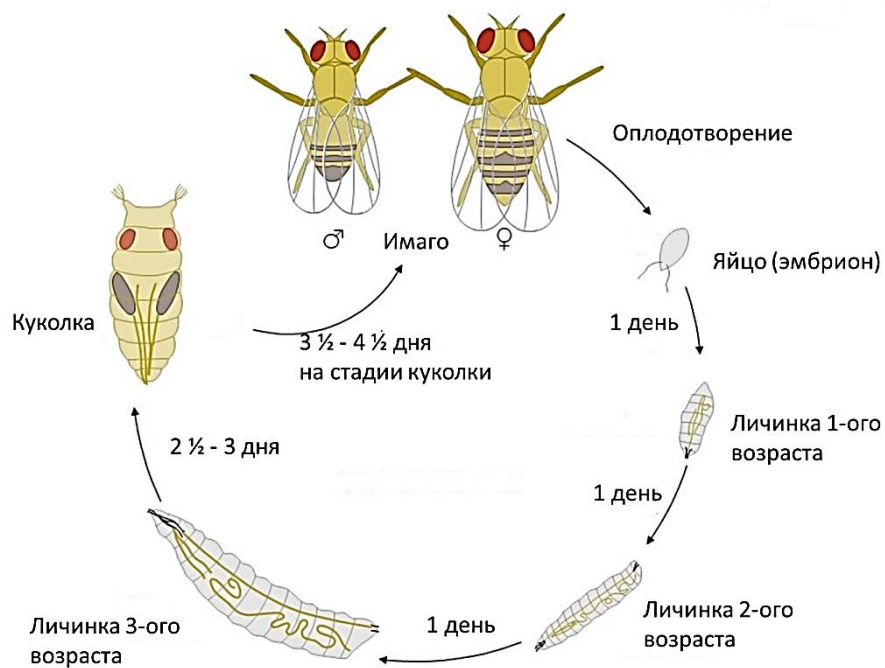


Рисунок 4 – Жизненный цикл *Drosophila melanogaster*.

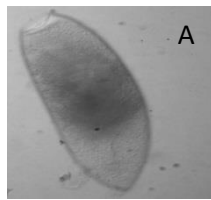
Эмбрион развивается в течение 24 часов. В первые пять часов на поверхности яйца находится тонкий слой – периплазма, который окружает гранулярную желточную массу. В первые часы эмбриогенеза яйцо однородно по плотности. Однако специфическое окрашивание позволяет выявить в полярной цитоплазме яйца накопление в задней его области полярных гранул РНК. Синхронное дробление яйца начинается приблизительно на расстоянии $1/3$ от переднего конца. Деление ядер происходит каждые 10 минут, при этом эмбрион сокращается, а в желточной оболочке формируются пространства переднего и заднего полюса. После 8-го ядерного деления ядра начинают мигрировать на поверхность яйца, а его периферия становится гранулярной. Количество клеток в полюсах около 3-7, при этом они продолжают делиться. Вокруг ядер начинают формироваться мембраны – стадия синцитиальной бластодермы. Полное формирование клеточных мембран – стадия клеточной бластодермы (3-3 $_{1/2}$ ч). При этом поверхностные клетки бороздки образуют эктодерму, а внутренние клетки – мезодерму и энтодерму. На заднем конце клетки формируют дорзальную пластину, к которой прикрепляются полюсные

клетки, цефалическая борозда становится видимой. Инвагинация передней и задней первичной кишки и формирование дорзальных складок, исчезновение цефалической борозды. Переходная сегментация мезодермального слоя (в виде выступов в желточный мешок). Формируются зачатки мальпигиевых трубочек и деление нейробластов.

В период стадии гастрюляции и сегментации эмбриона можно наблюдать инвагинацию переднего сегмента, в результате чего область головы становится хорошо различимой. Вентральная сегментация становится более выраженной. Темный центральный участок желтка находится по передне-задней оси и начинает перемещаться к заднему концу эмбриона. На этой стадии имеется пространство между эмбрионом и желточной (вителиновой) мембраной. Появляются дорзальные сегменты (полная сегментация). Образование парасегментных складок. Происходит разрыв между головой и грудью, что является сигналом для инволюции головы. Формируется линия вентральной нервной системы. Голова постепенно становится заключена в грудные сегменты. Формируется ротовое отверстие, глотка, кишечник (переваривание желтка), дыхальце.

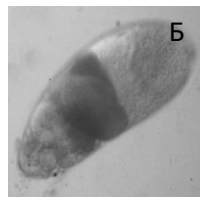
На завершающей стадии органогенеза можно наблюдать мускульные сокращения (активные движения). Формируются трахейные трубочки, которые постепенно заполняются воздухом. Много маленьких ветвей отходят от трахеи в латерально-дорсальном направлении. Хитинизация части ротового аппарата. Восемь брюшных сегментов, на которых вентрально располагаются щетинки. Три грудных сегмента менее четко выражены. Когда весь желток становится абсорбированным личинка разрывает вителлиновую мембрану в области микропиля, используя ротовые крючья.

Эмбриогенез завершается созданием основного метамерного типа строения, образованием кутикулярных покровов и внутренних органов личинки. Личинка вылупляется через 24 ч после оплодотворения яйца.



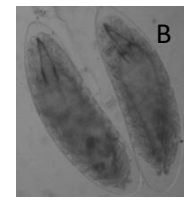
0-5½ ч

Начальные стадии
дробления и образования
бластодермы.



5½-17 ч

Стадия гастрюляции и
сегментации эмбриона,
гистогенез.



17-22 ч

Стадия органогенеза и
выход личинки из
хориона.

Рисунок 5 – Стадии эмбрионального развития *Drosophila melanogaster*

Выделяют три личиночных стадии: L1 и L2 (~ 1 день каждая), за которыми следуют L3 (~ 3 дня), куколка (4 дня) и финальный этап развития – имаго. Взрослые мухи достигают половой зрелости через 2–4 дня после выхода из куколки.

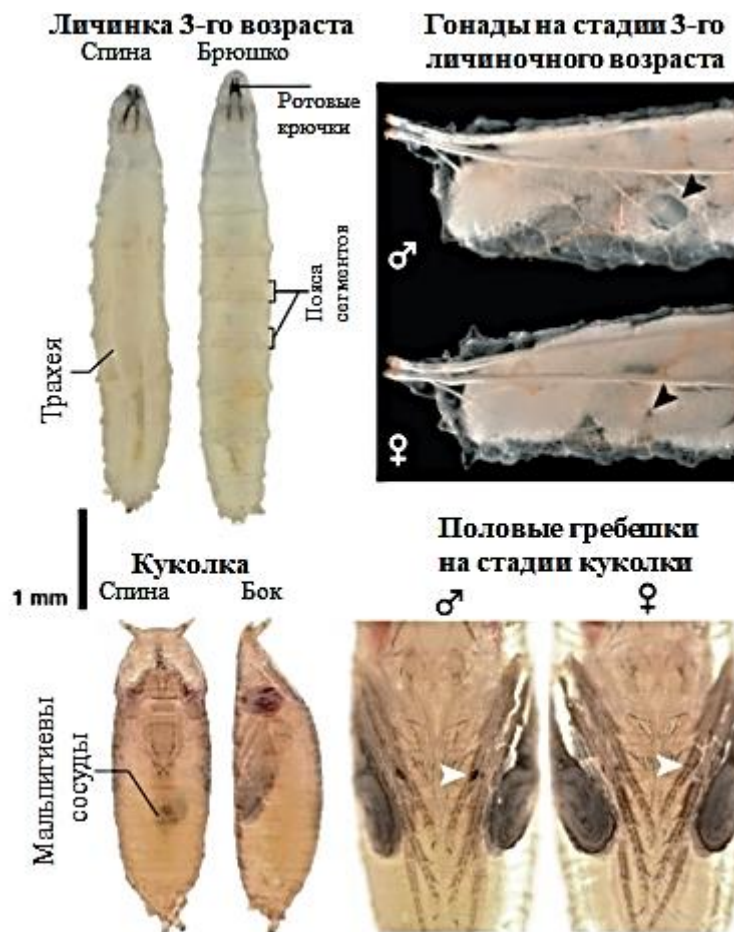


Рисунок 6 – Морфологические особенности личинки третьего возраста и куколки *Drosophila melanogaster*

Время развития может значительно варьироваться (на несколько дней) в зависимости от условий окружающей среды (температура, плотность популяции, качество и количество пищи), а также особое влияние оказывает генетический фон.

Личинки третьего возраста можно разделить по полу, так как мужские и женские половые железы видны без необходимости вскрытия и достаточно хорошо отличаются по размеру (рис. 6). Гонады на личиночной стадии развития можно идентифицировать, применяя нижнюю подсветку бинокля.

Гонады расположены с каждой стороны (черные стрелки), в задней трети личинки, чуть ниже дорсальной трахеи. Мужские половые железы примерно в пять раз больше женских половых желез. Их можно отличить от жирового тела у обоих полов, так как они полупрозрачные, в то время как жировое тело имеет молочный цвет.

Также по полу можно разделить особей на куколочной стадии развития (рис. 6). Эта процедура доступна, когда кутикулярные структуры становятся пигментированными и половые гребни самца становятся видимыми на брюшной поверхности куколки (белые стрелки).

Drosophila melanogaster – вид, для которого характерен выраженный половой диморфизм, благодаря которому самок и самцов можно легко отличить на основании нескольких морфологических различий (рис. 7).

Размер: самки, как правило, крупнее самцов (но это может варьироваться в зависимости от возраста, культурных условий и генетического фона).

Цвет: у самцов задние сегменты брюшка (A5 и A6) имеют темную пигментацию; у самок – окраска этих сегментов варьирует от бледной до почти полностью темной. Оба пола имеют темный поперечный рисунок, а именно полосы на дорсальной стороне каждого брюшного сегмента.

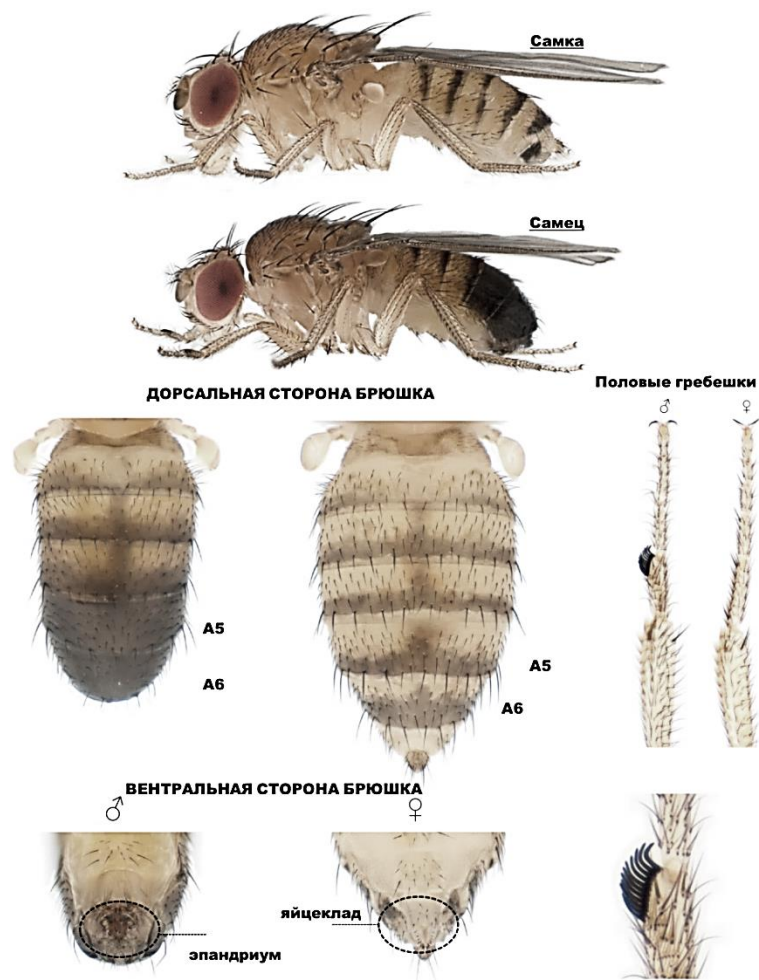


Рисунок 7 – Половые различия между самкой и самцом

Drosophila melanogaster

Внешняя морфология:

- У самок брюшко с заостренным кончиком, а у самца округлое. Кроме того, брюшная полость самца имеет тенденцию скручиваться внутрь.
- Наружные половые органы самца (эпандриум) больше, сложнее и темнее, чем наружные половые органы самки (генитальные пластинки и яйцеклад).
- На передних лапках самца имеются только половые расчески (половые гребни) – ряды толстых и темных щетинок на первом сегменте лапки. Эта черта легко является надежной и легко детектируемой при морфологическом анализе, хотя подвержен нескольким мутациям.

Новые мухи, как самцы, так и самки характеризуются бледной пигментацией кутикулярных покровов (рис. 8).

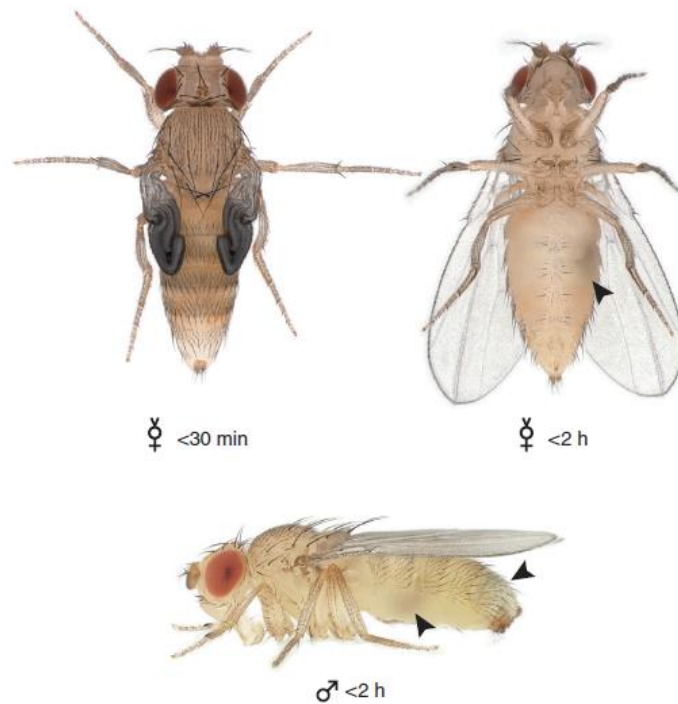


Рисунок 8 – Виргинные самки и самцы после выхода из куколки

В течение последующих часов после выхода из куколки их пигментация темнеет. У только что появившихся имаго крылья имеют серую пигментацию и аккуратно сложены, но в последующие 30 минут крылья расправляются и приобретают естественную форму для вида. Брюшко имаго в первые часы имеет вздутую форму, а на его вентральной стороне можно идентифицировать темное пятно – меконий (отходы метаболизма куколки). Этот пигментированный участок на брюшке сохраняется в течение 6 часов после выхода имаго из куколки, что позволяет отбирать виргинных (неоплодотворенных) особей. Со временем пигментация кутикулярных покровов темнеет и появляется характерная сегментация брюшного отдела.

Особенности строения и функционирования хромосом дрозофилы

Основной кариотип *Drosophila melanogaster*, который можно увидеть в митотически активных нейробластах мозга личинок, состоит из четырех

хромосом, половых хромосом X и Y, двух более крупных аутомных элементов, хромосом 2, 3 и 4 хромосомы в виде маленькой точки (Рисунок 9).

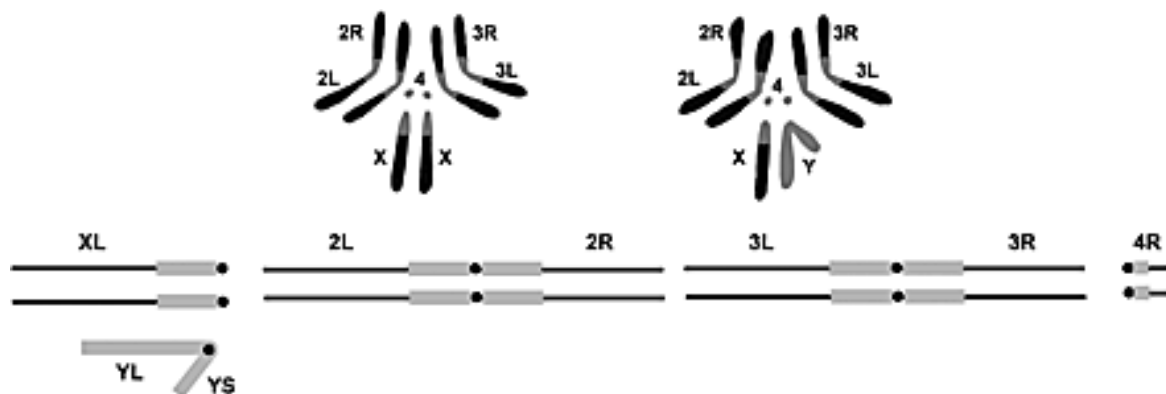


Рисунок – 9. В верхней части рисунка изображен кариотип *D. melanogaster*. Хромосомы нейробластов третьего возраста личинки женского пола – слева, и самцов – справа. Ниже приведено схематическое изображение генома с указанием названий плеч половых хромосом и аутомом. Обратите внимание, что маленькие плечи XR и 4L не показаны. Эухроматиновые части генома показаны черным, а гетерохроматиновые – серым.

X-хромосому также называют первой хромосомой и обозначают «1». При обозначении и символизации хромосомных aberrаций обычно используется цифра, а не буква, когда речь идет о половой хромосоме. У самок дрозофил присутствует две X-хромосомы, а у самцов – одна X и одна Y-хромосома. У обоих полов есть две группы аутомом: вторая, третья и четвертые хромосомы. X-хромосома делится на два плеча по положению центромеры, большого левого плеча (XL) и гораздо меньшего правого плеча (XR), и поэтому является акроцентрической. Y-хромосома также является акроцентрической с немного более длинным плечом (YL - long) и коротким плечом (YS - short).

Две большие аутомные хромосомы являются метацентрическими с центромерой, расположенной в центре и двумя приблизительно равными левым и правым плечами. Четвертая точечная хромосома является акроцентрической, морфологически имеет сходство с X-хромосомой. Маленькое плечо обозначено

как левое (4L), а более крупное - как правое (4R). В сумме всего имеется 10 плеч хромосом: XL, XR, YL, YS, 2L, 2R, 3L, 3R, 4L и 4R.

Гигантские хромосомы слюнных желез впервые были обнаружены Бальбиани в 1881 году при изучении слюнных желез личинок хирономуса. Но их важность для цитогенетических исследований была осознана спустя несколько лет. Позднее такой тип хромосом был обнаружен в соматических клетках тканей таких органов личинок двукрылых, как кишечник, мальпигиевые сосуды, жировое тело, а также в синергидах, антиподах, эндосперме некоторых растений, в трофобластах млекопитающих, в гигантских нейронах моллюсков, в клетках пищеварительных желез и эпителия матки аскариды, в макронуклеусе инфузорий.

Политенные хромосомы в 100—200 раз длиннее и в 1000 раз больше содержат хромонем, чем обычные метафазные хромосомы, именно это и позволяет провести изучение хромомерного рисунка, а также функций отдельных генов (сходства между их исчерченной структурой и линейно расположенными генами были охарактеризованы в начале 30-х годов Костоффом и Кэлвином Бриджесом).

Редуцированные хромосомы не разделяются, и все сестринские хроматиды остаются вместе; для политенных хромосом характерным является наличие от 1024 до 2048 нитей. Процесс репликации хромосом этого типа называется эндомитозом. Когда сестринские хроматиды отделяются после одного эндомитоза, число хромосом удваивается; это состояние называется эндополиплоидией. Процессы политении и эндополиплоидии могут происходить в одной клетке. Например, диплоидная клетка становится полиплоидной в результате эндомитоза, а также может произойти дальнейшее эндомитотическое деление, при котором хроматиды могут не отделяться и вызывать политению.

Хромосомы слюнных желез у *Drosophila* являются самыми крупными из известных хромосом и наиболее тщательно изученными. На поздней стадии личиночного развития (3-й возраст) плодовой мушки эти хромосомы примерно

в 100 раз длиннее соматических метафазных хромосом. При растяжении эти хромосомы становятся длиной около 2000 мкм. В клетках слюнных желез *Chironomus* пара гигантских хромосом имеет диаметр 20 мкм и длину 270 мкм. Политенные хромосомы имеют отличительную особенность, а именно темно окрашенные области, называемые дисками, отделенных друг от друга более светлыми пятнами – междиски. Каждая хромосома состоит из серии чередующихся междисков и дисков, количество которых значительно преобладает и составляет около 5000. Диски представлены в большей степени повторами, междиски — уникальными районами, в основном это регуляторные гены.

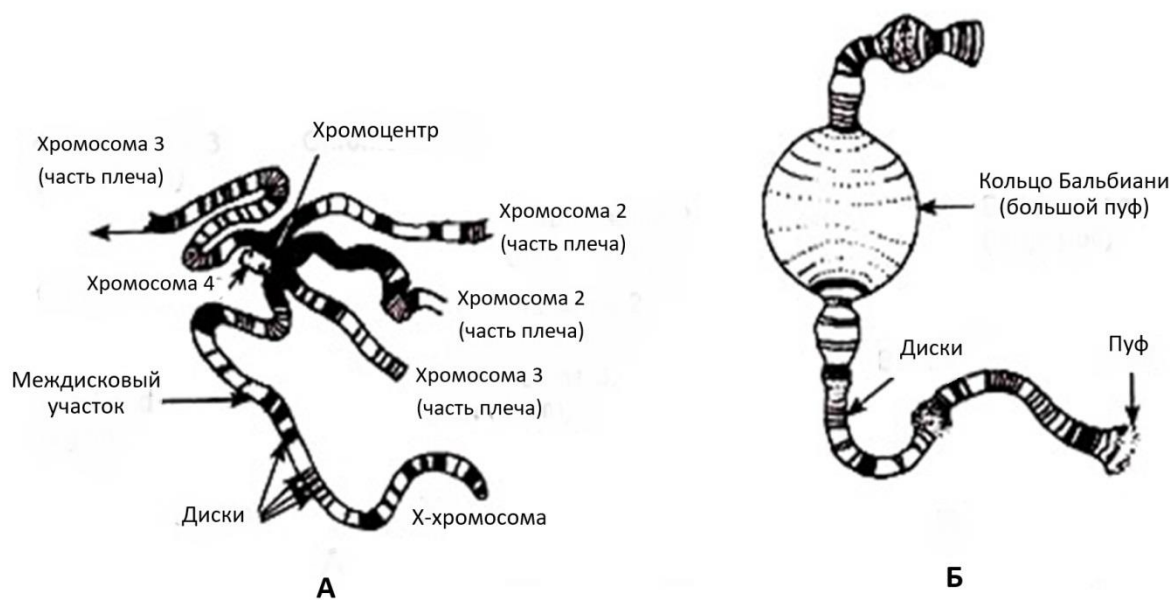


Рисунок – 10. Политенные хромосомы двукрылых. А – политенные хромосомы самки *Drosophila melanogaster*; Б – хромосома *Biobella massoudi*, иллюстрирующая пuffedы и кольцо Бальбиани.

Когда ген активируется, специфический диск хромосомы слюнных желез резко увеличивается и приобретает распухшую конфигурацию – пuffed. Впервые такие пuffedовые образования были обнаружены К. Бриджесом в 1935 году. Размер пuffedов может варьировать от очень маленького до более чем двойного

диаметра соответствующего диска. Когда пуф приобретает исключительно большой, его называют кольцом Бальбиани, которые встречаются у *Chiromidae*.

Пуфы – это активно транскрибируемые участки политенных хромосом. Транскрипция происходит в пуфах, и каждый пуф синтезирует особый тип РНК, уникальный для этого конкретного сегмента ДНК. Вновь синтезированная РНК образует комплекс с белком с образованием гранулы рибонуклеопротеина. Эти гранулы транспортируются в цитоплазму через ядерные поры. РНК-компонент рибонуклеопротеинового комплекса после сплайсинга становится связанным с рибосомами и функционирует как мРНК.

Центромеры хромосом дрозофилы агрегируют с образованием хромоцентра, который состоит в значительной степени из гетерохроматина. Из этого полицентрального образования выходит пять, реже шесть концов — лент, каждая лента представлена двумя гомологичными хромосомами, как результат конъюгации.

Генетические исследования политенных хромосом позволяют провести картирование точек разрывов хромосомных перестроек, картирование генов при использовании метода гибридизации *in situ*, установить характер влияния различных факторов на процессы репликации, транскрипции. Политенных хромосом можно отнести к биотест-объекту, позволяющему фиксировать последствия действия антропогенных факторов.

Механизмы определения пола у дрозофилы

В 1921 году один из основоположников современной генетики Кэлвин Бриджес обнаружил у *D.melanogaster* несколько самок с триплоидным набором хромосом (3X:3A). После скрещивания таких самок с нормальными самцами (2X:2A) в их потомстве наряду с нормальными самками были обнаружены особи с необычным проявлением половых признаков. Все потомство распалось на классы в зависимости от соотношения половых хромосом (X) и аутосом (A):

- 1) 3X:3A — триплоидные самки;
- 2) 2X:2A — нормальные самки (X:A = 1);

- 3) $(2X:2Y):2A$ — самки;
- 4) $XY:2A$ — нормальные самцы с соотношением $X:A = 0,5$;
- 5) $2X:3A$ и $(2X+Y):3A$ — интерсексы (по терминологии К. Бриджеса) с варьирующим соотношением $X:A = 0,5 - 1$. Это особи со смешанным проявлением мужских и женских признаков. У таких мух либо полностью отсутствовали секторы тела, детерминированные по полу, либо в ходе развития до определенного момента формировались органы, присущие одному полу, а затем органы другого пола;
- 6) $X:3A$ — сверхсамцы — особи с гипертрофированными признаками самца, однако стерильного ($X:A < 0,5$);
7. $3X:2A$ — сверхсамки — особи с ненормально развитыми яичниками и другими нарушениями признаков пола ($X:A > 1$).

Во всех тех случаях, когда появляются самки, соотношение числа X-хромосом к числу аутосом составляет единицу. Наличие мужской Y-хромосомы не влияет на нормальное развитие самки. По К. Бриджесу пол у дрозофилы определяется балансом числа половых хромосом и набора аутосом, при этом Y-хромосома не играет в его определении никакой роли (балансовая теория пола). Действительно, в Y-хромосоме располагаются гены 11 факторов фертильности, влияющих на формирование сперматозоидов и не принимающих участия в формировании половых признаков у самца. Кроме того, известно, что особи XO у дрозофилы — самцы.

У дрозофилы открыты многочисленные гены, влияющие на правильную дифференцировку пола. Среди них такие гены, как *sxl* (*sex lethal*), *da* (*daughterless*), *sis* (*sisterless*), *tra* (*transformer*), *dsx* (*double sex*). В связи с этим появилась возможность генетической интерпретации балансовой теории пола. Предполагают, что «соотношение» числа X-хромосом и аутосом улавливаются геном *sxl* на ранних стадиях эмбрионального развития. Этот ген, в свою очередь, контролирует одновременно три направления дифференцировки: 1) реализация дозовой компенсации; 2) формирование половых признаков в соматических клетках; 3) формирование клеток зародышевого пути.

На начальных этапах формирования пола у эмбрионов дрозофилы действуют продукты генов *sis-a* и *sis-b* (т.н. Xses — x signal elements, белки-нумераторы), расположенных в X-хромосоме, и гена *da*, расположенного в аутосоме (т.н. Ases — autosomal signal elements, белки-денумераторы). Продукт гена *da* поступает в яйцеклетку из организма матери. Его количество всегда соответствует двум дозам, т.к. Он считывается с генов, локализованных в двух материнских аутосомах. Количество продуктов, считанных с генов *sis-a* и *sis-b*, зависит от того, сколько X-хромосом у особи — одна или две. Поэтому комплекс белков SIS/DA имеет отношение составляющих его компонентов 1:2 у самцов или 2:2 у самок. Наблюдения за гаплоидными и триплоидными личинками показали, что пол у дрозофилы определяется скорее не соотношением X:A, а числом X-хромосом. У дрозофилы найдены продукты пяти X-хромосомных генов — *sis-a*, *sis-b* (*scute*), *runt*, *sis-e* (*unpaired*), *dm* (*diminutive*) (так называемые нумераторы) — и ряд белковых кофакторов, включая аутосомный продукт гена *deadpan*. Один из генов — очевидно, *da* (*daughterless*) — кодирует белок, который выполняет функции аутосомного фактора контроля (ASES) и относится к так называемым денумераторам. Через 3 часа после оплодотворения во время формирования бластодермы продукты генов *sis-a*, *scute*, *runt* стимулируют активность раннего *sxl*-промотора. Его же полная активация достигается с помощью продукта X-хромосомного гена *unpaired* через *janus*-киназу. У диплоидных самок (XX:2A) необходимый для включения *sxl*-промотора уровень *unpaired* достигается к 12-му делению клеток бластодермы, у гаплоидных (XO:2A) — к 14-му, а у триплоидов (XXX:3A эмбрионы) — только в некоторых клетках (в результате образуются частичные гинандроморфы). Продукты названных выше генов присоединяются к регуляторной области ключевого гена *sxl*. Этот ген содержит 8 участков, кодирующих последовательность аминокислот (экзонов), разделенных некодирующими районами (интронами). У него также есть два участка, стимулирующих транскрипцию РНК с данного гена (промоторы): ранний и поздний. Только в том случае, когда комплексный белок SIS/DA содержит две

дозы *sis*, он может активировать начало транскрипции с раннего промотора у самок транскрипт гена *sxl* не содержит экзон 3 со стоп-кодоном. На стадии бластодермы в результате трансляции этого транскрипта формируется полноценный белок SXL, активирующий транскрипцию гена *tra*, который, далее взаимодействуя с белком гена *tra2*, регулирует образование специфической РНК для самок *dsxf* (*doublesex*). Наличие *dsxf* у самок способствует вовлечению в данный каскад гена *ix*. Белки генов *dsxf* и *ix* инактивируют многие гены, специфичные для самцов, и в конечном итоге развивается самка.

У самцов при активировании позднего промотора (p1) гена *sxl* считывается третий экзон, в котором расположен стоп-кодон UGA. На нем трансляция останавливается, и белок получается усеченным. При отсутствии нормально функционирующего белка SXL ген *tra* образует короткую нефункциональную молекулу белка (трансляцию блокирует кодон UAG во втором экзоне). У самцов нарушение сплайсинга гена *sxl* приводит к включению в транскрипт специфического экзона, содержащего стоп-кодон, и белок не синтезируется. В отсутствие белка SXL MSL-2-иРНК не транслируется и происходит дозовая компенсация. Кроме того, в отсутствие нормального белка TRA начинают транскрибироваться самецспецифические гены *dsx* и *fru*. Последняя из них транслируется в транскрипционный фактор типа цинковых пальцев — BTZ, который ответственен за все аспекты, связанные с центральной нервной системой (ЦНС) у самцов. Белок гена *tra2* присутствует у обоих полов. В отсутствие функционального продукта гена *tra* у самцов не образуется нормальный мультиферментный комплекс TRA/TRA2. Более того, при отсутствии нормальных продуктов генов *tra* и *tra2* формируется белок DSXM. Он репрессирует развитие признаков женского пола. Недавно было показано, что белок NITO (продукт гена *spenito-nito*) контролирует альтернативный сплайсинг *sxl*-мРНК, взаимодействуя с соответствующим SXL-белком и пре-мРНК и таким образом вовлекая *sxl* в саморегуляцию. Дифференциация пола и появление соответствующих ему признаков, в частности поведенческих, у

дрозофилы связаны с первичным определением пола. Так, полноценный белок гена *sxl* приводит к активности *tra* и *tra2*, а они, в свою очередь, контролируют появление регуляторов транскрипции генов *fru* (*fruitless*), *dsf* (*dissatisfaction*), *dsx*, *fit* (*female specific independent of transformer*). Продукт гена *dsf* регулирует дифференциацию пола вне нервной системы и некоторые аспекты полового поведения (*courtship* — ухаживания), а *fru* влияет на развитие центральной нервной системы, необходимое для ухаживания, развитие мускулов и т.д. Другие важные для пола гены контролируют целый ряд признаков. Так, ген *tsx* (*turn on sex-specificity*) кодирует одорант-связывающий белок, *sxe1* (*sex-specificity enzyme*) — фосфолипазу, вовлекаемую в сигналинг, *sxe2* — детерминирует цитохром p450, вовлекаемый в метаболизм стероидов в разных органах. Следует отметить, что у дрозифилы описано всего 46 типов РНК с различным распределением между полами.

Существуют две ветви белковой иерархии определения пола у дрозифилы (рис. 11). Одна управляет дифференциацией соматического пола, а другая — дозовой компенсацией.

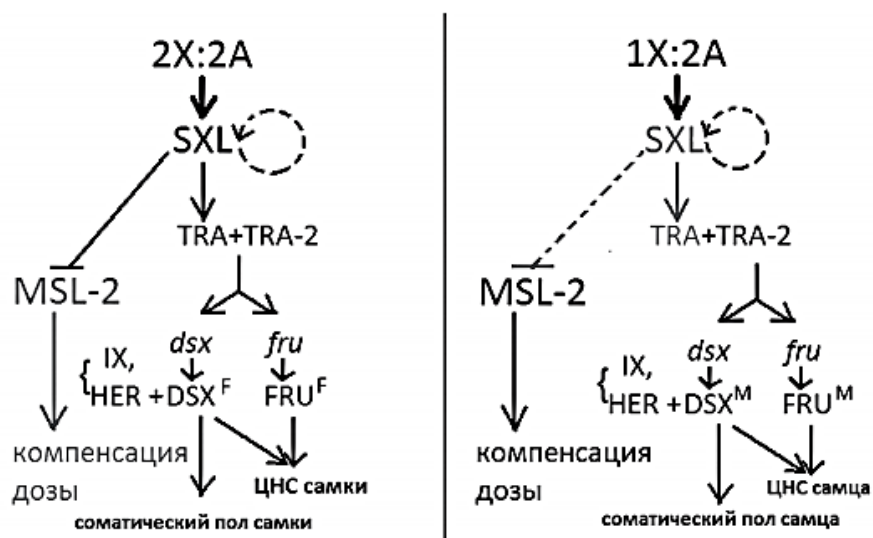


Рисунок 11 - Схема белковой иерархии определения пола у дрозифилы.

Фактор SXL предотвращает дозовую компенсацию у самок, блокируя трансляцию *msl-2*-иРНК, а также регулирует соматическую половую дифференциацию, контролируя сплайсинг пре-иРНК гена *tra* (*transformer*) и

генерируя самкоспецифическую РНК, кодирующую TRA-белок. У самок ген *tra* и конститутивно экспрессирующийся ген *tra2* (*transformer-2*) функционируют вместе и контролируют все аспекты соматической половой дифференциации. Далее TRA и TRA2 контролируют две параллельные ветви иерархии определения пола. Вслед за генами *tra* и *tra2* в одной из ветвей активируется ген *dsx*, а в другой — ген *fru*, благодаря регуляции сплайсинга *dsx*- и *fru*-пре-иРНК. В результате образуются самкоспецифические *dsx*- и *fru*-иРНК. *fru*-иРНК, специфичная для самки, не транслируется, а *dsx*-иРНК кодирует альтернативные в зависимости от пола белки типа цинковых пальцев (*zinc finger proteins*), которые имеют идентичные ДНК-связывающие домены, но различные карбоксильные концы.

У самок ген *dsx* функционирует вместе с *ix*- (*intersex*) и *her*- (*hermaphrodite*) генами. Ветвь *dsx* требуется для всех аспектов соматической половой дифференциации, не затрагивая центральную нервную систему.

Генетическая символика, используемая при работе с дрозофилой

Существующую в настоящее время дрозофилиную символику можно разбить на три категории: идентифицирующая символика (символы мутантов); описательная символика; дополнительная символика при записи линий.

Идентифицирующая символика предназначена для обозначения мутаций. Символ мутанта – необходимое и единственное обозначение любой мутации – точечной или структурной. Вторая категория символов употребляется при описании мутанта, которая включает разнообразную информацию о нем. Например, указываются расположение мутантного гена на генетической или цитологической карте, порядок воссоединения частей хромосом при хромосомных перестройках и т.д. Третья категория символов необходима при записи линий дрозофилы. Можно обозначать гомо- или гетерозиготность генетического фона, дается указание на генотипы самца и самки в данной линии и т.д.

Полное название мутации состоит из одного или нескольких английских слов, выражающих основное фенотипическое проявление мутации. Это может быть существительное (*bar* – полоска, *lobe* – доля, *plexus* – сплетение), прилагательное (*black* – темный, *white* – белый) или их сочетание (*reduced ocelli* – редуцированные глазки, *abnormal abdomen* – аномальное брюшко, *ether sensitive* – чувствительный к эфиру). Название мутации с доминантным проявлением пишется с заглавной буквы, а с рецессивным – со строчной. Символ мутации состоит из одной или нескольких букв полного названия мутации: *B* (от *bar* – полоска) – символ мутации, имеющий фенотип полосковидные глаза, *Cu* (от *curly* – кудрявый) – символ мутации загнутых крыльев. Первая буква символа – это первая буква полного названия мутации, а вторая и последующие буквы выбираются из полного названия произвольно с целью избежать одинакового обозначения разных мутаций.

Также существуют определенные правила записи структурных перестроек хромосом.

Инверсии – один из видов внутрихромосомных перестроек, характеризующийся перевертыванием хромосомного участка на 180°. Инверсии обозначаются символом *In* (Inversion). В круглых скобках указывается номер хромосомы, содержащей инверсию, а также указываются плечи хромосом, которые захватываются инверсией. Например, *In(2L)* – парацентрическая инверсия в правом плече аутосомы второй пары, а *In(3LR)* – перицентрическая инверсия в аутосоме третьей пары. Как известно парацентрическая инверсия захватывает одно из плечей хромосомы, а перицентрическая – оба. После скобок без пробелов записывается условное обозначение инверсии, что чаще всего соответствует символу мутации, неотделимой от перестройки, например: *In(2LR)Gla*.

Дупликации – вид хромосомных перестроек, характеризующийся наличием в геноме хромосомного участка сверх нормального набора. У дрозофилы известно три вида дупликаций: 1) перестройка может быть

включена в ту же хромосому, из материала которой состоит сама (как правило, два идентичных участка лежат рядом – так называемый повтор – repeat); 2) дупликация может представлять собой часть хромосомы с центромерой – свободная дупликация (при наличии такой дупликации происходит утроение по всему материалу дополнительной хромосомы); 3) дупликация встречается в потомстве особей, содержащих гетерозиготные транслокации (если транслоцированный участок невелик, то потомки с дупликацией выживают). Все виды дупликаций обозначаются символом *Dp* (Duplication). В круглых скобках сначала указывается хромосома-донор, затем через точку с запятой хромосома-реципиент, например: *Dp(2;Y)bw⁺: Duplication(2;Y) brown wild type*. После скобок приводятся символы мутаций, связанных с дупликацией, сокращенные названия линий, фамилии авторов и т.д. В случае дупликаций-повторов цифры в скобках совпадают: *Dp(1;1)BB: Duplication(1;1)Bar Bar*. Если дупликация свободная, т.е. имеет центромеру, после точки с запятой ставится буква *f* (free): *Dp(1;f):Dp(1;f)z⁹:Duplication(1;free)zeste*.

Делеции – вид хромосомных аббераций, характеризующийся нехваткой части хромосомы. Символ делеций – *Df* (deficiency). В скобках указывается номер и плечо хромосомы, имеющей делецию; вне скобок сокращения: название гена, автор: *Df(2R)Px:Deficiency(2R)Plexate*. У делеций X-хромосомы плечо не указывается: *Df(1)w2II*. Не указывается плечо и для делеций четвертой хромосомы.

Транслокации – вид хромосомных перестроек, образующихся в результате обмена хромосомными фрагментами между негомологичными хромосомами. Обозначаются символом *T* (translocation). В круглых скобках указываются хромосомы, вовлеченные в транслокацию. Символы хромосом разделяются точкой с запятой. Хромосомы перечисляются в порядке возрастания номера. После скобок следует условное название транслокации, состоящего или из обозначения сцепленной с ней мутации, или названия линии, в которой она была обнаружена: *T(1;2)B^{DG}* – транслокация первой и второй хромосом, содержащая ген полосковидных глаз (*Bar of Dubinin and Golbat*). *T(1;2;3;4)l-*

v454 – транслокация, вовлекающая все четыре хромосомы и содержащая леталь (*lethal variegated 454*).

Транспозиции – вид внутрихромосомных перестроек, при котором некий участок хромосомы исключается из стандартного расположения и встраивается в ином месте этой же хромосомы. Транспозиции обозначаются символом Тр (transposition). В скобках указывается номер хромосомы. Названия плеч не приводятся. После скобок без интервала – дополнительные обозначения: символ мутации, название линии и т.д. Например: Тр(3)bxd100:Transposition (3) bithoraxoid.

Кольца – вид внутрихромосомных перестроек, возникающих при обменах между противоположными плечами одной хромосомы, в результате которых она замыкается в кольцо. Символ кольца – R (ring). При описании кольцевых хромосом указываются точки разрывов на политенных хромосомах: R(1)94-2A1.

Культивирование и правила работы с дрозофилой в лаборатории

Drosophila melanogaster можно легко обнаружить в природных условиях, где происходит процесс брожения. В нашей повседневной жизни плодовых мушек можно легко наблюдать на перезревших фруктах, особенно тех, которые начали бродить. Подобно большинству других плодовых мух, дрозофил можно разводить с помощью этих ферментированных фруктов. Ферментация является одним из наиболее важных элементов в размножении дрозофилы, хотя о роли брожения в развитии мух до сих пор неизвестно.

В исследовательских целях *D. melanogaster* не разводят на питательной среде с добавлением перезревших и ферментированных фруктов, но в более плотных питательных средах. Один из самых распространенных ингредиентов, добавляемых в питательные среды для того, чтобы ее уплотнить – это агар.

Содержание сахара в питательные среды не только жизненно необходимо для роста дрозофилы, но также необходимо и для дрожжей в процессе брожения.

Тем не менее, существует множество рецептов приготовления питательных сред для *D. melanogaster*. и различные лаборатории или исследовательские центры имеют свою собственную формулу приготовления среды. Например, в университете Индианы используемая стандартная среда имеет следующий состав: соевая мука, кукурузная мука, экстракт легкого солода, легкий кукурузный сироп, пропионовая кислота и агар.

Существуют также питательные среды с пониженным содержанием агара и без содержания агара. Некоторые рецепты питательной среды для культивирования мух могут включать не только агар, но и муку из кукурузной и овсяной крупы, которая используется для затвердевания среды. Тем не менее, этот тип питательной среды может иметь трудности при заливке среды в культуральные флаконы для выращивания мух.

Загрязнение питательных сред плесенью снижает выживаемость и замедляет рост *Drosophila melanogaster*, так как гетеротрофные грибы будут потреблять большую часть питательных веществ из питательной среды мух. Следовательно, рост грибов необходимо ингибировать в культуральных средах *D. melanogaster*. В настоящее время коммерчески доступны различные типы ингибиторов плесени, например: Tegosept M (метил-п-гидроксибензоат), пропионовая кислота и метиловый эфир гидроксибензойной кислоты являются наиболее часто используемыми ингибиторами плесени. Автоклавирование является еще одним методом предотвращения роста грибов путем обеспечения состояния стерильности питательных сред и культуральной посуды.

Приготовление питательной среды. Рецепт питательной среды для культивирования дрозофил, используемый на кафедре генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета:

Компонент	
Вода	1000 мл
Агар	10 г
Манная крупа	25 г
Сахар	25 г
Дрожжи сырые пекарские	100 г
Пропионовая кислота	6 мл

В холодную воду необходимо добавить нужный объем агара и довести до кипения, после чего в кипящей воде растворить дрожжи и проварить их 30-40 минут. Далее необходимо добавить в равном объеме сахар и манную крупу и проваривать 30 минут. В конце добавить дополнительную воду, чтобы общий объем достиг 1 литра, и довести смесь до кипения, после чего отключить нагревательный прибор. Охладив смесь до 60° С, добавить пропионовую кислоту непосредственно перед дозированием в культуральные флаконы. Дозировать, когда температура смеси составляет от 40 до 60° С. Среда будет разделяться на две фракции, если она слишком горячая при заливке. Готовую среду можно хранить в холодильнике при температуре 4 - 8 ° С не более 14 дней.

Правила работы с дрозофилой. Рассматривать и подсчитывать мух можно только при условии их предварительной наркотизации, которая производится в эфиризаторе (морилке). Наркотизацию проводят таким образом: культуральную пробирку с особями осторожно постукивают открытой стороной ладони, так чтобы мухи оказались на питательной среде и затем совмещают горлышки пробирки и эфиризатора, постукивая по пробирке таким образом, чтобы мухи оказывались в морилке. После того, как в морилке уснула последняя муха, их необходимо высыпать на стекло для анализа и подсчета. В состоянии наркоза дрозофилы могут находиться до 5 минут. Если мухи, проснулись раньше, чем нужно, их необходимо накрыть чашкой Петри и подложить смоченную эфиром вату.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Лабораторная работа № 1

Моногибридное скрещивание

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: закрепление основных понятий наследования признаков согласно законам Менделя.

ДЕМОНСТРАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ: пробирки с морфологическими мутантами дрозофил; пробирки с дрозофилой дикого типа; чистые пробирки со свежей питательной средой для дрозофил; таблицы: половые различия самок и самцов дрозофил; бинокляр; эфиризатор; капельница с эфиром; предметное стекло для работы с дрозофилой; кисточка; маркер; емкость для отхода биоматериала (мух).

ХОД РАБОТЫ:

Каждый студент получает пробирки с мухами дикого типа и мутантами. Используя эфиризатор, предварительно заправленный эфиром, производит анестезию дрозофил. **ВНИМАНИЕ:** не следует передерживать мух в морилке, т.к. их можно умертвить. В этом случае у них вытягивается хоботок, а крылья становятся перпендикулярно брюшку. После анестезии студент рассматривает полученных мух с использованием бинокля (при работе с биноклем используется подача только верхнего света!). Устанавливает морфологические особенности (цвет глаз, тела; форма щетинок и глаз; форма крыльев и их жилкование) дикого и мутантного фенотипов мух. Определяет по основным морфологическим параметрам половую принадлежность имаго дрозофилы.

После ознакомления с дрозофилой каждый студент производит реципрокные скрещивания по схеме:

	самка	самец
Прямое скрещивание	дикий тип	мутант
Обратное скрещивание	мутант	дикий тип

С учетом жизненного цикла дрозофил, через 14 дней студент получает гибридное потомство F_1 . Используя необходимые материалы для работы с дрозофилой, производит анализ гибридов F_1 , при этом учитывает количество и фенотип, а также пол особей прямого и обратного скрещиваний. **ВНИМАНИЕ:** анализ потомства в пробирках реципрокных скрещиваний производится отдельно! Полученные результаты необходимо внести в таблицу, для последующего установления характера наследования исследуемого мутантного фенотипа. В процессе подсчета мух, студент отбирает по две особи каждого пола и производит скрещивание для получения потомства F_2 . Через 14 дней, аналогично процедуре подсчета F_1 необходимо проанализировать наследование признака у потомков F_2 .

Полученные результаты реципрокных скрещиваний F_1 и F_2 необходимо проверить с использованием метода χ^2 .

Скрещивание	Поколение	Фенотип				Σ общая ПОТОМКОВ
		Дикий тип		Мутант		
		Самка	Самец	Самка	Самец	
Прямое	F_1					
Обратное	F_1					
Прямое	F_2					
Обратное	F_2					

На основании полученных результатов студентом делается вывод:

- 1) Исследуемый мутантный фенотип дрозофилы, наследуется согласно 1 и 2 законам Менделя;
- 2) Ген, контролирующий развитие мутантного фенотипа, проявляет доминантный или рецессивный характер наследования;

3) Исходя из полученных результатов расщепления F_2 для исследуемого признака, какой тип взаимодействия аллельных генов наблюдается.

Лабораторная работа № 2

Дигибридное скрещивание

Скрещивание родительских форм, различающихся по аллелям двух генов, носит название дигибридного. Гибриды, гетерозиготные по двум генам (в данном случае гибриды F_1), называются дигетерозиготными. Точно так же рассматривают три-, тетра- и полигетерозиготы.

При постановке дигибридного скрещивания используются две линии дрозофилы, маркированные аутосомными генами из разных хромосом (2 и 3; 3 и 4; 2 и 4), например:

P: ♀cn (cinnabar) × ♂e (ebony) – реципрочно
2-я хромосома 3-я хромосома

P: ♀vg (vestigial) × ♂st (scarlet) – реципрочно
2-я хромосома 3-я хромосома

P: ♀vg (vestigial) × ♂e (ebony) – реципрочно
2-я хромосома 3-я хромосома

Для скрещивания используются виргинные самки, которых отбирают заранее и содержат в пробирках со свежей средой отдельно от самцов. Гибридных особей F_1 (♀ и ♂) пересаживают в пробирки со свежей средой для скрещивания между собой. Подсчёт и анализ результатов расщепления проводится в F_2 .

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомление с основными закономерностями наследования (доминированием, расщеплением, независимым наследованием) при дигибридном скрещивании.

ДЕМОНСТРАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ: на подгруппу из двух студентов – шесть пробирок с питательной средой и по одной пробирке с мухами (исходные линии – черное тело с прямыми крыльями и серое тело с редуцированными крыльями); на каждого студента – набор для работы с дрозофилой (см. лабораторную работу №1).

ХОД РАБОТЫ:

1. Скрестить между собой гомозиготных мутантных самку и самца, отличающихся двумя альтернативными признаками, например:

$$P: \text{♀ } e^+ vg // e^+ vg \times \text{♂ } e vg^+ // e vg^+$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } e^+ vg \quad \text{♂ } e vg^+$$

2. Получив гибридов F_1 , проанализировать фенотипическое проявление исследуемых признаков, после чего скрестить их между собой:

$$F_1: \text{♀ } e^+ vg^+ // e vg \times \text{♂ } e^+ vg^+ // e vg$$

3. Получив потомков F_2 , проанализировать получившиеся фенотипические классы. Используя метод χ^2 , рассчитать, какое соотношение они представляют. Какие генотипические классы образуются? Полученные результаты оформить в виде таблицы.

4. Сделать выводы о проведенной работе.

Лабораторная работа № 3

Наследование признаков, сцепленных с полом

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: знакомство с основными закономерностями наследования признаков, сцепленных с полом (различия реципрокных скрещиваний в F_1 и F_2 , крисс-кросс наследование).

ДЕМОНСТРАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ: на подгруппу из двух студентов – шесть пробирок с питательной средой и по одной пробирке с мухами (исходные линии – красноглазые и белоглазые мухи); на каждого студента – набор для работы с дрозофилой (см. лабораторную работу №1).

ХОД РАБОТЫ

Студенты работают по два человека в группе, в соответствии с двумя типами скрещиваний.

Прямое скрещивание: виргинную самку дикого типа (красноглазая) необходимо скрестить с самцом, имеющим по фенотипу белый цвет глаз.

Обратное скрещивание: виргинную самку мутантной линии (белоглазая) необходимо скрестить с самцом линии дикого типа, имеющего по фенотипу красный цвет глаз.

Анализ прямого скрещивания: проанализировать потомков первого поколения и убедиться, что все гибриды F_1 обоих полов имеют фенотип, характерный для линии дикого типа, таким образом, установив единообразие F_1 и доминантно-рецессивные отношения признака цвет глаз. Необходимо подсчитать количество самок и самцов с по каждому из полученных фенотипов и записать в таблицу 1. Произвести скрещивание гибридов F_1 между собой для получения потомков второго поколения. Получив через 14 дней особей F_2 , проанализировать фенотипические классы, предварительно распределив особей по полу. Полученные результаты внести в таблицу 1 и провести статистический анализ данных по методу χ^2 .

Анализ обратного скрещивания: проанализировать гибриды F_1 ; разбить мух на два фенотипических класса – с красными и белыми глазами; убедиться, что все красноглазые мухи – самки, а белоглазые – самцы, т.е. установить факт крисс-кросс наследования; подсчитать число красноглазых самок и белоглазых самцов, вписать результаты в таблицу; провести статистическую обработку полученных результатов этого скрещивания методом χ^2 и доказать их соответствие ожидаемому расщеплению (1 самка красноглазая: 1 самец белоглазый). Проанализировать гибриды второго поколения: разбить мух на

фенотипических класса – мухи с красными и белыми глазами, а в пределах окраски – по полу. Убедиться, что среди красноглазых и белоглазых мух есть и самки и самцы; подсчитать число мух в каждом фенотипическом классе. Записать результаты скрещивания в таблицу, провести статистическую обработку результатов скрещивания методом χ^2 и доказать их соответствие ожидаемому расщеплению 1 ♀ красноглазая: 1 ♂ красноглазый: 1 ♀ белоглазая: 1 ♂ белоглазый.

Полученные результаты F₁ и F₂ реципрокных скрещиваний необходимо занести в таблицу 1. Используя метод χ^2 , рассчитать соотношение фенотипических классов в первом и втором поколениях реципрокных скрещиваний. Выяснить, какие генотипические классы образуются. Сделать вывод о характере наследования признака окраска глаз у дрозофилы.

Таблица 1

Результаты количественного анализа наследования окраски глаз у дрозофилы (наследование признаков, сцепленных с полом)

Поколения	♀красноглазая × ♂белоглазый					♀белоглазая × ♂красноглазый				
	Красные глаза		Белые глаза		всего	Красные глаза		Белые глаза		всего
	самка	самец	самка	самец		самка	самец	самка	самец	
F ₁										
F ₂										

Лабораторная работа № 4

Сцепленное наследование и кроссинговер

Третий закон Менделя – закон независимого комбинирования признаков – осуществляется при условии, если гены, определяющие эти признаки, находятся в негомологичных хромосомах. Совместное наследование генов, ограничивающее их свободное комбинирование, т.е. сцепление генов или сцепленное наследование, составляет смысл закона сцепления Моргана.

Сцепление генов, как правило не бывает абсолютным. Благодаря обмену идентичными участками гомологичных хромосом, происходящему в профазе мейоза и получившему название кроссинговера, сцепление нарушается, чем обеспечивается дополнительный источник комбинативной изменчивости. Сцепленное наследование признаков выявляется по преобладанию в потомстве гетерозиготных форм с родительскими сочетаниями признаков (по сравнению со свободным и независимым наследованием) и уменьшенному количеству форм с новыми сочетаниями признаков – рекомбинантов. Величина кроссинговера, отражающая силу сцепления между генами, измеряется отношением числа рекомбинантов к общему числу особей в потомстве от анализирующего скрещивания и выражается в процентах. Т.Х. Морган предположил, что гены расположены в хромосомах линейно, а частота кроссинговера отражает относительное расстояние между ними. Чем дальше отстоят гены друг от друга, тем чаще между ними происходит кроссинговер; чем ближе они друг к другу, тем реже осуществляется кроссинговер. Все гены, находящиеся в одной хромосоме и наследующие сцеплено, составляют группу сцепления. Для построения генетической карты и определения локуса гена следует проводить скрещивание организмов, различающихся не менее чем тремя сцепленными признаками.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: знакомство с закономерностями сцепленного наследования и учет расщепления в потомстве тригетерозиготы со сцепленными генами.

ДЕМОНСТРАЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ: на каждого студента готовится четыре пробирки (по одной пробирке с мухами исходной линии дикого типа с красными глазами, серым телом и нормальными крыльями, а также исходной линии с ярко-красными глазами, черным цветом тела и редуцированными крыльями; гибридов F_1 ; гибридов F_2).

ОБОРУДОВАНИЕ: на каждого студента – набор для работы с дрозофилой.

ХОД РАБОТЫ:

Анализ исходных линий, взятых в скрещивание. Ознакомиться с мухами обеих линий. Убедиться, что в одной из них мухи имеют фенотип дикого типа (красные глаза, серое тело, нормальные крылья), а в другой – мутантный фенотип (ярко-красные глаза, черное тело, редуцированные крылья).

Анализ гибридов первого поколения. Проанализировать гибридов F_1 ; убедиться, что все мухи имеют фенотип дикого типа. Установить полное доминирование признаков, характеризующих фенотип дикого типа, т.е. красный>ярко-красный, серый>черный, нормальные крылья>редуцированные.

Анализ гибридов от анализирующего скрещивания. При анализе гибридов F_b мухи должны быть разбиты на восемь фенотипических классов. Для этого сначала необходимо разобрать мух на два фенотипических класса – с красными и ярко-красными глазами, затем каждый класс снова на два – мух с серым и черным цветом тела. Наконец, каждый из четырех классов разбить тоже на два – с нормальными и редуцированными крыльями. После того как будут выделены все фенотипические классы, под каждым из них написать их фенотипический радикал (например, если мухи красноглазые, чернотелые, с нормальными крыльями, их фенотипический радикал будет $cn+bvg+$ и т.д.).

Обратите внимание, что чаще всего встречаются два класса мух с родительскими сочетаниями признаков: красные глаза, серое тело, нормальные крылья и ярко-красные глаза, черное тело, редуцированные крылья. Следует помнить, что не у каждого студента появятся все восемь ожидаемых классов; их может быть семь или даже шесть. В таблицу 2 следует вписать также суммарные данные, полученные всеми студентами группы.

Оформить полученные результаты анализирующего скрещивания в виде таблицы и провести генетический анализ, полученного потомства от анализирующего скрещивания (F_b):

- 1) Сцеплены гены или комбинируют независимо;
- 2) Если гены сцеплены, то какова структура тригетерозиты, т.е. установить цис- или трансположение генов;

3) Если гены сцеплены, то определить порядок сцепления, т.е. истинный генотип тригетерозиготы.

4) Определите величину кроссоверных особей.

Таблица 2.

Результаты анализирующего скрещивания при сцепленном наследовании генов и кроссинговере

	Фенотипы гибридов							
	красные глаза				ярко-красные глаза			
	серое тело		черное тело		серое тело		черное тело	
	Нормальные крылья	Редуцированные крылья	Нормальные крылья	Редуцированные крылья	Нормальные крылья	Редуцированные крылья	Нормальные крылья	Редуцированные крылья
Фенотипический радикал								
Число мух, полученных студентом								
Число мух, полученных всеми студентами								

Лабораторная работа № 5

Особенности эмбрионального развития дрозофилы. Метод определения доминантных летальных мутаций

Особое место в генетическом анализе занимает учет доминантных летальных мутаций (ДЛМ). Этот метод довольно прост и не требует специальных тестерных линий. При использовании метода ДЛМ возникают трудности, которые, прежде всего, связаны с интерпретацией, т.к. генетические механизмы вызывающие ДЛМ не известны в каждом конкретном случае. Поэтому надо помнить, что, помимо нарушения собственно генетического

материала, неразвившиеся зиготы могли быть и неоплодотворенными яйцеклетками. Специальные опыты показали, что львиная доля ДЛМ действительно обусловлена генетическими причинами, однако чтобы это проверить необходимо вооружиться цитологическими методами. Показано, что большинство неразвившихся зигот – ДЛМ – это анеуплоидные зиготы или с крупными хромосомными перестройками. Чем раньше гибнет зигота, тем крупнее и сложнее хромосомная перестройка в ней наблюдается.

Постановка эксперимента:

1. В качестве критерия изменений, происходящих в гаметах имаго, используют показатель частоты ДЛМ на ранних стадиях эмбриогенеза. Для этого виргинных имаго разделяют по полу в течение 1-х суток после вылета и выдерживают отдельно до достижения половозрелого 3 – 5 дневного возраста на временной среде. Затем самцов и самок скрещивают в течение 12 часов. Оплодотворенных самок помещают в чашки Петри ($d = 4\text{см}$) с временной средой в количестве 5-ти штук на чашку на 8 часов для получения кладок яиц. По истечении заданного времени подсчитывают общее количество отложенных самками яиц. Учёт производят при помощи бинокля. Затем полученные кладки яиц необходимо поместить в термостат ($t = 23^{\circ}\text{C}$) на 48 часов. По истечении заданного времени проводят учёт ДЛМ по следующим параметрам: белые яйца – ранние летали (0-17 часов эмбрионального развития); жёлтые и коричневые - поздние летали (0-22 часов эмбрионального развития). Далее, используя 3% раствор гипохлорита натрия (NaOCl), определяется количество: неоплодотворенных яиц и количество неразвившихся эмбрионов. Частота ДЛМ определяется как соотношение неразвившихся яиц к общему числу яиц.

2. Оформить полученные результаты в виде таблицы 3. Рассчитать частоту возникновения ДЛМ.

Таблица 3

Учет частоты возникновения доминантных летальных мутаций в эмбриональный период развития дрозофилы

Генотип	№ п/п	∑ яиц	ранние ДЛМ	поздние ДЛМ	% рДЛМ	% пДЛМ

Лабораторная работа № 6

Гибридологический анализ определения группы сцепления гена

Для установления группы сцепления гена, определяющего мутантный фенотип, используют гибридологический анализ с применением тестерных линий. Зачастую используют метод скрещивания, в котором линия-тестер имеет маркированные хромосомы, будь то рецессивные гены или доминантные. При таком методе анализируемый ген обязательно окажется сцепленным с каким-то маркерным геном.

Гибридологический анализ с использованием доминантных маркеров (метод Cy/Pm; D/Sb)

Для определения группы сцепления генов используют метод *Cy/Pm; D/Sb*, который был предложен К. Бриджесом. Этот метод основан на использовании тестерной линии, 2 и 3 хромосомы которой маркированы четырьмя морфологическими мутациями и имеют доминантный характер.

Cyrlly (Cy) – 2 хромосома – загнутые вверх крылья;

Plum (Pm) – 2 хромосома – темно-вишневый цвет глаз;

Dichaete (D) – 3 хромосома – растопыренные крылья;

Stubble (Sb) – 3 хромосома – редуцированные щетинки.

Используемые в качестве маркеров мутации представлены в линии в гетерозиготном состоянии, т.к. в гомозиготе они вызывают леталь.

Постановка скрещивания:

1. Чтобы определить в какой хромосоме расположен анализируемый мутантный ген, необходимо скрестить самку из тестерной линии с мутантным самцом по анализируемому гену. Определить все возможные генотипы гибридов F₁.

$$P: \text{♀ } Cy Pm ; D Sb // Cy^+ Pm^+ ; D^+ Sb^+ \times \text{♂ } 2; 3 // 2; 3$$

F₁:

♀	♂									
		Cy; D	Pm; D	Cy; Sb	Pm; Sb	Cy; 3	Pm; 3	2; D	2; Sb	2; 3
	2; 3									

2. Отобрать для дальнейшего скрещивания самцов из F₁, с любыми двумя маркерными генами по 2 и 3 хромосомам и поставить анализирующее скрещивание, например:

$$P: \text{♀ } Cy 2 ; D 3 // Cy^+ 2 ; D^+ 3 \times \text{♂ } 2; 3 // 2; 3$$

3. Оформить в виде таблицы результаты анализирующего скрещивания и записать все возможные генотипы потомков F_a. Проведя генетический анализ потомков от анализирующего скрещивания можно установить в, какой группе сцепления локализована анализируемая мутация. Для того чтобы определить, в какой хромосоме находится мутация необходимо смотреть на маркерные признаки:

1) Если мутация расположена в 3 хромосоме, то она проявится у мух с маркерными генами *Cy* или *Pm*;

2) Если мутация локализована во 2 хромосоме, то она проявится у мух с маркерными генами *D* или *Sb*;

3) Если мутация находится в 4 хромосоме, то она будет проявляться у половины мух с маркерами *Cy* (*Pm*) или *D* (*Sb*) и у половины мух дикого типа.

Пример оформления отчета лабораторной работы по наследованию мутации *ri* (*radius incompletus*) радиальная жилка у дрозофилы – 3 хромосома, рец.

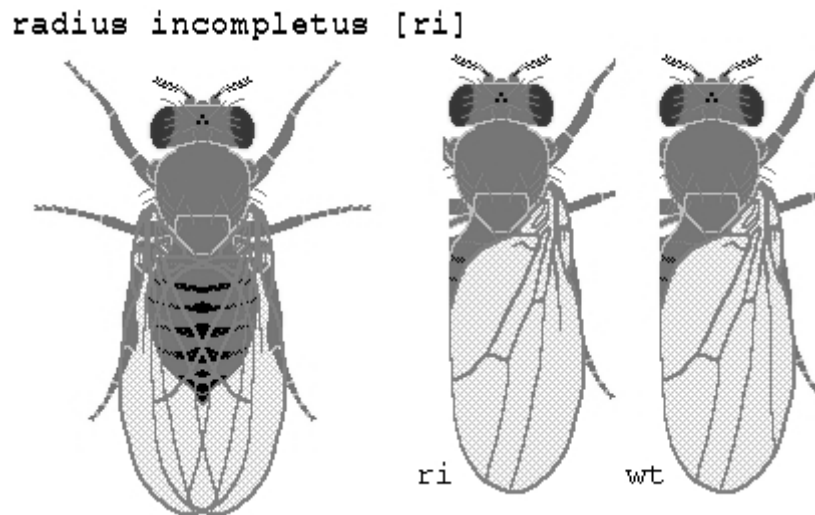


Рисунок 12 – морфологическое проявление признака обрезанные крылья, контролируемый геном *radius incompletus* у дрозофилы

1) Прямое скрещивание:

P: ♀ *ri+ri+* × ♂ *ri*

Гаметы: ♀ *ri+* ♂ *ri*

F₁: *ri+ri* (дикий тип у особей обоих полов).

Обратное скрещивание:

P: ♀ *ri* × ♂ *ri+ri+*

Гаметы: ♀ *ri* ♂ *ri+*

F₁: *ri+ri+* (дикий тип у особей обоих полов).

Подсчет результатов скрещивания F₁ представлен в таблице 4.

Таблица 4.

Результаты скрещивания гибридов первого поколения

	Прямое скрещивание	Обратное скрещивание
♀	15	16
♂	12	15
Всего	27	31

По результатам скрещиваний наблюдается единообразие гибридов F_1 и в прямом и в обратном скрещивании – все мухи дикого типа, таким образом мутация ri является рецессивной и наследуется не сцеплено с полом.

Проверка результатов реципрокных скрещиваний F_1 с использованием метода χ^2 (таблица 5).

Таблица 5.

Результаты количественного анализа наследования радиальной жилки у дрозофилы

		p Фактическое расщепление	q Теоретически ожидаемое расщепление (в данном случае соотношение классов 1:1)	Отклонение $d = p - q$	d^2	d^2/q
ri+ (дикий тип)	♀	27	29	-2	4	0.15
	♂	31	29	2	4	0.15
ri	♀	0	0	0	0	0
	♂	0	0	0	0	0
Всего		58	58	0	8	0.3

Число степеней свободы 1 ($2-1=1$).

$\chi^2_{\text{табл}} = 3.841$.

Таким образом, полученный нами $\chi^2 = 0.3$ меньше табличного, а значит различия от теоретически ожидаемого носят случайный характер.

2) Скрещивание потомков F₁:

$$P: \text{♀ } ri+ri \times \text{♂ } ri+ri$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } ri+ \quad ri \quad \text{♂ } ri+ \quad ri$$

$$F_2: 1ri+ri+ : 2ri+ri: 1riri$$

Подсчет результатов скрещивания F₂ представлен в таблице 6.

Таблица 6.

Результаты скрещивания, полученные при анализе потомков второго поколения

	♀	♂
Дикий тип	30 (дикий тип)	29 (дикий тип)
Мутантный тип	12 (дикий тип)	9 (дикий тип)
Всего	42	38

Согласно 2 закону Менделя при скрещивании двух гетерозиготных потомков первого поколения между собой, во втором поколении наблюдается расщепление в определённом числовом отношении: по фенотипу 3:1, по генотипу 1:2:1. Проверка результатов скрещивания F₂ с использованием метода χ^2 (таблица 7).

Таблица 7.

Результаты количественного анализа наследования радиальной жилки у дрозофилы

		p Фактическое расщепление	q Теоретически ожидаемое расщепление (в данном случае соотношение классов 3:1)	Отклонение d = p - q	d²	d²/q
ri+ (дикий тип)	♀	30	30	0	0	0
	♂	29	30	1	1	0.03
ri	♀	12	10	2	4	0.4
	♂	9	10	-1	1	0.03
Всего		80	80	0	6	0.46

Число степеней свободы 1 ($2-1=1$).

$\chi^2_{\text{табл}} = 3.841$.

Таким образом, полученный нами $\chi^2 = 0.46$ меньше табличного, а значит различия от теоретически ожидаемого носят случайный характер.

Выводы:

- 1) Исследуемый мутантный фенотип дрозофилы, наследуется согласно 1 и 2 законам Менделя, мутация не сцеплена с полом.
- 2) Ген, контролирующий развитие мутантного фенотипа, проявляет рецессивный характер наследования.

Пример оформления отчета лабораторной работы по наследованию мутации *ct* (*cut*) обрезанные крылья у дрозофилы – сцеплен с X хромосомой, рец.

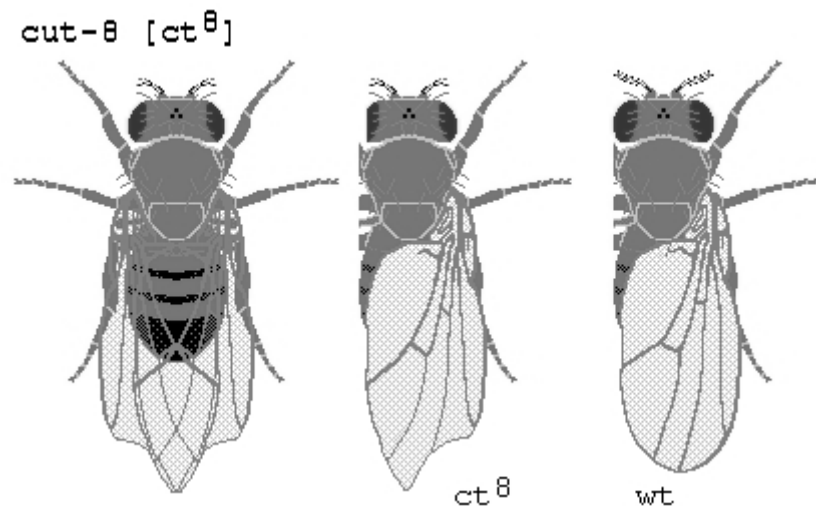


Рисунок 13 – морфологическое проявление признака обрезанные крылья, контролируемый геном *cut* у дрозофилы

1) Прямое скрещивание:

$$P: \text{♀ } X^{ct+}X^{ct+} \times \text{♂ } X^{ct}Y$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } X^{ct+} \quad \text{♂ } X^{ct} \quad Y$$

$F_1: X^{ct+}X^{ct}; X^{ct+}Y$ (по фенотипу формируется дикый тип у особей обоих полов).

Обратное скрещивание:

$$P: \text{♀ } X^{ct}X^{ct} \times \text{♂ } X^{ct+}Y$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } X^{ct} \quad \text{♂ } X^{ct+} \quad Y$$

$F_1: X^{ct+}X^{ct}; X^{ct}Y$ (по фенотипу формируются ♀ дикого типа, ♂ мутантного типа).

Подсчет результатов скрещивания F_1 представлен в таблице 8.

Таблица 8.

Результаты скрещивания, полученные при анализе потомков F₁

	Прямое скрещивание	Обратное скрещивание
♀	16(дикий тип)	18 (дикий тип)
♂	14 (дикий тип)	14 (мутантный тип)
Всего	30	32

По результатам скрещиваний наблюдается расщепление гибридов F₁ в обратном скрещивании: обнаруживаются самки дикого типа и самцы мутантного типа, что свидетельствует о сцепленном с X хромосомой наследовании гена *ct*.

Проверка результатов реципрокных скрещиваний F₁ с использованием метода χ^2 (таблица 9).

Таблица 9.

Результаты количественного анализа наследования признака обрезанное крыло у дрозофилы

			p Фактическое расщепление	q Теоретически ожидаемое расщепление	Отклонение d = p - q	d²	d²/q
Прямое скрещивание	ct+ (дикий тип)	♀	16	15	1	1	0.07
		♂	14	15	-1	1	0.07
	ct	♀	0	0	0	0	0
		♂	0	0	0	0	0
	Всего		30	30	-	-	0.14
$\chi^2 = 0.14, n = 1, P > 0.05$							
Обратное скрещивание	ct+ (дикий тип)	♀	18	16	2	4	0.25
		♂	0	0	0	0	0
	ct	♀	0	0	0	0	0
		♂	14	16	-2	4	0.25
	Всего		32	32	-	-	0.5
$\chi^2 = 0.5, n = 1, P > 0.05$							

$$\chi^2_{\text{табл}} = 3.841$$

Таким образом, полученные нами χ^2 (0.14 и 0.5) меньше табличного, а значит различия от теоретически ожидаемого носят случайный характер.

2) Скрещивание потомков F₁:

Прямое скрещивание:

$$P: \text{♀ } X^{ct+}X^{ct} \times \text{♂ } X^{ct+}Y$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } X^{ct+}; X^{ct} \quad \text{♂ } X^{ct+} \quad Y$$

$$F_1: X^{ct+}X^{ct+}; X^{ct+}X^{ct}; X^{ct+}Y \text{ (дикий тип)}$$

$$X^{ct}Y \text{ (мутантный тип).}$$

Обратное скрещивание:

$$P: \text{♀ } X^{ct+}X^{ct} \times \text{♂ } X^{ct}Y$$

$$\text{Гаметы: } \text{♀ } X^{ct+}; X^{ct} \quad \text{♂ } X^{ct} \quad Y$$

$$F_1: X^{ct+}X^{ct}; X^{ct+}Y \text{ (дикий тип)}$$

$$X^{ct}X^{ct}; X^{ct}Y \text{ (мутантный тип).}$$

Подсчет результатов скрещивания F₂ представлен в таблице 10.

Таблица 10.

Результаты скрещивания, полученные при анализе исследуемого признака в F₂

	Прямое скрещивание	Обратное скрещивание
♀	32 (дикий тип)	18 (дикий тип) 16 (мутантный тип)
♂	14 (дикий тип) 16 (мутантный тип)	16 (дикий тип) 14 (мутантный тип)
Всего	62	64

Проверка результатов скрещивания F_2 с использованием метода χ^2 (таблица 11).

Таблица 11.

Результаты количественного анализа наследования признака обрезанное крыло у дрозофилы

			p	q	Отклонение	d²	d²/q
			Фактическое расщепление	Теоретически ожидаемое расщепление	d = p - q		
Прямое скрещивание	ct+ (дикий тип)	♀	32	31	1	1	0.03
		♂	14	15.5	-1.5	2.25	0.15
	ct	♀	0	0	0	0	0
		♂	16	15.5	0.5	0.25	0.02
	Всего			62	62	-	-
$\chi^2 = 0.2, n = 2, P > 0.05$							
Обратное скрещивание	ct+ (дикий тип)	♀	18	16	2	4	0.25
		♂	16	16	0	0	0
	ct	♀	16	16	0	0	0
		♂	14	16	-2	4	0.25
	Всего			64	64	-	-
$\chi^2 = 0.5, n = 3, P > 0.05$							

$\chi^2_{\text{табл}} = 5.991$ для $n = 2$;

$\chi^2_{\text{табл}} = 7.815$ для $n = 3$

Таким образом, полученные нами χ^2 (0.2 и 0.5) меньше табличных, а значит различия от теоретически ожидаемого носят случайный характер.

Выводы:

1) Согласно результатам исследования, мутация сцеплена с X-хромосомой.

2) Ген, контролирующий развитие мутантного фенотипа, проявляет рецессивный характер наследования.

Решение вопроса о том, случайно ли это различие, или расщепление не соответствует теоретически ожидаемому, возможно только с помощью статистических методов. Очень прост и удобен метод χ^2 (хи-квадрат).

Критерий хи-квадрат – любая статистическая проверка гипотезы, в которой выборочное распределение критерия имеет распределение хи-квадрат при условии верности нулевой гипотезы. Нулевая гипотеза – принимаемое по умолчанию предположение о том, что не существует связи между двумя наблюдаемыми событиями, феноменами. Так, нулевая гипотеза считается верной пока нельзя доказать обратное.

Применение метода хи-квадрат сводится к расчету величины χ^2 и ее оценке.

Расчет осуществляется по формуле:

$$\chi^2 = \sum d^2 / q$$

где \sum – знак суммы, q – теоретически ожидаемое число особей с определенным признаком; d – отклонение фактически полученных данных от теоретически ожидаемых для каждого класса ($p - q$). В процессе расчетов сначала составляют таблицу 12 (приведена ниже) по классам расщепления на основании опытных числовых данных (p). Затем из суммы частот всех классов, составляющей объем выборки, вычисляют теоретически ожидаемые величины (q) для каждого класса соответственно предполагаемой формуле расщепления (3:1, 1:1 и т.п.). Далее определяют отклонение (d) полученных данных от теоретически ожидаемых для каждого класса. Каждое отклонение d возводят в квадрат (d^2), делят его на теоретически ожидаемое число (q) для данного класса. Затем все частные суммируют и получают величину χ^2 согласно приведенной формуле.

Таблица 12

Пример оформления результатов для статистической обработки методом χ^2

	р Фактическое расщепление	q Теоретически ожидаемое расщепление	Отклонение d = p - q	d²	d²/q
(дикий тип)					
(мутантный тип)					
Всего					

При рассмотрении формулы χ^2 видно, что при полном соответствии опытных и теоретических данных χ^2 равен нулю. Если χ^2 не равен нулю, то всегда при применении этого метода предполагают, что различия сравниваемых величин случайны (нулевая гипотеза). Вероятность, указанная в таблице 13, и есть не что иное, как вероятность этой нулевой гипотезы. Вероятность 0.05 говорит о том, что если сравниваемые величины отличаются случайно, то значение χ^2 , указанное в таблице, может появиться только в 5 выборках из 100 подобных. В статистике же принято считать, что события, имеющие вероятность 0.05 и меньше, практически не встречаются. Значит, указанное в таблице значение χ^2 в колонке 0.05 говорит о том, что различия между сравниваемыми величинами нельзя считать случайными, т.е. нулевую гипотезу необходимо отвергнуть. Вероятность 0.01 говорит о том же, только появление значения χ^2 , указанного в таблице, возможно лишь один раз на 100, если различия случайны, т. е. еще более редко. Вот почему при значении χ^2 , равном или большем, чем указано в таблице, нулевая гипотеза отвергается, т. е. считают различия сравниваемых величин не случайными, а закономерными. В остальных случаях (когда χ^2 меньше табличного) принимают нулевую гипотезу, т. е. считают различия случайными.

Число степеней свободы (n) – это число независимо рассчитанных теоретически ожидаемых величин. В общем виде число степеней свободы при

анализе расщепления всегда равно числу различных классов особей минус 1 ($n-1$).

Критерий χ^2 дает надежные результаты, если объем выборки более 50, а теоретически ожидаемые частоты в классах не менее 5.

Таблица 13.

Значение χ^2 при разных степенях свободы (по Фишеру с сокращением)

Число степеней свободы	Вероятность (P)								
	0.99	0.95	0.90	0.80	0.50	0.20	0.10	0.05	0.01
1	0.00016	0.004	0.016	0.0642	0.455	1.642	2.706	3.841	6.635
2	0.0201	0.103	0.211	0.446	1.386	3.219	4.605	5.991	9.210
3	0.115	0.352	0.584	1.005	2.366	4.642	6.251	7.815	11.343
4	0.297	0.711	1.064	1.649	3.357	5.989	7.779	9.488	13.277
5	0.554	1.145	1.610	2.343	4.351	7.289	9.236	11.070	15.086

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асанов А.Ю. Основы генетики. М.: Академия. 2012.- 288 с.
2. Барабанщиков Б.И. Молекулярная генетика. - Казань: КГУ. 1985.
3. Барабанщиков Б.И., Сапаев Е.А. Сборник задач по генетике. - Казань: изд. КГУ, 1988.
4. Божкова В.П. Основы генетики. Практикум. М.: Парадигма, 2009.- 272 с.
5. Ватти К.В., Тихомирова М.М. Руководство к практическим занятиям по генетике. - М. Высшая школа, 1979.
6. Дрозофила в экспериментальной генетике. – под. ред. В.В. Хвостовой, М.Д. Голубовского, Л.И. Корочкина – Н.: изд. «Наука», 1978. – 287 с.
7. Дьяков Ю.Т., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю. Введение в генетику грибов. - М.: Академия, 2006. - 304 с.
8. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика.- Новосибирск, 2007
9. Захаров И.А. Генетика в XX веке. Очерки по истории генетики. М.: Наука. 2003.
10. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. - М., 1989.
11. Клаг У., Каммингс М. Основы генетики - М.: Техносфера, 2007.
12. Крюков В.И. Генетика. Часть 4. Генетика пола. Сцепление генов и кроссинговер. Учебное пособие для ВУЗов. Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2006. – 168 с.
13. Нахаева, В. И. Биология: генетика. Практический курс : учеб. пособие для СПО / В. И. Нахаева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2018. — 276 с. — (Серия : Профессиональное образование).
14. Орлова Н.Н. Генетический анализ. - М.: МГУ, 1991.
15. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. - Минск: Высшэйшая школа, 1978. С. 17-57.
16. Рыбчин Ю.М. Основы генетической инженерии - СПб.: СПбГТУ, 2002.
17. Серов О.Л., Баттулин Н.Р. Генетика развития: электронный лекционный курс. Новосибирск (электронный вариант).

18. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х томах. М.: Мир. 1998.
19. Смирнов В.Г. Цитогенетика. - М.: Высшая школа. 1991.
20. Смирнов А.Ф., Трухина А.В. Молекулярно-генетические механизмы детерминации пола у животных. — СПб. : Нестор-История, 2016.— 168 с.
21. Тихомирова М.М. Генетический анализ. - Л.: ЛГУ, 1990.
22. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т. Т. 3: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 366 с.
23. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. - М.: Наука. 1985.
24. Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. История открытий на дрозофиле – этапы развития генетики. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):39-49.
25. Genetic nomenclature guide with information on Websites. Trends Genet. 1998.
26. Griffiths A., Gelbart W., Miller J., Lewontin R. Modern Genetic Analysis. - Ed. Freeman, 1999. (Электронный вариант).
27. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser Ch.A., Scott ML, Krieger M.P., Zipursky L., Darnell J. Molecular Cell Biology, Fifth Edition. - Freeman. - 2003. (Электронный вариант).
28. Pierce B. Genetics - Freedman ed. 2002. (Электронный вариант).
29. Prokop, A. (2016). Fruit flies in biological research. Biological Sciences Review 28, 10-14.
30. Prokop, A. (2018). Why funding fruit fly research is important for the biomedical sciences. Open Access Government 20, 198-201
31. Zyкова ТУ, Levitsky VG, Belyaeva ES, Zhimulev IF. Polytene Chromosomes - A Portrait of Functional Organization of the *Drosophila* Genome. Curr Genomics. 2018;19(3):179–191. doi:10.2174/1389202918666171016123830

ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ

1. <https://droso4schools.wordpress.com/why-fly/>
2. <https://www.sdbonline.org>
3. <https://bdsc.indiana.edu/index.html>
4. <http://flybase.org>

К лабораторной работе № 3

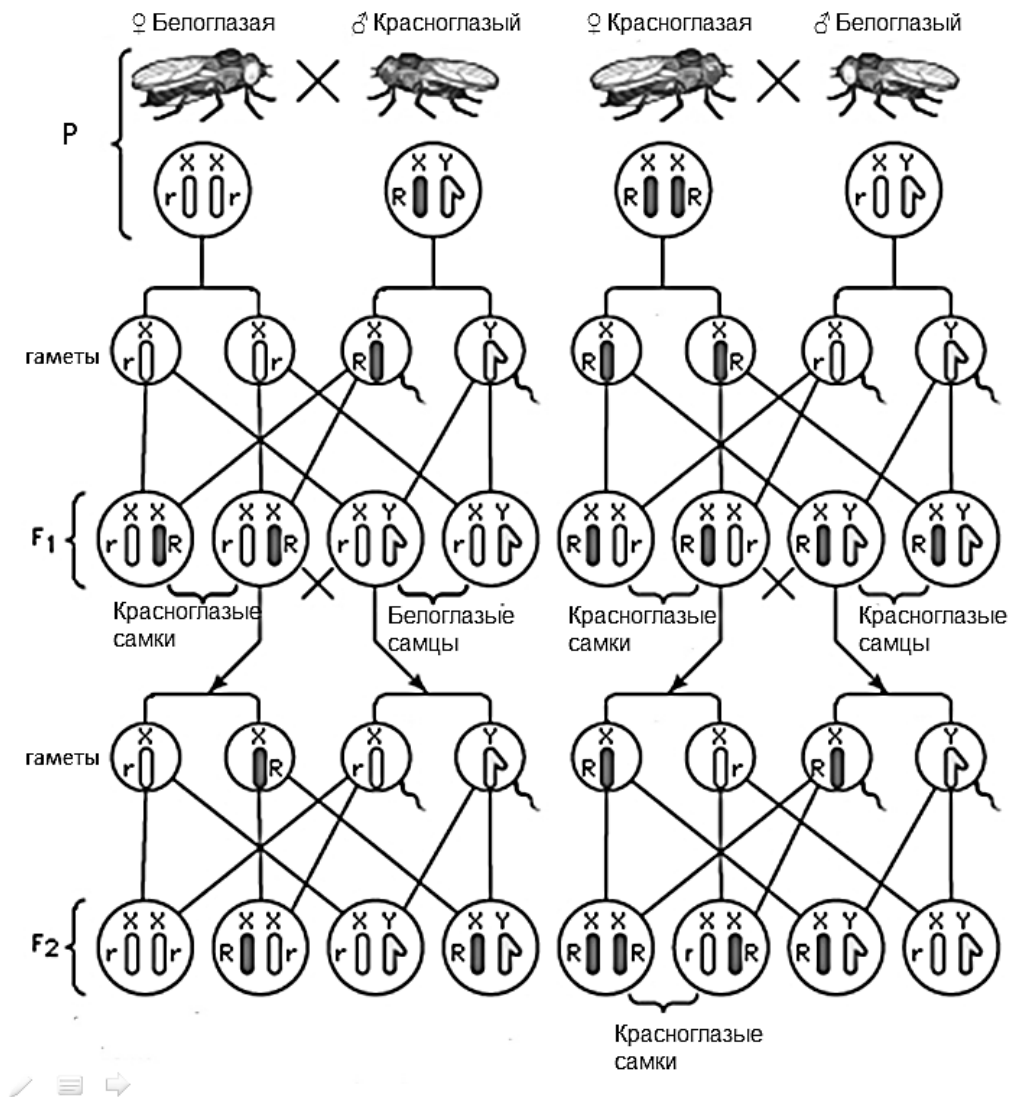
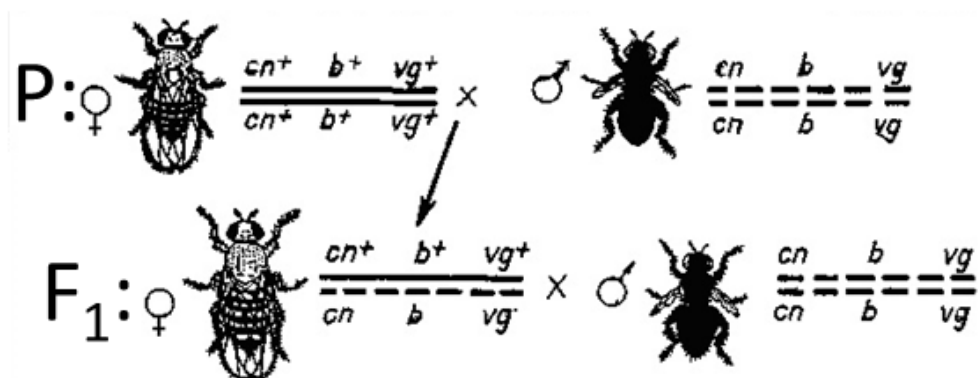


Рисунок 1 – Схема наследования признака (окраска глаз), сцепленного с полом. При наследовании признаков, сцепленных с полом, нарушаются первый и второй законы Менделя: нет единообразия гибридов первого поколения в одном из реципрокных скрещиваний, а есть криск-кросс наследование – самка передает свои признаки сыновьям, а самцы - дочерям. И в этом же направлении скрещивания в F₂ расщепление и у самок, и у самцов 1:1, а не 3:1. Хотя в целом в реципрокном скрещивании расщепление 3:1 сохраняется, но рецессивный признак присутствует только у одного пола (в зависимости от хромосомного определения пола или у самок или у самцов).









Гаметы ♀ F ₁	Генотипы F ₂	Фенотипы F ₂
$\begin{array}{c} cn^+ \quad b^+ \quad vg^+ \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$	$\begin{array}{c} cn^+ \quad b^+ \quad vg^+ \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$ $\begin{array}{c} cn \quad b \quad vg \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$	 
$\begin{array}{c} cn^+ \quad b \quad vg \\ \hline cn \quad b^+ \quad vg^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} cn^+ \quad b \quad vg \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$ $\begin{array}{c} cn \quad b^+ \quad vg^+ \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$	 
$\begin{array}{c} cn^+ \quad b^+ \quad vg \\ \hline cn \quad b \quad vg^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} cn^+ \quad b^+ \quad vg \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$ $\begin{array}{c} cn \quad b \quad vg^+ \\ \hline cn \quad b \quad vg \end{array}$	 

Рисунок 2 – Схема наследования признаков при сцеплении генов и кроссинговере в хромосоме 2 дрозофилы, маркированная по трем рецессивным генам: *cn* (*cinnabar*) – ярко-красный цвет глаз, *b* (*black*) – темно-серый цвет тела и *vg* (*vestigial*) – редуцированная форма крыла.

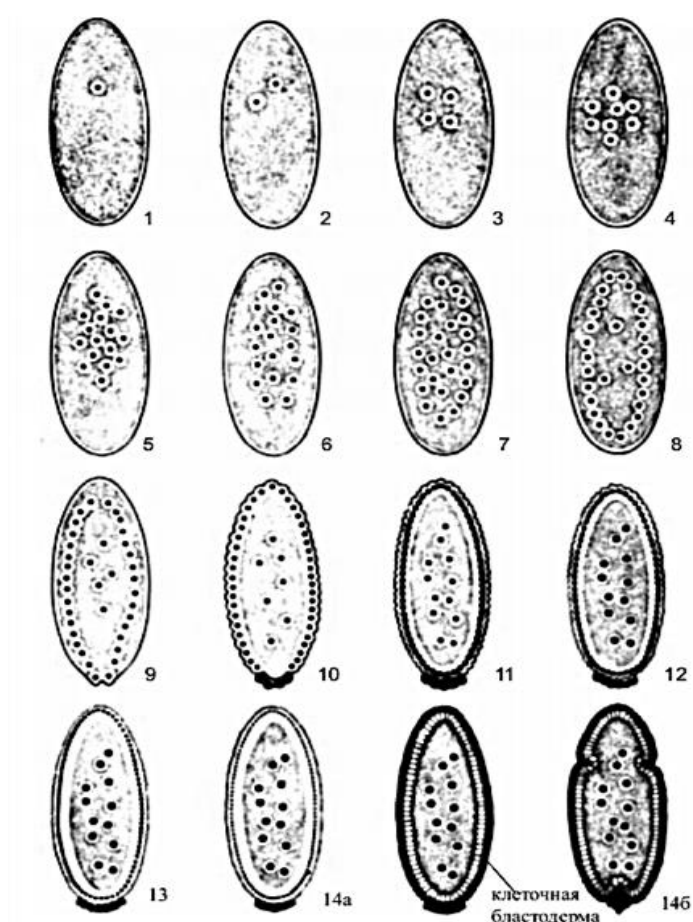


Рисунок 3 – Стадии раннего эмбриогенеза дрозофилы (2.5 – 3 часа с момента оплодотворения). Синхронные деления ядер происходят в центре ооцита (1 – 5 стадии). После стадии 6 ядра мигрируют под кортекс, и к 10 стадии ядра выстраиваются в один слой под оболочкой. На 10 стадии формируются полярные клетки, из которых в дальнейшем развиваются половые. Стадия 14а – эмбрион перед 14-м синхронным делением ядер и после выхода из этого митоза – эмбрион приобретает клеточную структуру (целлюляризация).

Генетические термины и некоторые методические замечания, которые необходимо иметь в виду при работе

Фенотип природной формы дрозофилы принято обозначать терминами нормальный или дикий тип (*wild type*) – она имеет желтовато-коричневую окраску тела, темно-красный цвет глаз и нормальные крылья.

1. В соответствии с принятой в литературе о дрозофиле системой, гены рецессивных мутаций обозначают малыми буквами – первыми в английских названиях соответствующих мутантов; например, *e* – *ebony* (тело цвета эбенового дерева); *c* – *curved* (загнутые крылья) и т. д. В тех случаях, когда с одной и той же буквы начинается название другого или других мутантов, то для их различения к первой букве прибавляют вторую, например, *ey* – *eyeless* (безглазый); *cm* – *carmine* (карминные глаза); *cn* – *cinnabar* (киноварные глаза).

2. Гены доминантных особенностей (мутантов) обозначают большими буквами алфавита с соблюдением того же принципа наращивания дополнительной второй или третьей букв, если в них есть необходимость; например, *B* – *Bar* (полосковидные глаза); *Bx* – *Beadex* (вырезанные крылья).

3. Нормальные аллели рецессивных и доминантных генов принято обозначать знаком + возле символа фенотипа. Например, рецессивный аллель гена окраски тела *ebony* – *e*, нормальный аллель e^+ .

4. Буквами PP (начальные от слова parents – родители) обозначают скрещиваемые, т. е. родительские формы.

5. Знак × между обозначениями, или формулами, родителей означает их скрещивание.

6. В написании любого скрещивания на первом месте принято ставить обозначение самки (матери), на втором – самца. Предпочтение матери отдается потому, что в генетическом анализе потомство родителей неизвестного происхождения (например, выловленных в природе или возникших в результате мутаций) реже вызывает сомнения в отношении материнства; отцовство же их в одних случаях всегда неизвестно, в других – сомнительно в той или иной степени.

7. В английской литературе для обозначения скрещивания двух неодинаковых гомозигот, например, $AA \times aa$, или $aa \times AA$, с которыми нам в большинстве случаев придется иметь дело в дальнейшем, существует термин кросс (*cross*), соответствующий недифференцированному русскому понятию скрещивание.

8. Если же скрещивают две одинаковые гомозиготы, например, $AA \times AA$, или $aa \times aa$, такое скрещивание по-английски обозначают особым термином – инкросс (*incross*), т. е. скрещивание внутри себя, или сходных особей (откуда происходит термин *inbreeding*).

9. Буквой F (от слова *filial* – дочерний) и цифрой при ней, например, F_1 , F_2 , F_3 и т.д., обозначают потомства первого, второго, третьего и последующих гибридных поколений – потомков данного исходного скрещивания.

10. Гибриды F_2 от каждого исходного скрещивания могут быть получены тремя путями: а) Скрещиванием гибридов F_1 между собой, т. е. $F_1 \times F_1$, или $Aa \times Aa$. Этот тип скрещиваний называется прямым, а гибриды F_2 , полученные от таких скрещиваний – гибридами F_2 от прямого скрещивания F_1 . В английской литературе для обозначения скрещиваний этого типа существует особый термин – интеркросс (*intercross*); по-русски он означает то же самое, т.е. скрещивание между собой, или друг с другом. Соответственно с этим гибридов F_2 от интеркросса можно кратко называть интеркроссным F_2 .

б) Скрещиванием гибридов F_1 с одной родительской формой, например, с доминантной AA , т. е. $Aa \times AA$, или $AA \times Aa$.

в) Скрещиванием гибридов F_1 с другой родительской формой, например, с рецессивной aa , т.е. $Aa \times aa$ или $aa \times Aa$. Скрещивания обоих этих типов носят название возвратных (возврат к одному из родителей); в животноводстве они называются также поглотительными. По-английски возвратные скрещивания и возникающее в них потомство обозначаются термином, аналогичным соответствующему русскому, а именно – беккроссы (*backcross*). Те и другие сокращенно обозначаются также буквами BC (начальные от слов *back* – возврат, назад и *cross* – скрещивание). Поэтому вместо пространного определения возвратных гибридов F_2 , полученных от скрещивания гибридов F_1 , например, с AA , или с aa , можно обозначить их соответственно более кратко: BC от скрещивания F_1 с AA , или BC от скрещивания F_1 с aa . Если по характеру опыта или исследования возвратные скрещивания с той или другой родительской формой продолжаются и в последующих поколениях, тогда возвратных гибридов F_3 , F_4 , F_5 и последующих поколений можно соответственно обозначить как BC_2 , BC_3 , BC_4 и т. д. (Обратите внимание, что номера последовательных беккроссных поколений на единицу меньше соответствующих им гибридных за счет выпадения из нумерации беккроссных поколений гибридов первого поколения.)

11. Обозначения зигот и гамет в тексте иногда могут несколько отличаться от их табличного написания. В таблицах все зиготы для наглядности изображены в виде дроби с двумя черточками, соответствующими двум хромосомам диплоидного организма. Находящиеся в них гены записаны в две строки – над черточками и под ними. Так, например, формула означает, что у данного гибрида (дигибрида) в одной гомологичной хромосоме локализованы рецессивные гены a и b , а в другой, гомологичной хромосоме – их нормальные аллели, $+$ и $+$. У такого гибрида при отсутствии перекреста образуются два типа гамет с одной хромосомой, а именно ab и $++$. Текстовые обозначения этого

гибрида и образующихся у него двух типов гамет для краткости иногда будут несколько упрощены и записаны соответственно так: $a\ b/+ +$, $a\ b$ и $+ +$.

12. Порядок расположения неаллельных генов в обозначении генотипов должен соответствовать их действительному порядку (локализации) по длине данной хромосомы, причем на первом месте принято писать ген, занимающий крайнее положение на условно левом конце этой хромосомы.

13. При расположении гамет на сторонах решетки Пеннета самки располагаются в верхней половине решетки, а самцы – в нижней.

Подписано в печать 05.03.2020.
Бумага офсетная, печать цифровая.
Формат 60×84/16.
Усл. п. л. 3.95, Тираж 100 экз. Заказ № 64/05.

Напечатано в «Оперативной типографии Капринт»,
Казань, ул. Лево-Булачная, д 56, (843) 290-61-08